

# Avances en la caracterización molecular de los microorganismos biooxidantes en tanques industriales de biooxidación de arsenopirita para la recuperación de oro y en drenajes ácidos de minas: Reporte preliminar

Milagros Quintana<sup>(1,2)</sup>; Martha Ly<sup>(2)</sup>; José Bauer<sup>(2)</sup>; Marco Espinoza<sup>(1)</sup> [mespinoza@ipen.gob.pe](mailto:mespinoza@ipen.gob.pe);  
Ysabel Montoya<sup>(1)</sup>; José Espinoza<sup>(1,2)</sup>

(1) Instituto Peruano de Energía Nuclear. Departamento de Biología  
(2) Universidad Peruana Cayetano Heredia, Unidad de Biotecnología Molecular.  
Laboratorio de Biominería y Medio Ambiente Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID)

## Resumen

La biooxidación en tanques industriales para la recuperación de oro refractario de la arsenopirita es un proceso eficiente aplicado en la industria minera por ser costo-efectiva y por tener un menor impacto ambiental que la extracción de oro por métodos convencionales. En este proceso los sulfuros metálicos insolubles son oxidados a sulfatos metálicos solubles facilitando la extracción del oro oculto en el mineral. Los microorganismos quimioautótrofos más importantes usadas en procesos de biooxidación son *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, las cuales forman parte de la biodiversidad de microorganismos observados en los depósitos de minerales y efluentes ácidos ambientales. El presente estudio tiene como objetivo el aislamiento, la identificación y la caracterización molecular de las poblaciones de microorganismos actuantes en la biooxidación de arsenopirita para la recuperación de oro en los tanques industriales de la mina Tamboraque y en drenajes ácidos de la mina. Los resultados indican que la biooxidación en los reactores y en los drenajes ácidos de la mina es llevado a cabo por un consorcio de microorganismos entre los que se encuentran los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*, los cuales han sido cultivados en condiciones de laboratorio y caracterizados microbiológicamente por coloración gram y microscopía electrónica.

## 1. Introducción

*Acidithiobacillus-ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus caldus* son los principales microorganismos usados en el proceso industrial de la biooxidación del oro en diferentes plantas industriales del mundo (Asmah et al., 2001). Estos organismos se hallan de modo natural en los depósitos de minerales y catalizan la solubilización de los sulfuros metálicos de minerales por reacciones de oxidación para utilizar la energía química liberada en su metabolismo; en acción conjunta, con otros organismos autótrofos y heterótrofos, están implicados en la generación de drenajes ácidos de las minas, el cual es un importante problema ambiental a nivel mundial (Rawlings and Silver, 1995).

La Biooxidación industrial llevado a cabo por estos microorganismos es un tratamiento alternativo a la tostación y a la lixiviación a presión para la extracción de metales y

constituye una de las alternativas probadas para el tratamiento de minerales refractarios sulfurados que contienen oro, denominación de los minerales que no pueden ser lixiviados directamente por el método convencional de cianuración. El proceso se realiza en biorreactores bajo control de la concentración de oxígeno, temperatura, pH, etc. La mayoría de yacimientos de oro contienen oro refractario lo cual evidencia importancia económica de la aplicación de la biooxidación, ya que se estima que actualmente la tercera parte de la producción de oro en el mundo proviene de dichos depósitos (Loayza y col, 1999).

Actualmente, se cuenta con la secuencia completa de los genomas de bacterias de aplicación industrial como *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, *Shewanella oneidensis* – bacteria que tiene la capacidad de reducir una variedad de compuestos orgánicos, iones metálicos y radioactivos (Kolker y col, 2005), *Sulfolobus solfataricus*- crece a pH 2 y a temperaturas de 80°C y oxida Fe<sup>+2</sup> y

sulfuros, clave para el desarrollo de biooxidación industrial a altas temperaturas (She y col, 2001). Sin embargo, de modo similar que en otros organismos ~40% de las secuencias han sido anotadas como no-caracterizadas. Esto significa que un gran porcentaje de genes, en los que se cuentan los de importancia industrial, aun no han sido identificados.

El presente proyecto se dirige a la caracterización molecular de los microorganismos implicados en la oxidación de la arsenopirita en biorreactores industriales y en drenajes ácidos de Tamboraque con el objetivo de obtener información genómica que permita identificar los genes de estos microorganismos y modificarlos por ingeniería genética para hacer mas eficiente el proceso de biooxidación industrial y posibilitar el desarrollo de tecnología de control de producción de drenajes ácidos en yacimientos mineros abandonados.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Microorganismos

2.1.a. Cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 19859  
La cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC) tiene como características: Depositada como *Thiobacillus ferrooxidans* Temple and Colmer. Recomendada para uso en pruebas descritas en ASTM (Standard Test Method E1357-90) donde sólo la taxonomía es especificada. Remueve fierro de pirita en depósitos de minerales (Hoffmann, 1981). Sus aplicaciones: produce sulfuro de hidrógeno y oxidoreductasa ion férrico (Sugio, 1992); para probar la tasa de lixiviación de fierro desde pirita (ASTM International E1357-90).

### 2.1.b. Cultivo de drenaje ácido y del bioreactor

Microorganismos del drenaje ácido de la mina Tamboraque cultivada en medio 9K y mantenida en actividad con controles de temperatura, pH, oxígeno disuelto y recambio de sales nutritivas. El primer cultivo secundario de drenaje ácido en medio 9K a condiciones de laboratorio fue relación 1/10 (10 ml de muestra en 100 ml de medio fresco). Los microorganismos provenientes de los tanques de biooxidación de arsenopirita de la mina de Tamboraque fueron colectados durante la fase de crecimiento logarítmico. Los microorganismos

fueron cultivados y mantenidos en el laboratorio de modo similar a los microorganismos provenientes de los drenajes ácidos.

### 2.2. Medios de Cultivo

#### 2.2.a. Medios líquidos

El medio 9 K fue preparado con 3.00 g de sulfato de amonio, 0.05g de fosfato de potasio dibásico, 0.5.g de sulfato de magnesio, 0.1g de cloruro de potasio, 0.012g de nitrato de calcio, 10 ml de ácido sulfúrico en 700 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C x 15 min. Se añade una solución estéril de sulfato ferroso que contiene 30 g de sulfato ferroso en 300 ml de agua destilada a pH a 1.8 con ácido sulfúrico. 0.5 ml del cultivo de *A. ferrooxidans* se inoculo en 5 ml de medio 9K fresco. Se dejó en incubación a temperatura ambiente por 10 días. De este nuevo subcultivo se tomaron 2.5 ml y se inoculo en 100 ml de medio 9K fresco. Se dejó en incubación a temperatura ambiente con agitación de 200rxm hasta que el medio cambió a un color naranja intenso.

#### 2.2.b. Medios sólidos

Los microorganismos fueron cultivados en placas de agarosa libre de sustancias orgánicas que inhiban el crecimiento bacteriano ya que son bacterias quimiolitotróficas obligadas (Johnson, 2001). Se agregó 10 g de agarosa en 25 ml de alcohol y 50 ml de agua destilada y se mantuvo en agitación por 5 minutos. Se dejó decantar y se descartó el sobrenadante (fase alcohólica). Se repitió el lavado con alcohol 2 veces mas y luego solo con agua destilada hasta eliminar cualquier resto de alcohol. Se completó a 50 ml de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C x 15 min. Para la solución de Holmes se agregó 35 ml de medio 9K 10X, 7.5 ml de solución de sulfato ferroso heptahidrato pH 2 y 407.5 ml de agua destilada ácida (pH 3). Solución de sulfato ferroso: 5g de sulfato ferroso en 15 ml de agua destilada (pH 2) y esterilizada por filtración. Se mezcló la solución de Holmes con la solución de agarosa a 55°C aprox. El medio fue distribuido en placas e incubadas a 37°C por 24 horas. Se sembró con ayuda de un asa de vidrio y las placas se dejaron en incubación a temperatura ambiente por 2 semanas.

## 3. Análisis Microbiológico

### 3.a. Examen microscópico directo

Todas las muestras fueron examinadas con un microscopio de contraste de fases. En una gota de cada muestra, en fase exponencial, se pudo observar poblaciones bacterianas mixtas orden  $10^9$  microorganismos/ml. Para aumentar la población de bacterias oxidantes de hierro y/o sulfato así como para adaptar dichos microorganismos a condiciones de laboratorio, se sembró 10 ml de la muestra de drenaje ácido en 100 ml de medio 9K y se incubó a temperatura ambiente con agitación (200 rpm) hasta observar el cambio de color de verde claro a naranja intenso por efecto de la oxidación bacteriana del sulfato ferroso (Bond y col, 2000) (4 días aprox.).

### 3.b. Coloración Gram

Cada cultivo fue filtrado a través de filtros (0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro) y el sedimento se suspendió en 1 ml de agua ácida. Una gota de la muestra fijada en una lámina portaobjetos fue sometida a coloración Gram y observada en microscopio óptico (1000x).

### 3.c. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La observación por microscopia electrónica de los subcultivos de drenaje ácido de la mina Tamboraque y el cultivo de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 19859 fueron realizados a partir de las muestras fijadas de la misma manera como se describe anteriormente para la coloración Gram y luego fueron recubiertas por la técnica de sputtering con Oro-Paladium; para ello se utilizó el equipo "Magnetron Sputtering" del Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Universidad Nacional de Ingeniería.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.a. Cultivos de los Microorganismos

Se ajustaron las condiciones óptimas para el cultivo de microorganismos biooxidantes provenientes del biorreactor y de drenajes ácidos. Para los cultivos secundarios a partir del cultivo de drenaje ácido del tanque del proceso a escala de laboratorio de la mina Tamboraque se inoculó 10 ml de dicha muestra en 100 ml del medio sintético 9K (pH 1.8) por duplicado. Al comienzo los cultivos se incubaron a 37°C sin agitación demorando aproximadamente 14 días para el crecimiento bacteriano (Figura 1). Cuando los cultivos se dejaron en incubación a temperatura ambiente (26 a 28 °C aproximadamente) con agitación (200 rpm), el tiempo de crecimiento se redujo a 6 días. La cepa de *A. ferrooxidans* ATCC se adaptó bien a las

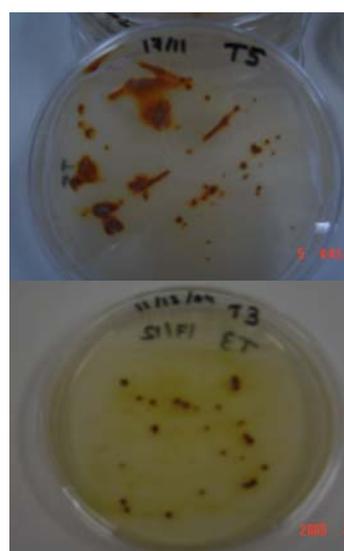
condiciones de cultivo en el laboratorio, creciendo en 5 días aproximadamente en medio 9K con agitación (200 rpm), a temperatura ambiente. Respecto al cultivo mixto del biorreactor, no se realizaron subcultivos.



**Figura 1.** Cultivo de microorganismos biooxidantes de hierro.

Donde 1. Control 2. Cultivo de 4 días 3. Cultivo de 8 días 4. Cultivo de 11 días 5 Cultivo de 14 días **N.B.** la coloración naranja es debida a la oxidación del ion ferroso a férrico.

En las placas sembradas con cultivos y subcultivos del drenaje ácido solo se noto la presencia de colonias pertenecientes a *A. Ferrooxidans* (Fig. 2). Este medio sólido no permite el crecimiento de la biodiversidad de microorganismos biooxidantes presentes tanto en el biorreactor, como en los drenajes ácidos. Por lo tanto el cultivo en placa no constituye el medio adecuado para el aislamiento de microorganismos biooxidantes proveniente de muestras ambientales.

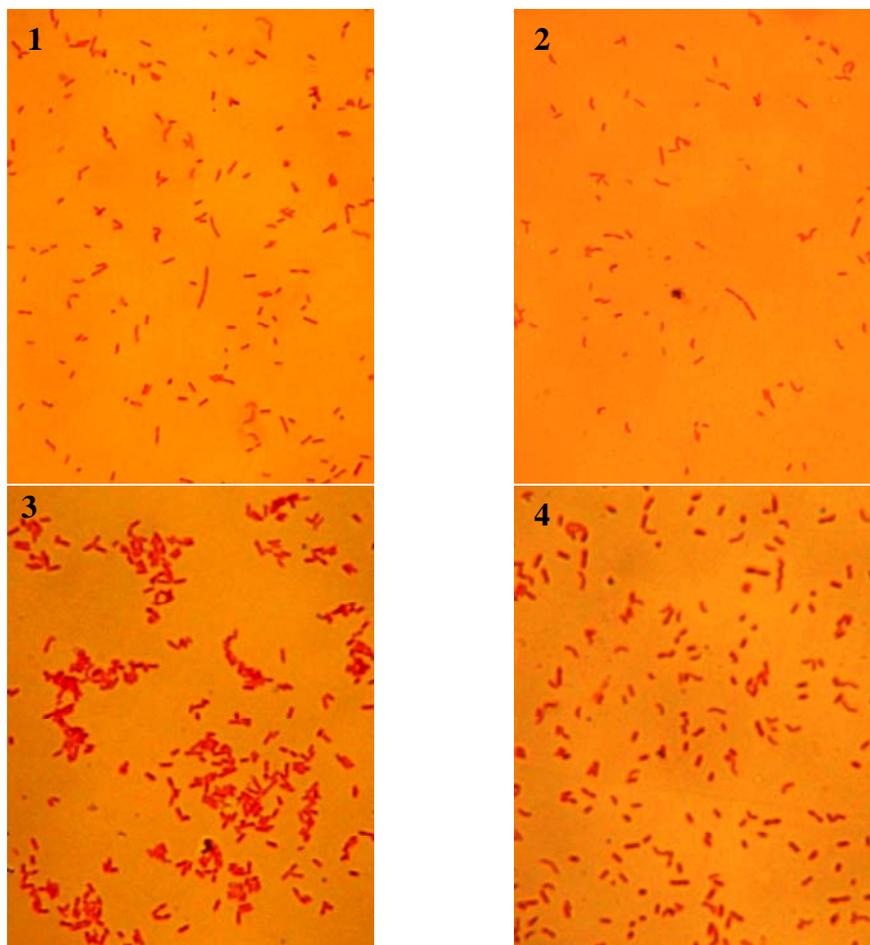


**Figura 2.** Colonias de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en placa.

#### 4.b. Microscopía óptica

Los microorganismos acidófilos, quimilitotróficos biooxidantes de hierro y sulfuros que crecieron en los cultivos líquidos fueron teñidos con la coloración Gram,

observándose una variedad de bacilos Gram negativos con morfología correspondiente a los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* (Johnson, 2001) observados en el microscopio óptico a 1000X (Fig. 3).



**Figura 3.** Fotografías de microorganismos Gram negativos presentes en cultivos de drenaje ácido de mina. Aumento 1000X. 1 y 2. Cultivos secundarios (subcultivos) de drenaje ácido de mina Tamboraque 3. Cultivo de cepa de *A. ferrooxidans* 4. Cultivo de drenaje ácido de mina Tamboraque.

#### 4.c. Microscopía Electrónica de microorganismos biooxidantes

La fotografía (Fig. 4) demuestra la biodiversidad de microorganismos presentes en la muestras con morfología correspondientes *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* (Johnson, 2001). También se pueden observar microorganismos adheridos a rastros del mineral.

**Figura 4.** Fotografías en microscopía electrónica de barrido de un cultivo secundario de drenaje ácido de la mina Tamboraque.



## 5. Conclusiones

Se han establecido las condiciones óptimas para el cultivo y el aislamiento de microorganismos biooxidantes provenientes de tanques industriales de biooxidación de arsenopirita y de muestras de drenajes ácidos ambientales.

El proceso de biooxidación en los tanques industriales y drenajes ácidos es llevado a cabo por una biodiversidad de microorganismos entre los que se cuentan los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* entre otros.

## Referencias

- 1) Asmah, R.H., Clement, C., Bosompem, K.M., Wilson, M.D., Brown, C.A., Osei, Y.D. and Addy, M.E. (2001) Molecular characterization of mineral leaching bacteria from a gold mine in Ghana using PCR and RFLP. En V.S.T. Ciminelli and O. García Jr. (editors) Proceedings of the international biohydrometallurgy symposium IBS 2001: Fundamentals, Technology and sustainable development, Part A 317-323.
- 2) ASTM International. Standard test method for determining the rate of bioleaching of iron from pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. West Conshohocken, PA: ASTM International; ASTM Standard Test Method E1357-90.
- 3) Barns, S.M.; Fundyga, R.E.; Jefferies, M.W. and Pace, N.R (1994) remarkable diversity detected in a yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the national Academy of Sciences U.S.A.* **91**:1609-1613.
- 4) Bond, P.; Smeriga, S. And Banfield J. (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Applied and Environmental Microbiology.* **66**(9): 3842-3849.
- 5) Coram and Rawlings (2002) Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40°C. *Applied and Environmental Microbiology.* **60**(2): 838-845.
- 6) Hoffmann MR (1981) Kinetics of the removal of iron pyrite from coal by microbial catalysis. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 259-271.
- 7) Johnson, D. (2001) Genus II *Leptospirillum* Hippe 2000 (ex Markosyan 1972, 26) pp. 453-457. En G. Garrity (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol I. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- 8) Lane, D.J (1991) 16S/23S rRNA sequencing, pp 115-175 En E. Stackebrand y M. Goodfellow (ed), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York.
- 9) Loayza, C., Ly, M.E., Yupanqui, R. and Roman, G. 1999. Laboratory biooxidation tests of arsenopyrite concentrate for industrial plant Tamboraque. In R. Amils, and A. Ballester. (Editors), *Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS 1999: Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21<sup>st</sup> century*, Part A. 405-410.
- 10) Don, R.H; Cox, P.T. Wainwright, B.J.; Baker, K. y Mattick, J.S. (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* **19**:4008-4008.
- 11) Kolker E, Picone AF, Galperin MY, Romine MF, Higdon R, Makarova KS, Kolker N, Anderson GA, Qiu X, Auberry KJ, Babnigg G, Beliaev AS, Edlefsen P, Elias DA, Gorby YA, Holzman T, Klappenbach JA, Konstantinidis KT, Land ML, Lipton MS, McCue LA, Monroe M, Pasa-Tolic L, Pinchuk G, Purvine S, Serres MH, Tsapin S, Zakrajsek BA, Zhu W, Zhou J, Larimer FW, Lawrence CE, Riley M, Collart FR, Yates JR 3rd, Smith RD, Giometti CS, Nealson KH, Fredrickson JK, Tiedje JM. (2005) Global profiling of *Shewanella oneidensis* MR-1: expression of hypothetical genes and improved functional annotations. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **102**(6):2099-104.
- 12) Rawlings D.E., Tributsch H. & Hansford G.S. (1999). Reasons why *Leptospirillum*-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology.* **145**: 5-13.
- 13) Rawlings, D. and Silver, S. (1995) Mining with microbes. *Bio/Technology* **13**:773-778.
- 14) She Q, Singh RK, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez MJ, Chan-

Weiherr CC, Clausen IG, Curtis BA, De Moors A, Erauso G, Fletcher C, Gordon PM, Heikamp-de Jong I, Jeffries AC, Kozera CJ, Medina N, Peng X, Thi-Ngoc HP, Redder P, Schenk ME, Theriault C, Tolstrup N, Charlebois RL, Doolittle WF, Duguet M, Gaasterland T, Garrett RA, Ragan MA, Sensen CW, Van der Oost J. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 7835-40.

- 15) Sugio T (1992) Existence of a hydrogen sulfide: Ferric ion oxidoreductase in iron-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 431-433.