

Identificación molecular de microorganismos acidófilos en un tanque industrial de biooxidación de arsenopirita para la recuperación de oro

Milagros Quintana ^{a,b,c}, Martha Ly ^b, Ysabel Montoya ^a, José Bauer ^b, José Espinoza ^{a,c},
Marco Espinoza ^a

^a Departamento de Biología, Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470,
Lima 41, Perú

^b Departamento de Microbiología, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado
430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima, Perú

^c Unidad de Biotecnología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Ciencia y
Tecnología (LID). Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Urb.
Ingeniería, S.M.P. Lima, Perú

Resumen

En el presente trabajo, mediante amplificación por PCR del gen 16S rRNA bacteriano, se ha logrado identificar a los principales microorganismos quimiolitótrofos, acidófilos y biooxidantes de hierro y sulfuros que participan en la biooxidación de arsenopirita en un tanque industrial de la mina Tamboraque (Huarochirí, Lima) así como en el drenaje ácido de la misma mina. Los microorganismos reconocidos en el tanque industrial de biooxidación fueron: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum sp.*, bacteria similar a *Acidithiobacillus caldus* y una *Archaeobacteria* (posiblemente *Ferroplasma*) mientras que en el cultivo de drenaje ácido de la mina se encontraron: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum sp* y bacteria similar a *Acidithiobacillus caldus*.

Abstract

Working with amplification by polymerase chain reaction (PCR) of bacterial 16S rRNA gene, it has been possible to identify the main acidophilic chemolithoautotrophic iron and sulfur oxidizing microorganisms that participate in the biooxidation of arsenopyrite in industrial tank of the Tamboraque mine as well as in the acid drainage of the same mine. The microorganisms recognized in the biooxidation industrial tank were: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum sp.*, *Acidithiobacillus caldus*-like organism and one *Archaeobacteria* (possibly *Ferroplasma*-like organism) whereas in the culture of acid mine drainage they were: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum sp* and *Acidithiobacillus caldus*-like organism.

1 Introducción

El uso de microorganismos biolixiviantes/biooxidantes para recuperar metales de interés a partir de minerales de baja ley y concentrados de minerales se ha incrementado porque mejora la eficiencia del proceso y el impacto ambiental es menor (Rawlings, 2002; Olson y col., 2003). *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, *A. caldus*, y *Leptospirillum ferrooxidans* son las bacterias quimiolitotróficas más importantes usadas en procesos de biooxidación (Rawlings, 2005; Rawlings y col., 1999 (I); Mishra y col., 2005; Devasia & Natarajan, 2004) y se encuentran en forma nativa en los depósitos de minerales en todo el mundo. Estos organismos tienden a

adaptarse a los depósitos en los que ellos se encuentran y por tanto tienen mejor disposición para una extracción más eficiente del metal de su depósito (Morin, 1995). Sorprendentemente, hay pocos estudios relacionados con la composición de las poblaciones microbianas que participan en las operaciones comerciales de biooxidación de mineral (Okibe y col., 2003).

La identificación de los microorganismos en los tanques de biooxidación nos ayudaría al establecimiento de procesos más rápidos y eficientes de tratamiento de los minerales así como la posibilidad de identificar genes de respuesta a condiciones extremas como altas temperaturas, concentración de metales, arsénico, valores bajos de pH, etc.

2 Materiales y Métodos

2.1 Muestras biológicas. Cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 obtenida de American Type Culture Collection (ATCC), cepa de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T (ex Markosyan L15^T 1972) proveniente del German National Resource Centre for Biological Material (DSMZ), cepa de *Escherichia coli* DH5 α , que es una cepa ampliamente usada para procesos de transformación bacteriana, cultivo de biorreactor (microorganismos provenientes de los tanques de biooxidación de arsenopirita de la mina de Tamboraque) y cultivo de drenaje ácido de la mina Tamboraque en medio 9K y mantenido en actividad con controles de temperatura, pH, oxígeno disuelto y recambio de sales nutrientes. El medio 9K se obtuvo por disolución de 3.00g 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 en 900 ml de agua ácida pH 2 (esterilización en autoclave a 121°C x 15 min). Para completar el medio, se añade 100ml de solución de sulfato ferroso 1M ajustada a pH 1.8 con ácido sulfúrico (esterilización por filtración con membrana Millipore de nitrocelulosa de 45mm de diámetro, poro 0.2 μ m).

2.2 Extracción de ADN de muestras biológicas. Los microorganismos fueron colectados por centrifugación a 4000 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos, para remover el ión férrico precipitado fueron lavados 3 veces con ácido sulfúrico 10mM y luego fueron resuspendidos en buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8). Se agregó a la suspensión proteinasa K (0.5 mg/ml) y lisozima 1 (mg/ml) y se dejó en incubación a 37°C por 1 hora. Luego, se adicionó NaCl (0.5 M) y SDS (1%) homogenizándose por inversión varias veces. Se añadió cloroformo (1:1 (v/v)), se mezcló por inversión y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos. A la fase acuosa colectada se agregó isopropanol (2:1 (v/v)), y se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos. El ADN obtenido fue resuspendido en 100ul de agua milliQ. La concentración de ADN se realizó por comparación con la intensidad de la banda mayor del marcador λ /HindIII de concentración conocida (50ng/ul) en un gel de agarosa al 1%.

2.3 Diseño de Primers. Los primers específicos para la identificación de *Leptospirillum sp.* por amplificación por PCR fueron diseñados basándose en las secuencias del gen 16S rRNA de *Leptospirillum ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Leptospirillum sp.* y *Acidithiobacillus* reportadas en la base de datos GenBank. Se hicieron alineamientos múltiples que permitieran identificar las regiones conservadas de 16S rRNA entre las especies del género *Leptospirillum* pero diferentes para el resto de acidobacterias (Figura 1) Los primers fueron diseñados a partir de las regiones conservadas con la ayuda de los programas OLIGOTM versión 4.0, OLIGO calculator y MACAW 5.0. Se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos mediante el uso del programa BLAST (Altschul y col. 1997), con el fin de encontrar posibles secuencias homólogas con otros organismos. El primer forward fue pLepf 5'CGTGAAAGGGGAGCAATCCC3' y el primer reverse pLepr 5'GGTTGGGGCACCGACTTCGG 3'.

2.4 Amplificación por PCR del gen 16S rRNA. Para amplificar el gen 16s rRNA de eubacterias se usaron el primer forward p27f 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' (M = A o C) y el primer reverse p1387r 5'GGGCGGWGTGTACAAAGGC 3' donde W= C o T. (Lane, 1991; Rawlings y col, 1999; Coram & Rawlings, 2002). Para Archaeobacterias se empleó el primer forward p20f 5' TCC GGT TGA TCC YGC CRG 3' (Y = T o C y R =A o G) (Orphan y col., 2000) y el reverse p1392Gr 5' GAC GGG CGG TGT GTR C 3' donde R = A o G (Lane, 1991). Para una reacción de 50ul se empleó 100 ng de ADN genómico, buffer de reacción PCR 1X, 2.5mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer, 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 2% de DMSO (v/v) y 1 unidad de TaqPol. Las condiciones de PCR, (Don y col, 1991) fueron: Denaturación a 95°C por 5 minutos seguido por 20 ciclos de amplificación a 95°C por 30 segundos, 57°C (62°C para Archaeas) por 30 segundos (decreciendo 1°C cada dos ciclos) y 72°C por 90 segundos y luego 15 ciclos de amplificación de 95°C por 30 segundos, 47°C (52°C para *Archaeobacteria*) por 30 segundos y 72°C por 90 segundos seguidos por 10 minutos de

incubación a 72°C y un paso final de enfriamiento a 4°C. Para la amplificación del gen 16s rRNA de *Leptospirillum sp* las condiciones de PCR fueron: Desnaturalización a 95°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos de amplificación a 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos, luego 10 minutos de incubación a 72°C y enfriamiento a 4°C.

Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 0.5X. La electroforesis fue realizada en una cámara de electroforesis horizontal (Modelo H5, GIBCO BRL) a 45 V por 45 minutos en presencia de un marcador estándar de peso molecular (λ /Hind III) de concentración conocida. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml.) durante 3 minutos y visualizados en un transiluminador de luz UV (UVP, Modelo TM-20 San Gabriel USA.). Los resultados fueron fotografiados con una cámara digital Kodak Digital Science ID.

2.5 Clonación de los productos de amplificación. Los productos de amplificación del gen 16S rRNA del cultivo del biorreactor y el subcultivo de DAM con primers universales (p27f y p1387r) fueron purificados y ligados en el vector plasmídico pGEM-T (PROMEGA) en una proporción inserto:vector de 6:1. Para la transformación se usó la cepa de *E.coli* DH5 α con una eficiencia de transformación de 1.3×10^6 . Se seleccionaron al azar 50 colonias blancas (colonias que tienen el plásmido recombinante con el inserto) que crecieron sobre las placas LB/Ampicilina de ambas muestras: placa "cultivo del biorreactor" y placa "subcultivo DAM".

2.6 PCR para el análisis de las colonias recombinantes. Para identificar a las colonias recombinantes que contienen el inserto 16S rRNA se amplificó por PCR utilizando los primers M13 F (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC- 3') y M13R (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC- 3') que flanquean el sitio de clonación del plásmido pGEM-T según las recomendaciones del fabricante (PROMEGA, 2005). Para obtener el ADN de cada colonia

seleccionada se tomó 20 μ l de cultivo y se diluyó en 100 μ l de solución estéril de EDTA 10 mM. Se agregó 100 μ l de solución de lisis (NaOH 0.05M y SDS 0.25%) y se dejó en incubación por 5 minutos a 70°C. Para las reacciones de PCR de 20 μ l se utilizaron 5 μ l de cada muestra, 5 pmoles de cada primer, buffer de PCR 1X, 2.5mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP y 1U de Taq polimerasa.

Las condiciones fueron: desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 30 segundos, incubación por 10 minutos a 72°C y un paso final de enfriamiento a 4°C. Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en presencia de un marcador estándar de peso molecular conocido. Un control de autoligamiento (reacción de ligación sin el inserto) del vector fue incluido en el experimento. Las bacterias de las colonias recombinantes que contenían el inserto fueron criopreservadas con glicerol al 15% y colocadas a -70°C.

2.7 Identificación de microorganismos con primers específicos. Para la identificación de microorganismos del género *Acidithiobacillus* presentes en el cultivo del biorreactor y el drenaje ácido de la mina se amplificó por PCR el inserto de cada recombinante, empleando los primers para 16S rRNA de eubacterias (p27f y p1387r) y un primer reverse específico para cada una de las especies de este género comúnmente presentes en este tipo de muestras. Para *Acidithiobacillus ferrooxidans* se utilizó el primer TF539r 5' CAG ACC TAA CGT ACC GCC 3'; para *Acidithiobacillus thiooxidans* el primer ATT223r 5' AGA CGT AGG CTC CTC TTC 3' y para *Acidithiobacillus caldus* el primer THC642r 5' CAT ACT CCA GTC AGC CCG T 3' respectivamente. Cada reacción de 50 μ l consistió de 10 pmoles de cada primer respectivamente, buffer PCR 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 1U de Taq polimerasa y 1 μ l de cada inserto amplificado. Las condiciones de amplificación fueron las descritas para el PCR de eubacterias (Don y col., 1991).

3 Resultados

3.1 Cultivo de los microorganismos. Para aumentar la población bacteriana se hicieron subcultivos a partir del cultivo del drenaje ácido del tanque del proceso a escala de laboratorio de la mina Tamboraque. Cuando el medio a ese pH cambia de coloración de verde claro (Fe^{+2}) a naranja rojizo (Fe^{+3}) es debido a la oxidación del ión ferroso a ión férrico por el metabolismo energético de las bacterias y por tanto es el indicador de crecimiento bacteriano (Colmer y col, 1950; Hoffmann, 1981; Bond y col, 2000; Rawlings, 2002). Las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 y *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T se adaptaron 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.

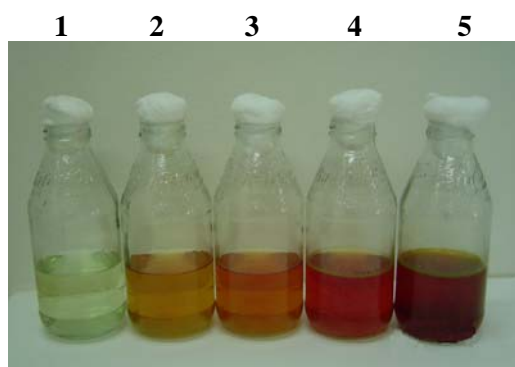


Figura 1. Cultivo de microorganismos biooxidantes de hierro. **1.** Control **2.** Cultivo de 2 días **3.** Cultivo de 3 días **4.** Cultivo de 4 días **5** Cultivo de 6 días.

3.2 Amplificación por PCR del gen 16S rRNA. Las condiciones óptimas para la amplificación del gen 16S rRNA de los microorganismos presentes en los subcultivos de DAM de Tamboraque y del cultivo del biorreactor con cada par de primers (p27f y p1387r; pArch20f y 1392Gr; pLepf y pLepr) fueron establecidas. El producto de amplificación visualizado en el gel de agarosa al 1% fue de aproximadamente 1.5 Kpb en conformidad con el tamaño del gen del 16S rRNA bacteriano. Todas las fotos de geles de electroforesis son mostradas en negativo para un mejor contraste de las bandas.

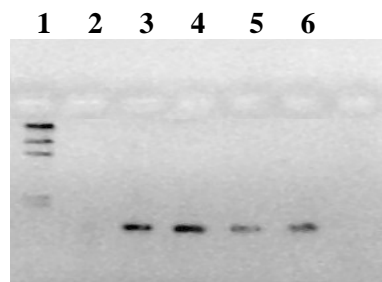


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1% de amplificadas del 16S rRNA de microorganismos biooxidantes. Buffer TBE 0.5X , 40V, 40min. **1.** Marcador λ /HindIII(50 ng/ul) **2** control negativo de reacción (sin muestra), **3.** subcultivo de DAM Tamboraque, **4.** cultivo de biorreactor, **5.** *L. ferrooxidans* DSM 2705^T (control positivo), **6.** *A. ferrooxidans* ATCC 19859 (control positivo).

En las reacciones de PCR empleando los primers específicos para *Leptospirillum* diseñados previamente (Figura 6) hubo producto de amplificación tanto en el subcultivo DAM como en cultivo del biorreactor lo que evidencia la presencia de este género en las muestras.

Para probar la especificidad de los primers se uso como control negativo el ADN genómico de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

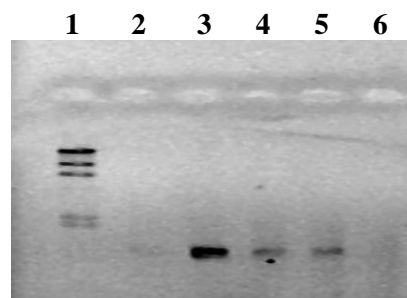


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1% de amplificadas del 16S rRNA con primers pLepf y pLepr. Buffer TBE 0.5X , 40V, 50min. **1.** Marcador λ /HindIII (50 ng/ul), **2.** *A. ferrooxidans* ATCC 19859 (control negativo), **3.** *L. ferrooxidans* DSM 2705^T (control positivo), **4.** cultivo de biorreactor, **5.** cultivo de DAM Tamboraque, **6.** control negativo de reacción (sin muestra)

En el caso de las reacciones con primers para identificación de *Archaeobacteria* hubo producto solo en la muestra del cultivo del biorreactor. Los ADN genómicos de *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* fueron empleados como controles negativos.

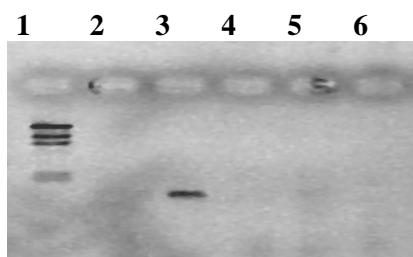


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% de amplificados del 16S rRNA con primers pArch20f y 1392Gr. Buffer TBE 0.5X, 40V, 45min. **1.** Marcador λ /HindIII (50 ng/ul), **2.** control negativo de reacción (sin muestra), **3.** cultivo de biorreactor, **4** cultivo de DAM Tamboraque, **5.** *A. ferrooxidans* ATCC 19859 (control negativo), **6.** *L. ferrooxidans* DSM 2705^T (control negativo).

3.3 Selección de Recombinantes. Según el reconocimiento de colonias por amplificación del inserto con los primers M13F y M13R, en la placa “cultivo del biorreactor” de 50 colonias blancas analizadas, solo 11 tenían el plásmido con el inserto (recombinantes) y en el caso de la placa “subcultivo DAM” solamente 7 colonias lo tenían.

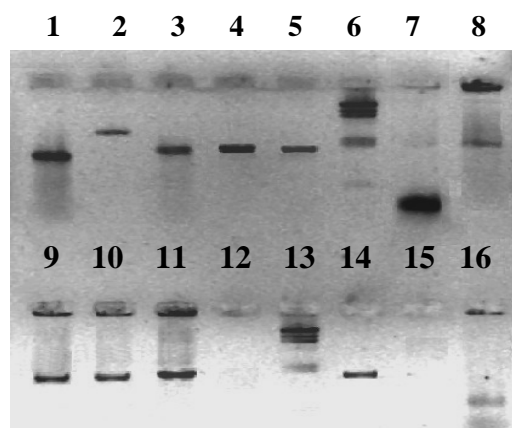


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los amplificados de los recombinantes con primers M13F y M13R. Buffer TBE 0.5X, 40V, 45min. **1.** Amplificado 16S rRNA de cultivo biorreactor (sin ligar en pGEM-T), **2.** pGEM.T, **3,4 y 5.** Recombinantes de biorreactor, **6 y 13.** Marcador λ /HindIII (50 ng/ul), **7.** Plásmido autoligado (control de fondo ligación), **8.** Recombinante de *A. ferrooxidans* ATCC 19859, **9,10 y 11.** Recombinantes de DAM Tamboraque, **12.-, 14.** Recombinante de *L. ferrooxidans* DSM 2705^T **15.** control negativo de reacción (sin muestra), **16.** control positivo de ligación.

3.4 Identificación de Acidithiobacillus por PCR con primers específicos. Los productos de amplificación de los plásmidos con inserto fueron seleccionados para verificar por PCR que el inserto fuera un amplificado 16S rRNA bacteriano e identificar a que género pertenece. Para ello, se hicieron reacciones de PCR usando como ADN molde todos los amplificados seleccionados y los primers universales 27f, 1387r y un primer reverse específico para cada especie de *Acidithiobacillus*: *A. ferrooxidans* (TF539r), *A. thiooxidans* (ATT223r) y *A. caldus* (THC642r) respectivamente. Los productos obtenidos a partir de los amplificados ensayados con el primer TF539r fueron dos bandas una de aprox. 1500 pb (tamaño correspondiente al gen 16S rRNA) y otra de 550 pb. aproximadamente (correspondiente al fragmento amplificado por 27f y Tf539) en 2 recombinantes del DAM y en 3 del biorreactor. Con el primer ATT223 en todas las reacciones se visualizó solo la banda de aproximadamente 1500 pb. y no la banda de aproximadamente 250 pb esperada si el amplificado correspondía al 16S rRNA de *A. thiooxidans*. En el caso de las reacciones con el primer THC642, se observaron dos bandas de aproximadamente 1500pb y 500pb en uno de los recombinantes del DAM y dos en los recombinantes del biorreactor. Conociendo la presencia de *Leptospirillum* en las muestras, los productos seleccionados se amplificaron usando los primers LepF y LepR. Hubo un producto de amplificación de aproximadamente 1500 pb. en dos reacciones tanto en los recombinantes de DAM como en los del biorreactor.

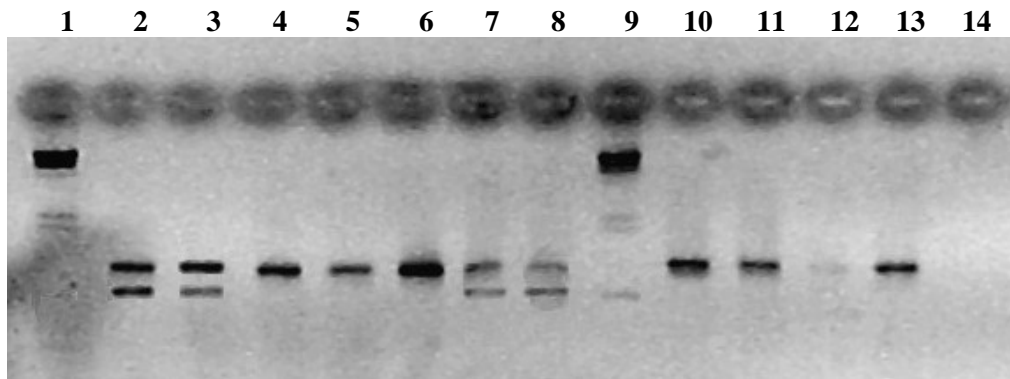


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1% de amplificados de los recombinantes con primers específicos. Buffer TBE 0.5X, 40V, 45min. **1y 9.** Marcador λ /HindIII (50 ng/ μ l), **2.** De DAM con TF539, **3.** De biorreactor con TF539, **4.** De DAM con ATT223, **5.** De biorreactor con ATT223 **6.** Amplificado 16S rRNA de biorreactor (sin ligar a pGEM-T), **7.** De DAM con THC642, **8.** De biorreactor con THC642, **10.** De DAM con LepF y LepR, **11.** De biorreactor con LepF y LepR, **12.** Amplificado 16S rRNA de DAM (sin ligar a pGEM-T) con Arch20f y 1392Gr. **13.** Amplificado 16S rRNA de biorreactor (sin ligar a pGEM-T) con Arch20f y 1392Gr **14.** Control negativo de reacción (sin muestra).

4 Discusión

A pesar del rol beneficioso que cumplen los microorganismos en la recuperación de metales desde concentrados minerales, se han realizado relativamente pocos estudios en la composición de poblaciones bacterianas en operaciones comerciales de biolixiviación de minerales (Norris y col, 2000). Esto se debe a la escasa cantidad de métodos apropiados y exactos para analizar las poblaciones de bacterias (en algunos casos *extremófilas*) que actúan en ambientes ácidos, de temperaturas elevadas y ricos en metales.

En los últimos años el uso de las técnicas de biología molecular (librerías genómicas construidas a partir de ADN extraído, análisis del ADN ribosómico amplificado, hibridización *in situ* por fluorescencia (FISH), etc.) ha ayudado en la identificación de estos microorganismos (Goebel & Stackebrandt, 1994; Rawlings y col, 1999; Foucher y col, 2003; Okibe y col, 2003), ya que estas técnicas tienen el potencial de analizar la diversidad microbiana cuando las técnicas de cultivo puro son limitadas (Giovannoni y col., 1990; Amann y col, 1991,1995; Spring y col., 1992). Sin embargo, estas técnicas también tienen algunos posibles inconvenientes como la difícil extracción de ADN que puede conllevar a datos no cuantitativos y limitaciones para detectar algunos microorganismos en conjunto, sobretodo los que se encuentran en menor cantidad. Otro inconveniente es que, finalmente, los

microorganismos indígenas no pueden ser aislados.

En el presente trabajo, se realizó la identificación de los microorganismos acidófilos que participan en la biooxidación de fierro o sulfuros en un tanque industrial de biooxidación de arsenopirita para la recuperación de oro siendo *Acidithiobacillus ferrooxidans* el que se encuentra en mayor proporción seguido de *Leptospirillum sp.* y la bacteria similar a *Acidithiobacillus caldus*. La arqueobacteria comúnmente presente en tanques de biooxidación a temperatura entre 36- 40°C es *Ferroplasma* (Rawlings, 2005) por lo que es posible que sea ésta la que esté presente en el cultivo del biorreactor; sin embargo, se necesita hacer más análisis al respecto. En un trabajo preliminar se hizo un reconocimiento microbiológico que nos dio un panorama general en la observación microscópica tanto en el microscopio óptico como en el microscopio electrónico de barrido. Se distinguieron microorganismos con forma bacilar (varas largas o cortas) similar a la morfología de las bacterias del género *Acidithiobacillus* (Tuovinen & Kelly, 1972; Duquesne y col, 2003) y también microorganismos de forma espiral o curva como las bacterias del género *Leptospirillum* (Markosyan, 1972; Goebel & Stackebrandt, 1994 (I); Johnson, 2001; Coram & Rawlings, 2002). Además, estos microorganismos al ser coloreados con el método Gram (Bartholomew & Finkelstein, 1958) fueron distinguidos como bacterias Gram negativas, lo que respalda nuestro primer

reconocimiento de la presencia de *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* en las muestras dado que son los principales y mas importantes géneros bacterianos Gram negativos en procesos de biooxidación industrial (Foucher y col, 2003; Coram & Rawlings, 2002; Goebel & Stackebrandt, 1994 (I); Hallberg & Lindström, 1994).

La técnica FISH está siendo ensayada no sólo para una identificación más completa que respalde nuestros resultados, sino también, para la cuantificación de poblaciones microbianas, lo que nos permitiría hacer las correlaciones entre los componentes de la comunidad, las relaciones espaciales de los diferentes miembros y determinar *in situ* la función que cada una de las poblaciones puede tener.

5 Conclusiones

- La identificación de microorganismos por amplificación por PCR del gen 16S rRNA es posible sin el aislamiento de tales microorganismos aun cuando tenga algunas limitaciones. Así, la extracción de ADN en cantidad y calidad suficiente a partir de cultivos mixtos es un proceso crítico para determinar la presencia de los microorganismos en la muestra.

- Los microorganismos reconocidos en el cultivo de drenaje ácido de la mina Tamboraque fueron: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum sp.* y bacterias similares a *Acidithiobacillus caldus* mientras que en el cultivo del biorreactor fueron: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum sp.*, bacterias similares a *Acidithiobacillus caldus* y *Archaeobacteria* (posiblemente *Ferroplasma*).

- La técnica de amplificación por PCR del gen 16S rRNA nos permite solo la identificación de los microorganismos mas no su cuantificación por lo que la estandarización de la técnica de hibridización *in situ* por fluorescencia y su aplicación nos permitirá no solo una identificación más completa (y respaldar o ampliar nuestros resultados) sino también la cuantificación de los microorganismos, lo que nos permitiría hacer la dinámica de las poblaciones en procesos industriales de biooxidación.

6 Referencias bibliográficas

- [1] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3389-3402.
- [2] Amann RI, Springer N, Ludwig W, Schleifer KH, Peterson N. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature.* 1991; 351: 161-164.
- [3] Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews.* 1995; 59(1): 143-169.
- [4] Bartholomew JW, Finkelstein H. Relationship of cell wall staining to gram differentiation. *J. Bacteriology.* 1958; 75: 77-84
- [5] Bond P, Smeriga S, Banfield J. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Applied and Environmental Microbiology.* 2000; 66(9): 3842-3849.
- [6] Colmer A, Temple K, Hinkle M. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.* 1950; 59(3): 317-328.
- [7] Coram NJ, Rawlings DE. 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.* 2002; 60(2): 838-845
- [8] Devasia P, Natarajan KA. Bacterial Leaching: Biotechnology in the Mining Industry. *Resonance.* 2004 Agosto; 8: 27-34
- [9] Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research.* 1991; 19: 4008-4008
- [10] Duquesne K, Lebrun S, Casiot C, Bruneel O, Personné JC, Leblanc M, Elbaz-Poulichet F, Morin G, Bonnefoy V.

- Immobilization of Arsenite and Ferric Iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and Its Relevance to Acid Mine Drainage. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(10): 6165-6173.
- [11] Foucher S, Battaglia-Brunet F, d'Hugues P, Clarens M, Godon JJ, Morin D. Evolution of the bacterial population during the batch bioleaching of a cobaltiferous pyrite in a suspended-solid bubble column and comparison with a mechanically agitated reactor. *Hydrometallurgy.* 2003; 71: 5-12.
- [12] Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature.* 1990; 345:60-63.
- [13] Goebel BM, Stackebrandt E. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60: 1614-1621. (I)
- [14] Goebel BM, Stackebrandt E. The biotechnological importance of molecular biodiversity studies for metal bioleaching. *FEMS Symp.* 1994; 75: 259-273.
- [15] Hallberg KB, Lindström EB. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology.* 1994; 140: 3451-3456.
- [16] Hoffmann MR. Kinetics of the removal of iron pyrite from coal by microbial catalysis. *Applied and Environmental Microbiology.* 1981; 42: 259-271.
- [17] Johnson D. Genus II *Leptospirillum* Hippe 2000 (ex Markosyan 1972, 26). En G. Garrity (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology I*: 453-457. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 2001.
- [18] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. En E. Stackebrandt y M. Goodfellow (ed), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* New York: Wiley; 1991. p. 115-175.
- [19] Markosyan GE. A new iron-oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans* nov. gen. nov. sp. *Biol J Armenia.* 1972; 25: 26-29 (in Russian).
- [20] Mishra D, Kim DJ, Anh JG, Lee JC. Bacterial Leaching of Metals from Sulfide Minerals and Industrial Wastes. *KIGAM Bulletin.* 2005; 9(1): 48-57.
- [21] Morin D. Bioextraction and biodeterioration of metals. Gaylade, C. C. y Videla, H.A. (eds.) Oxford: Cambridge university Press, 1995.
- [22] Norris PR, Burton NP, Foulis NAM. Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles.* 2000; 4: 71-76.
- [23] Okibe N, Gericke M, Hallberg K, Johnson B. Enumeration and Characterization of Acidophilic Microorganisms Isolated from a Pilot Plant Stirred-Tank Bioleaching Operation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(4) :1936-1943.
- [24] Olson GJ, Brierley JA, Brierley CL. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of the microbial processes by the mineral industries. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 63: 249-257.
- [25] Orphan VJ, Taylor LT, Hafenbradl D, DeLong EF. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66: 700-711.
- [26] PROMEGA. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual. Instructions for use of products A1360, A1380, A3600 and A3610. Ed. Titus, D. PROMEGA CORPORATION, USA; 2005.
- [27] Rawlings DE. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories.* 2005; 4: 13.
- [28] Rawlings DE. Heavy metal mining using microbes. *Ann Rev Microbiol.* 2002; 56: 65-91.
- [29] Rawlings DE, Tributsch H, Hansford GS. 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.* 1999; 145: 5-13.

- [30] Rawlings DE, Coram NJ, *et al.* *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates. En: Amils R, Ballester A. ed. Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century 9A. Amsterdam: Elsevier; (I) 1999. p. 777-786.
- [31] Spring S, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH, Peterson N. Phylogenetic diversity and identification of

nonculturable magnetotactic bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 1992; 15: 116-122.

- [32] Tuovinen OH, Kelly DP. Recommendation that the names *Ferrobacillus ferrooxidans* Leathen and Braley and *Ferrobacillus sulfooxidans* recognized as synonyms of *Thiobacillus ferrooxidans* Temple and Colmer. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1972; 22: 170-172.

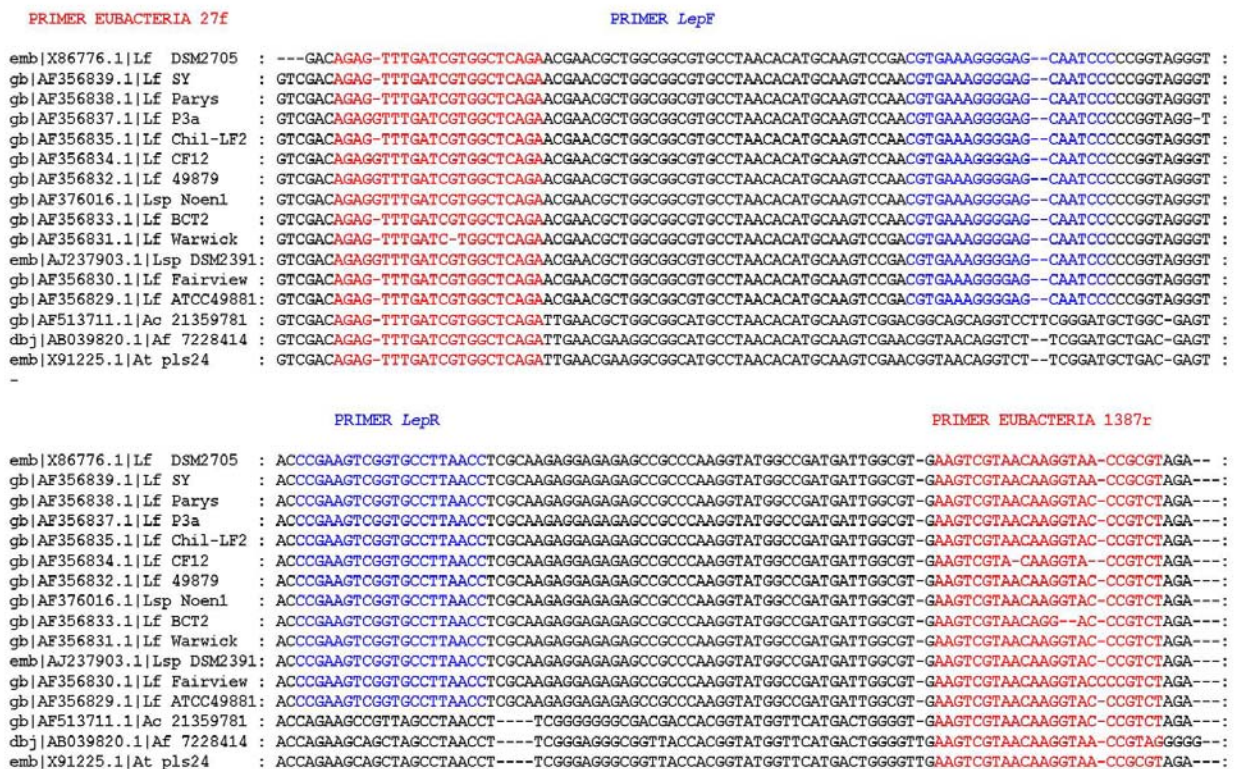


Figura 7. Alineamiento múltiple de secuencias del 16s rRNA de *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*.