

DIVERSIDAD DE LOS MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFICOS
PRESENTES EN SISTEMAS DE BIOLIXIVIACION

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

LUZ MONICA VASQUEZ PEREZ

Julio, 1997



Director de Tesis: Dr. Romilio Espejo T.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

LUZ MONICA VASQUEZ PEREZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor e Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 16, de Abril de 1997.

Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo T.

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Davor Cotorás



Dr. David Holmes



Dr. Carlos Jerez



Dr. Manuel Rodriguez





A mis padres

A Daniel

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

- Dr. Romilio Espejo T., por su apoyo y crítica permanente lo que me permitió una constante superación.

-Dr. Kenneth Timmis, Director de la División de Microbiología de la GBF (Braunschweig) por aceptarme en su Laboratorio, en una estadía de investigación.

-Dr. Michail Yakimov, y en especial al Dr. Edward Moore por su valiosa colaboración en la secuenciación de diferentes muestras, lo que aceleró la finalización de esta Tesis.

-Dr. José Pizarro y Sr. Jaime Romero por su constante apoyo y colaboración.

-A todo el personal de los laboratorios de Virología de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile y de SMP- Tecnología, por su apoyo y amistad.

-A todos los que colaboraron y apoyaron la realización de esta Tesis.

INDICE DE MATERIAS

	página
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE MATERIAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA.....	xvi
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY.....	xxi
INTRODUCCION.....	1
1. La biolixiviación de minerales sulfurados.....	1
2. Microorganismos presentes en los sistemas de biolixiviación.....	6
3. Estudios de la microflora presente en sistemas de	

biolixiviación.....	9
3.1 Diversidad de los microorganismos prevalentes en sistemas de biolixiviación....	9
3.2 Análisis directo de la población bacteriana.....	14
4. Determinación de la complejidad de la población bacteriana presentes en distintos ecosistemas.....	16
5. Microflora en distintas condiciones de acidez.....	22
6. Archaea en biolixiviación.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	27
Cepas y aislados de referencia.....	27
Cultivo de cepas de referencia.....	27
Cuantificación bacteriana.....	28
Biolixiviación en columnas.....	29
Inóculos utilizados.....	29
Extracción de ADN.....	30
Amplificación por PCR.....	31
Electroforesis en gel.....	34
Secuenciación.....	34
Análisis de secuencia.....	35
Marcación de 16S ADNr con ATP- α P ³²	35
Formación de heteroduplex entre amplificados del 16S ADNr.....	36
Determinación de la resistencia bacteriana a la acidez del medio.....	36

Determinación del consumo de oxígeno.....	37
RESULTADOS.....	38
1. Selección de la población bacteriana presente en minerales lixiviados, después del cultivo en el laboratorio.....	38
1.1 Selección de bacterias capaces de crecer en alta concentración de ácido sulfúrico.....	38
1.1.2. Composición de la población bacteriana en mineral lixiviado con alta concentración de ácido (30 g/L de ácido sulfúrico), y en posteriores subcultivos en matraz.....	40
1.2 Composición de la población bacteriana en la solución lixivante (Refino) de la planta de producción de cobre "Lo Aguirre", y posteriores subcultivos en matraz.....	44
1.3 Composición de la población bacteriana en mineral lixiviado sin ion ferroso, y en posteriores subcultivos en matraz.....	47
2. Aislamiento y caracterización genética y fenotípica de una bacteria, presente en minerales de cobre lixiviados con una alta concentración de ácido sulfúrico.....	51
2.1 Selección en cultivo, de una bacteria capaz de crecer en alta concentración de ácido.....	51

2.2	Propiedades fenotípicas y genotípicas del aislado bacteriano, THA, capaz de crecer en azufre con alta concentración de ácido sulfúrico.....	55
2.2.1	Caracterización genética de THA.....	55
2.2.2	Caracterización fenotípica de THA.....	60
3.	Estimación de la heterogeneidad de una población bacteriana, por la formación de heteroduplex entre los productos de amplificación del 16S ADNr.....	64
3.1	Porcentaje de homología y retardo en la migración electroforética de los heteroduplex de 16S ADNr....	64
4.	Determinación de la presencia de Archaea en sistemas de biolixiviación.....	67
4.1	Detección preliminar de archaea en la solución de lixiviación de la planta de extracción de cobre "Lo Aguirre".....	67
4.1.2.	Secuenciación del 16S ADNr amplificado, de la población de archaea presente en Refino de planta.....	68
4.2.	Especificidad de los partidores utilizados en la detección de Archaea.....	69
4.3.	Cultivo y selección de la población de Archaea originalmente presente en mineral.....	71
4.4.	Detección de Archaea en mineral lixiviado con refino de planta.....	73

4.5 Homogeneidad de la población de archaea presente en mineral.....	76
4.5.1. Formación de heteroduplex entre el amplificado del 16S ADNr de <i>S. acidocaldarius</i> , marcado radiactivamente y amplificados del 16S ADNr de mineral y cultivos.....	79
4.6 Secuenciación del 16S ADNr, amplificado con partidores específicos para archaea, desde ADN obtenido de mineral y cultivo en ion ferroso..	81
4.7 Relaciones filogenéticas entre el archaeon Aglo 120, aún no identificado, y las archaea ya descritas.....	83
DISCUSIÓN.....	85
1. Selección de las poblaciones bacterianas presentes en sistemas de lixiviación.....	86
2. Crecimiento bacteriano en alta concentración de ácido sulfúrico.....	92
2.1 Aislamiento de una bacteria de alta resistencia al ácido.....	95
3. Evaluación de la heterogeneidad de una población mediante el método de formación de heteroduplex...	100
4. Archaea en un proceso comercial de biolixiviación de cobre.....	103
CONCLUSIONES.....	111

BIBLIOGRAFÍA.....114

LISTA DE TABLAS

página

Tabla 1. Partidores utilizados en la amplificación
de zonas del locus ribosomal.....34

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Cobre lixiviado y producción de ion férico en columnas de mineral aglomerado, lixiviadas con medio MS9b y 0.6 N de ácido sulfúrico.....	40
Figura 2. Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ribosomales del ADN extraído de diferentes muestras.....	42
Figura 3. Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, del ADN extraído de diferentes muestras.....	45
Figura 4. Patrón de los fragmentos de restricción obtenidos con Cfo I de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, procedentes de diferentes muestras.....	47
Figura 5. Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, de ADN extraído de diferentes muestras.....	48

Figura 6. Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, de ADN extraído de diferentes muestras.....	50
Figura 7. Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, de ADN extraído de diferentes muestras.....	52
Figura 8. Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, de ADN extraído de diferentes muestras.....	53
Figura 9. Secuencia del 16S ADNr del aislado THA.....	56
Figura 10. Alineamiento de las secuencias de las regiones intergénicas de los genes ribosomales 16S y 23S, de THA, <i>T. thiooxidans</i> DSM 504 (TTDSM504) y <i>T. ferrooxidans</i> A4 (TF A4).....	58
Figura 11. Representación esquemática de la similaridad de secuencia entre las	

regiones intergénicas del 16S y 23S ARNr de las siguientes bacterias:.....	59
Figura 12.Crecimiento de THA y <i>T. thiooxidans</i> ATCC 19377 en medio salino MS9b con azufre elemental a concentraciones crecientes de ácido sulfúrico.....	61
Figura 13.Electroforesis en gel de poliacrilamida de los homoduplex y heteroduplex formados entre los productos de amplificación del 16S ADNr de bacterias.....	66
Figura 14.Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación por PCR del 16S ADNr, usando los partidores 23F y 1392R.....	68
Figura 15.Secuencia parcial del producto de amplificación de 1400pb, obtenido con los partidores 23F y 1392R a partir del ADN total del sexto subcultivo de Refino de la planta "Lo Aguirre".....	69
Figura 16.Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación por PCR del 16S ADNr de bacterias y de archaea.....	71

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación por PCR del 16S ADNr, a partir del ADN extraído de mineral, bacterias y archaea.....	74
Figura 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida, teñido con nitrato de plata, de los productos de amplificación por PCR (utilizando los partidores F23 y R958) del 16S ARNr de los ADNs extraídos de diferentes muestras.....	75
Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación del 16S ADNr de archaea procedentes de mineral lixiviado y de cultivos, solo o en combinación con <i>S. acidocaldarius</i> , después de desnaturalización y renaturalización.....	78
Figura 20. Hibridización de 16S ADNr de <i>S. acidocaldarius</i> marcado radiactivamente con 16S ADNr amplificado de mineral y cultivos.....	80
Figura 21.A. Secuencia parcial del 16S ADNr	

amplificado desde ADN de mineral lixiviado
con refino de planta. B. Especies cuyo
16S ADNr tiene mayor relación con la
secuencia determinada (915 posiciones) y
los porcentajes de homología respectivos...82

Figura 22. Dendograma de las relaciones
filogenéticas estimadas del archaeon
Aglo 120.....84

ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS

ATCC: Colección americana de microorganismos y células de cultivo.

DSM: Colección Alemana de microorganismos y células de cultivo.

Fe(II): ión ferroso

x g: fuerza de gravedad.

p/v: peso/volumen.

pb: pares de bases

PCR: Reacción de polimerasa en cadena.

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SMP: Sociedad Minera Pudahuel.

SX: Extracción por solvente.

tARN-ala: Ácido ribonucleico de transferencia de alanina.

tARN-ile: Ácido ribonucleico de transferencia de isoleucina.

MS9b: Medio Mínimo salino.

TE: Tris-EDTA

RDP: Ribosomal Data Projects

EMBL: Laboratorio de Biología Molecular Europeo.

rpm: revoluciones por minuto.

BTL: Bacterial Thin Layer.

Taq: Polimerasa de *Thermus aquaticus*.

RESUMEN

La biolixiviación de cobre consiste en el aumento de la oxidación de sulfuros de cobre por bacterias quimiolitotróficas. En esta tesis se trata la biodiversidad de los microorganismos en sistemas de biolixiviación de cobre.

El trabajo descrito en esta tesis fue dividido en cuatro grandes áreas: a) descripción de la selección que ocurre después de cultivar las bacterias presentes en mineral lixiviado o en efluentes de la mina; b) caracterización genética y fenotípica de una bacteria aislada, capaz de crecer en minerales lixiviados con una inusualmente alta concentración de ácido sulfúrico; c) desarrollo de un método para calcular heterogeneidad de una población bacteriana y grado de similaridad genética, basada en la formación de heteroduplexes del 16S ADN_r amplificado por PCR; d) descubrimiento de un nuevo archaeon en un proceso comercial de extracción de cobre.

La primera sección describe los resultados del estudio de las poblaciones bacterianas prevalentes en tres condiciones de biolixiviación diferentes y la selección obtenida después del cultivo. Las muestras estudiadas

fueron: columnas de mineral aglomerado, lixiviadas con distintas soluciones (medio mínimo pH 1,8 y medio mínimo pH 0,6; con baja concentración de ion ferroso); y solución de lixiviación de una planta comercial de cobre. En cada caso, fue determinada la composición de la población bacteriana en la muestra original y después del cultivo. La estimación fue realizada por determinación del patrón de tamaño del espaciador 16S-23S ADN_r obtenido después de la amplificación por PCR. El tamaño del espaciador puede ser preliminarmente relacionado con especies bacterianas determinadas. En cada caso el patrón de espaciadores de la población bacteriana original fue diferente a aquella obtenida después de cultivo. En algunos casos, los espaciadores observados después del cultivo no han sido detectados en la muestra original. Cambios en el patrón de espaciadores fue también observado a diferentes tiempos de incubación en un mismo cultivo en matraz.

La segunda sección describe el aislamiento y la caracterización de una bacteria con un espaciador diferente al de las especies bacterianas típicamente encontradas en sistemas de biolixiviación. Esta bacteria fue encontrada cuando se lixivió a concentraciones altas de ácido sulfúrico. De acuerdo a los espaciadores observados, la comunidad bacteriana en esta condición estaba compuesta por

T. thiooxidans, "*L. ferrooxidans*". La secuencia nucleotídica del 16S ADNr de esta bacteria, nombrada THA, mostró una alta homología con cepas de *T. thiooxidans* (99.85%). Esta fue también fenotípicamente indistinguible de *T. thiooxidans*, aunque fue más resistente al ácido que la cepa de *T. thiooxidans* ATCC 19377. El espaciador 16S-23S fue sin embargo 10 pb más largo y contenía una región central altamente heteróloga respecto a las cepas de *T. ferrooxidans* A4 y *T. thiooxidans* DSM 504, cuya secuencia nucleotídica es conocida.

La tercera área describe el desarrollo de un método para determinar el grado de heterogeneidad entre amplificadores del 16S ADNr. Este método es simple, rápido de hacer y no requiere clonamiento. Está basado sobre la diferencia en la movilidad electroforética de los heteroduplexes formados después de desnaturalización y renaturalización del producto de amplificación del 16S ADNr. La movilidad electroforética de los heteroduplexes disminuye con el grado de disimilaridad. Este método permite estimar el polimorfismo de secuencia y también las relaciones filogenéticas.

Para ampliar el estudio de las comunidades bacterianas, fue explorada la potencial presencia de Archaea, previamente llamadas archaeobacterias. Este estudio

conforma la cuarta y última sección. Un archaeon fue encontrado en la solución de lixiviación de la planta comercial "Lo Aguirre" y también en mineral experimentalmente lixiviado con esta solución. Esta solución de lixiviación contiene una concentración de ion sulfato entre 120 a 150 g/L. El archaeon fue detectado por amplificación del ADN con partidores específicos para el 16S ADNr de archaea. El método de formación de heteroduplex descrito anteriormente permitió determinar que el amplificado fue homogéneo en secuencia y que esta fue muy diferente a la de *S. acidocaldarius*. Secuenciación directa del 16S ADNr amplificado indicó que el archaeon encontrado correspondería a una nueva especie dentro de un nuevo genero y familia del orden *Thermoplasmales*. Este archaeon fue también detectado en cultivos que contienen ferroso, azufre elemental o calcopirita como fuente de energía. Por nuestro conocimiento, esta es la primera descripción de un archaeon en un proceso comercial de biolixiviación de cobre.

SUMMARY

Copper bioleaching consists in the enhanced oxidation of copper sulfides by chemolithotrophic bacteria. This thesis it is about the biodiversity of microorganisms in copper bioleaching systems.

The research described in this thesis was divided into four main sections : a) Description of the selection occurring upon culturing the bacteria present in leached mineral or in the mine effluents; b) Genetic and phenotypic characterization of a bacterial isolate able to grow in minerals leached with an unusually high concentration of sulfuric acid; c) Development of a method to assess heterogeneity of a bacterial population and degree of genetic similarity, based on the formation of heteroduplexes by the PCR amplified 16S rDNA; d) Discovery of an new archaeon in a commercial copper bioleaching process.

The first section describes the results of the study of the prevailing bacterial population in three different bioleaching conditions and the selection obtained after cultivation. The samples studied, were: (i) columns of agglomerated ore, leached with different solutions (minimal

medium pH 1.8 and minimal medium pH 0.6; with low concentration of ferrous iron); (ii) leaching solution of a copper commercial plant. In each case the bacteria present in the original sample and after cultivation were assessed. The assessment was performed by determination of the size pattern of the 16-23S rDNA spacers obtained after PCR amplification. The size of the spacer can be preliminary related to bacterial species. In each case the spacer pattern of the original bacterial population was different to that of the population obtained after cultivation. In some examples, the spacers observed after cultivation were not detected in the original sample. Changes in the spacer pattern were also observed at different time of incubation in a same culture flask.

The second section describes the isolation and characterization of a bacteria with a 16-23S spacer different to those of the bacterial species commonly found in bioleaching systems. This bacteria was found when leaching at high sulfuric acid concentration. According to the observed spacers, the bacterial community in this condition was composed of *T. thiooxidans*, and "*L. ferrooxidans*" species. The nucleotide sequence of the 16S rDNA of this bacteria, named THA, showed a high homology with a strains of *T. thiooxidans* (99.85%). It was also

phenotypically indistinguishable from *T. thiooxidans*, though it was more acid resistant than the *T. thiooxidans* ATCC 19377 strain. The 16-23S rDNA spacer was however 10 bp larger and contained a center region different from to the strains of *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* whose nucleotide sequence is known.

The third section describes the development of a method to determine the degree of heterogeneity among amplicons of the 16S rDNA. This method is simple, rapid and does not require cloning. It is based on the different electrophoretic mobility of the heteroduplexes formed after denaturation and renaturation of the 16S rDNA amplification product. The electrophoretic mobility of the heteroduplexes decreases with an increasing degree of dissimilarity. This method permits the assesment of both sequence polymorphism and also the phylogenetic relationship.

To extend the study of the bacterial community the potential presence of archaea, previously called, archaebacteria, was explored. This study represents the fourth and last section. An archaeon was found in the leaching solution of the commercial plant "Lo Aguirre" and also in mineral experimentally leached with this solution. This leaching solution contains a sulfate ion concentration between 120 to 150 g/L. The archaeon was detected by

amplification of the DNA with primers specific for the 16S rDNA of archaea. The heteroduplex formation method described above allowed to determine that the amplicon was homogeneous in sequence and that this was very different to that of *S. acidocaldarius*. Direct sequencing of the amplified 16S rRNA indicated that the archaeon found would correspond to a new species within a new genus and family of the order *Thermoplasmales*. This archaeon was also detected in cultures containing ferrous iron, elemental sulfur or chalcopyrite as energy source. To our knowledge, this is the first description of an archaeon in a commercial copper bioleaching process.

INTRODUCCIÓN

1. La biolixiviación de minerales sulfurados.

La biolixiviación es un proceso biológico de aplicación industrial creciente en la minería del cobre. Por medio de él, es posible obtener cobre soluble desde el estado de sulfuros secundarios (CuS y Cu_2S , covelina y calcosina respectivamente), por el aumento de la oxidación química natural producida por la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el mineral. Estimativamente, el 10% del cobre producido por Estados Unidos es obtenido con este sistema, y se prevé que su utilización aumentará notablemente en el futuro. Esto se debe a que es un proceso industrial que tiene un menor costo de producción que los métodos pirometalúrgicos convencionales y porque además provoca una menor contaminación del medio ambiente, ya que no produce relaves ni humos de fundición (Rossi, 1990).

En la actualidad se aplican varias técnicas de biolixiviación a escala comercial. Las principales son: la lixiviación *in situ*, lixiviación en pilas, lixiviación en vertederos, lixiviación en estanques, lixiviación por agitación y lixiviación en reactores o quimiostatos. En

general, las operaciones de lixiviación en vertederos y pilas se hacen con material de deshecho de las minas, que tiene un bajo porcentaje de mineral. La lixiviación en pilas, estanques y por agitación pueden aplicarse a minerales de alta ley. La lixiviación en reactores se aplica exclusivamente en la extracción de metales usando concentrados del mineral (Rossi, 1990).

En nuestro país, la Sociedad Minera Pudahuel (SMP), en su mina Lo Aguirre, obtiene casi la totalidad del cobre que produce utilizando un proceso de lixiviación bacteriana en pilas de mineral aglomerado, denominado proceso BTL (Bacterial Thin Layer). Los progresos en la optimización de este proceso permitieron que en los últimos años comenzaran a funcionar nuevas minas que utilizan esta tecnología: Quebrada Blanca y Cerro Colorado (I Región). La producción en conjunto, de estas minas, es de aproximadamente 100.000 toneladas por año, de cobre catódico de alta pureza.

El proceso de biolixiviación BTL, se inicia con el chancado del mineral a lixiviar hasta un tamaño de 0.5 cm, aproximadamente. Luego, el mineral se mezcla con una solución diluida de ácido sulfúrico, que va a permitir que las partículas pequeñas de mineral que se han formado por efecto de la molienda, se unan a las partículas más grandes, formando agregados en los cuales en el centro se ubican las

partículas grandes de mineral y sobre éstas se ubican los trozos más pequeños, conformando lo que se denomina "mineral aglomerado" ó simplemente "aglomerado". Posteriormente, el mineral aglomerado se deposita en pilas de 3 a 6 metros de altura, las cuales se riegan uniformemente con una solución diluida de ácido sulfúrico, sin llegar a inundar la pila.

A medida que la solución lixiviante pasa a través de la pila, el cobre solubilizado desde el mineral aglomerado pasa a la solución lixiviante. En el fondo de la pila, la solución lixiviante fluye, a través de conductos hacia una etapa de recuperación mediante el proceso denominado extracción por solventes (SX), donde se extrae el metal, separándolo de otros elementos contenidos en la solución de lixiviación, obteniéndose así una solución purificada de sulfato de cobre. Luego, esta solución concentrada de cobre pasa a la etapa de electroobtención, en la cual por precipitación electroquímica, se extrae finalmente el cobre bajo la forma de cátodos, de un 99.98% de pureza. Una vez extraído el cobre en SX, la solución ácida es reciclada. El reciclaje de la solución, junto a la evaporación que ocurre en la planta, concentra las sales no cúpricas, extraídas del mineral, hasta que se alcanza un equilibrio entre la disolución de sales y su dilución por adición de agua, necesaria para reemplazar las pérdidas por descartes, fuga y

evaporación. En el proceso BTL, actualmente aplicado en Chile (Bustos, 1993), toda la solución es reciclada después de la extracción de cobre y su descarte o pérdida por fugas es mínimo. En Lo Aguirre, la concentración de iones sulfato oscila entre los 120 y 150 g/L. Esta alta concentración de sales en equilibrio puede llegar a veces a constituir un inhibidor de la actividad bacteriana (Montealegre, 1991).

La solubilización del cobre por oxidación de los sulfuros secundarios del mineral es aumentada por la acción de la microflora presente en cada partícula de mineral, si se mantienen las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos responsables de la lixiviación. Es por ello que la etapa de aglomeración es un punto crítico del proceso. La calidad del aglomerado determinará la permeabilidad líquida y gaseosa, necesaria para transportar los nutrientes requeridos y así conducir a un activo crecimiento bacteriano. El refino que riega las pilas, sin llegar a inundarlas, pasa sin romper la aglomeración del mineral. Sobre cada partícula de mineral aglomerado, se forma una capa estacionaria de líquido, de tal manera que el líquido de regado no entre en contacto directo con el mineral, disgregándolo, sino sólo con esta capa de líquido estacionario. En un sistema de este tipo, todos los mecanismos de transporte de solutos entre el líquido que

fluye y la superficie del mineral, ocurre por difusión a través de esta capa estacionaria.

El mecanismo oxidativo de los sulfuros de cobre presentes en el mineral, si bien ocurre en forma química, requiere ser acelerado para su utilización como un proceso industrialmente viable. Generalmente, este fenómeno oxidativo es acelerado en forma natural por la acción de los microorganismos que se desarrollan en el sistema de lixiviación (Harrison, 1984; Hutchins, 1986; Rossi, 1990). Debido a la importancia que está adquiriendo este proceso en la producción mundial de cobre a partir de sulfuros secundarios, es de gran relevancia el estudio de la microflora realmente presente en los minerales lixiviados. Tradicionalmente se han estudiado aquellos microorganismos que han sido capaces de crecer en los medios de cultivo de laboratorio.

2. Microorganismos presentes en los sistemas de biolixiviación.

La microflora detectada, hasta el momento en sistemas de biolixiviación o de características similares, se encuentra compuesta por bacterias, protozoos, tales como *Amoebas* y *Euglenas* y hongos, como *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*. Sin embargo, la población más numerosa de microorganismos está compuesta por bacterias (Harrison, 1984; Kelly, 1988). La composición de la población bacteriana se ve fuertemente influenciada por la temperatura a la cual se encuentran sometidas. En sistemas mesofílicos, en los cuales la temperatura no supera los 45°C, situación en la que están la mayoría de los procesos industriales hoy en uso, incluyendo la mina Lo Aguirre, Cerro Colorado y Quebrada Blanca, se ha observado la presencia de varias especies de bacterias litotróficas, altamente acidófilas, entre las cuales tenemos a *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* y "*Leptospirillum ferrooxidans*". Recientemente en otros centros se han aislado otras bacterias, tales como *Thiobacillus cuprinus* (Huber, 1990), especie cuya relevancia en este proceso no ha sido determinada. También se han observado bacterias heterotróficas acidófilas del género *Acidiphilium*, tales como *A. cryptum*, *A. angustum*, *A. facilis*

y *A. rubrum* y *A. organovorum* (Harrison, 1981; Harrison, 1984; Wichlacz, 1986; Lobos, 1986). A temperaturas mayores de 45 °C, las especies bacterianas dominantes cambian, predominando entre otras *Thermophile TH3*, una cepa moderadamente termofílica (Le Roux, 1977). En ambientes de características similares a los sistemas de biolixiviación, tales como depósitos de piritita, se han encontrado especies de *Sulfobacillus*, como por ejemplo, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Golovacheva, 1978). A temperaturas aún mayores, se ha encontrado que en fuentes termales y suelos ácidos ricos en azufre, predominan archaea termófilas extremas, tales como *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus ambivalens* y *Acidianus brierleyi* (Brierley, 1973; Brock, 1978b; Stetter, 1986).

Actualmente existe un consenso en que los métodos que emplean cultivo son inadecuados para estudiar la composición microbiana de una comunidad, ya que sólo permiten observar una pequeña fracción de los microorganismos que crecen en el sistema natural (Bull, 1992; Amann, 1995). Sin embargo, en la actualidad el análisis del ADN extraído directamente del sistema ha permitido identificar prácticamente a todas las diversas especies presentes en un nicho, independiente de su capacidad de crecer en un medio de

cultivo. En procesos de biolixiviación *T. ferrooxidans* es considerado el miembro más importante de la población bacteriana y por consecuencia el principal responsable de la biolixiviación (Harrison, 1984; Rawlings, 1994; Rossi, 1990). Debido a esto, se realizan grandes esfuerzos en el estudio de ésta bacteria, ya que un mayor conocimiento sobre su fisiología, permitiría en teoría mejorar una operación industrial de biolixiviación. Sin embargo, Sand y colaboradores demostraron que en un sistema de lixiviación de cobre, las bacterias del género *Leptospirilli*, constituían al menos la mitad de la población cultivable (Sand, 1992). En verdad no se ha determinado directamente la real diversidad bacteriana de los sistemas de biolixiviación, tanto experimentales como industriales. Aun no se ha determinado tampoco cuales son las especies prevalentes y como se comportan en determinadas condiciones de biolixiviación.

Los estudios de la microflora, además de aumentar el conocimiento sobre la diversidad de las bacterias litotróficas, podría ayudar a manejar las condiciones del proceso en forma más adecuada para mejorar su eficiencia.

3. Estudios de la microflora presente en sistemas de biolixiviación.

3.1 Diversidad de los microorganismos prevalentes en sistemas de biolixiviación.

En los sistemas de biolixiviación no se ha encontrado una población tan diversa como la observada en otros ecosistemas naturales, tales como suelo, aguas, etc. Aunque las condiciones extremas observadas en estos ecosistemas (alta acidez, medio hiperosmótico, presencia de metales pesados), podrían explicar la baja diversidad observada, ésta también podría deberse a que la caracterización de los diversos microorganismos que proliferan en los sistemas de biolixiviación se ha limitado a identificar aquellos capaces de crecer en las condiciones empleadas en el laboratorio, omitiendo de esta forma potenciales microorganismos que no crecerían en estas condiciones (Lundgren, 1980).

Una descripción adecuada de las bacterias presentes en los sistemas de biolixiviación requiere tanto de una mejor distinción entre ellas como de poder detectar el total de las especies bacterianas presentes. Las reglas taxonómicas que se aplican en la actualidad para definir a las especies típicamente descritas en estos sistemas, tales como *T.*

ferrooxidans, *T. thiooxidans* y "*L. ferrooxidans*", no permiten una diferenciación clara de ellas. Por ejemplo, estas reglas permiten definir como *T. ferrooxidans* a cualquier aislado con las siguientes propiedades: eubacteria gram negativa, de forma cilíndrica, acidofílica y autótrofa, capaz de utilizar ferroso y azufre como fuente de energía. Aislados que oxidan azufre, pero no puedan utilizar ferroso como fuente de energía, son clasificados como *T. thiooxidans*. Cualquier bacteria con estas mismas propiedades, pero en forma de espiral y que no utiliza azufre, es clasificada como "*L. ferrooxidans*". Actualmente existe un consenso en que esta definición es muy laxa y permite agrupar dentro de un mismo género a bacterias muy diversas (Harrison, 1982; Harrison 1984). Es así como, las bacterias cultivadas y clasificadas como *T. ferrooxidans* genotípicamente son tan diferentes entre sí, que podrían ser agrupadas en varias especies diferentes.

Uno de los métodos utilizados para medir las relaciones filogenéticas entre las bacterias es la hibridación de ácidos nucleicos. La hibridación entre moléculas de ADNs, por ejemplo permite determinar las relaciones existentes dentro de las bacterias de un género en particular (Woese, 1987). A este respecto, existen varios trabajos que estudian la heterogeneidad genotípica existente

entre distintos aislados de las especies más frecuentemente aisladas en sistemas de biolixiviación (Harrison, 1982; Harrison, 1984; Harrison, 1985; Harrison, 1986). Basado en el porcentaje de hibridación de los ADNs genómicos de distintos aislados clasificados como *T. ferrooxidans* se han establecido al menos siete grupos (2, 3a, 3b, 4, 5, 6 y 7), con porcentajes de similitud entre los aislados pertenecientes a un mismo grupo no inferiores al 70% y con bajos porcentajes de similitud entre los aislados pertenecientes a distintos grupos. Por criterios aplicados en la definición de la mayoría de las otras especies, grupos con estas diferencias en homología total de ADN podrían agruparse en varias especies diferentes (Harrison, 1982; Harrison, 1984; Harrison, 1986). La técnica de hibridación entre ADNs genómicos, como medio para determinar la diversidad genética, es ampliamente aceptada en la determinación de relaciones filogenéticas entre bacterias pertenecientes a un género determinado (Woese, 1987). Sin embargo, los resultados son muy dependientes de las condiciones en las cuales se desarrolla la reacción. La homogeneidad en el fraccionamiento del ADN utilizado, la temperatura de reasociación, el tiempo de incubación y la concentración de sales (especialmente de sodio), son cruciales en la obtención de una adecuada reacción de hibridación. Desafortunadamente, en los trabajos

para determinar la diversidad genética de especies frecuentemente aisladas en sistemas de biolixiviación, no describen los detalles de las condiciones empleadas del ADN genómico, la mayoría de las condiciones de las reacciones no son dadas y si lo son, no se fundamenta el por qué de su uso. Otro problema que hay que tener presente en la interpretación de los resultados es la detección de los ADNs hibridados, luego del tratamiento con ribonucleasa S1. Podría ocurrir que para dos reacciones de hibridación en que el porcentaje de hibridación es el mismo, el tamaño de los fragmentos hibridados pueda ser muy distinto, de tal manera que la retención de ellos en el filtro puede ser diferente, pudiendo detectarse valores muy distintos entre ambas hibridaciones pese a tener el mismo porcentaje de hibridación. Sin embargo, el hecho de que se hayan ocupado las mismas condiciones para todas las reacciones de hibridación y que, si se trata de bacterias pertenecientes a una misma especie, las características de sus ADNs no debieran ser muy diferentes, sugieren que los resultados obtenidos reflejan, al menos cualitativamente, un alto grado de heterogeneidad genotípica.

Las bacterias clasificadas como "*L. ferrooxidans*" también muestran un alto grado de heterogeneidad genotípica, tanto por secuencia de ARNr 16S como por hibridación de ADN

genómico. Por este último método se pueden distinguir al menos 5 grupos, que se han denominado 1, 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4 (Hallman, 1992; Harrison, 1985; Harrison, 1986). En las cepas de *T. thiooxidans* en cambio se observa un solo grupo por hibridación ADN-ADN, todas mostrando una hibridación cruzada superior al 70% (Goebel, 1994; Harrison, 1982; Lane, 1985; Lane, 1992). Es por ello que algunos autores al referirse a *T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* les prefieren llamar fenoespecies, ya que solo fenotípicamente podrían clasificarse dentro de una misma especie (Harrison, 1985). *L. ferrooxidans*, por ejemplo no ha sido aceptada formalmente como una especie, por esta razón en forma estricta debería escribirse entre cremillas.

Estudios filogenéticos moleculares de diferentes aislados de *T. ferrooxidans* y de otras especies bacterianas presentes en sistemas de biolixiviación utilizando el porcentaje de similitud de secuencia de los ARNr 16S, han permitido clasificar los distintos aislados de *T. ferrooxidans* en grupos filogenéticamente distintos, incluso con más distancia evolutiva (diferencia en el 16S ADNr), entre sí que la existente entre algunos aislados de *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* (Goebel, 1994; Lane, 1992; Woese, 1987). Esto sugiere que distintos aislados de *T.*

ferrooxidans podrían presentar diferencias importantes en su comportamiento fenotípico reflejando las diferencias genotípicas encontradas. Los estudios más recientes han estado centrados en análisis de la población cultivable presente en sistemas industriales y naturales de biolixiviación (Goebel, 1994). Los resultados en estos estudios indican que las nuevas cepas bacterianas cultivables están estrechamente relacionadas con otras previamente descritas (Goebel, 1994).

Estudios basados en otras propiedades, como la composición de ácidos grasos, los componentes respiratorios y la secuencia del ARNr 5S y el uso de sondas, también permiten observar la gran heterogeneidad existente entre aislados de estas especies (Blake, 1992; Lane y col., 1985; Yates y col., 1986).

3.2. Análisis directo de la población bacteriana.

Actualmente, existe consenso que en la mayoría de los estudios de comunidades, las bacterias cultivadas no representan realmente a las bacterias predominantes en el sistema, debido a que los métodos tradicionales de cultivo, por su naturaleza selectiva, subestiman el número y la variedad de microorganismos en una muestra (Roszak, 1984;

Ward, 1990, Ward, 1992). Esta deficiencia es probablemente mayor aún en el sistema de lixiviación, donde las bacterias observadas son generalmente sólo aquellas capaces de crecer utilizando como fuente de energía, ion Fe(II) o azufre (Goebel, 1994; Harrison, 1982; Harrison, 1984).

El análisis directo de la población bacteriana, ha permitido sugerir que *T. ferrooxidans*, la especie considerada más importante en biolixiviación, podría en ciertas condiciones no constituir la especie prevalente. Muyzer y colaboradores (1987), utilizando un anticuerpo específico contra *T. ferrooxidans*, capaz de reconocer distintas cepas de la bacteria incluso crecidas en medios de cultivo con distintas fuentes de energía, observaron que en un sistema de lixiviación de la pirita contenida en carbón, la mayoría de las bacterias observadas por tinción con bromuro de etidio, un fluorocromo inespecífico, no eran detectadas por un anticuerpo policlonal anti *T. ferrooxidans*. Si bien es cierto que este fenómeno puede explicarse por la ausencia de la síntesis de algunas macromoléculas, producto del medio en el cual crecieron, Apel y colaboradores (1976), obtuvieron resultados similares analizando muestras de soluciones que drenaban de una mina de cobre. El análisis de los ARNs 5S aislados a partir de una muestra de solución lixivante,

permitió distinguir dos tipos de ARNr 5S. Sólo uno de ellos pudo ser identificado, resultando ser idéntico en secuencia a la cepa ATCC 19859 de *T. ferrooxidans*, sin embargo, el otro ARNr 5S no pudo ser identificado, lo que sugiere la presencia de especies bacterianas que aún no han sido identificadas por los métodos tradicionales de cultivo (Lane, 1985).

Análisis directo de la población presente en mineral, soluciones de lixiviación o de la población presente después de cultivo, indican que la prevalencia de *T. ferrooxidans* depende de la concentración de ion ferroso del medio, siendo esta la bacteria prevalente en cultivos con altas concentraciones de ferroso. En ausencia o en bajas concentraciones de ferroso en el medio las bacterias prevalentes en mineral lixiviado son *T. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* (Pizarro y col., 1996).

4. Determinación de la complejidad de la población bacteriana presente en distintos ecosistemas.

En los últimos años la caracterización de comunidades bacterianas en un determinado ambiente se ha realizado a través del análisis del ADN extraído directamente del sistema. Se han realizado numerosos análisis, utilizando el ácido nucleico extraído, tales como determinar la velocidad de renaturación (Rawlings, 1994), hibridación del ADN con sondas generales y específicas (Sayler, 1990), amplificación de algunas regiones tanto conservadas como específicas de un género y posterior detección con sondas marcadas (Steffan, 1991). Las estrategias más empleadas en la actualidad son el análisis de las secuencias de los ARNrs 5S y 16S del sistema. Muchos de estos estudios han permitido detectar la presencia de bacterias que no habían podido ser observadas por cultivo, pero que sin embargo se encuentran en un número apreciable en ecosistemas naturales (Britschgi, 1991; Giovannoni, 1990; Lane, 1985; Liesack, 1992; Schmidt, 1991; Ward, 1990). Esta metodología permite además la comparación de las secuencias de los ARNrs ribosomales obtenidos, con aquellas de los de microorganismos de colecciones y la identificación filogenética de las especies presentes en el ecosistema. Sin embargo, estas técnicas

tienen algunos inconvenientes que hay que tener en cuenta al momento de analizar los resultados obtenidos. Al secuenciar directamente los ARNr presentes en las muestras naturales, puede que no se detecten aquellos pertenecientes a las bacterias que se encuentran en bajo número dentro de la población, detectándose sólo las más abundantes. Por otra parte, cualquiera de las aproximaciones utilizadas en el aislamiento de genes o regiones, potencialmente pueden imponer una selección de las secuencias que van a ser aisladas. Esta selección puede ocurrir principalmente durante la amplificación por PCR, clonamiento o alguna de las otras técnicas comúnmente empleadas en este análisis (Schmidt, 1991).

A pesar de las limitaciones señaladas anteriormente, el análisis directo ha cambiado el panorama de la diversidad microbiológica en diferentes sistemas. En los últimos años el estudio de las secuencias del ARN ribosomal ha permitido establecer relaciones filogenéticas entre los seres vivos, causando una revolución en nuestra apreciación de la evolución (Olsen, 1994; Woese, 1987; Woese, 1990). La aplicación de esta metódica ha sido de gran ayuda para definir relaciones filogenéticas entre las bacterias, en las cuales las características fenotípicas son generalmente insuficientes para realizar una clasificación de este tipo

(Furhman, 1992; Giovannoni, 1990; Lane, 1992; Stackebrandt, 1993; Ward, 1990). Adicionalmente el análisis del 16S ARNr ha permitido la identificación filogenética de especies no cultivables. Es así como el análisis de los ARNrs 16S aislados directamente de los microorganismos que crecen en agua de mar, ha indicado la presencia de un gran número de especies filogenéticamente relacionadas entre ellas, que no pertenecen a ninguno de los microorganismos previamente cultivados (Britschgi, 1991; Giovannoni, 1990; Schmidt, 1991). Algo similar se ha observado con muestras de agua dulce en un ambiente termófilo, en las cuales se han podido aislar ocho tipos de ARNr 16S, ninguno de los cuales corresponde a las secuencias de los microorganismos del sistema que son capaces de crecer en el laboratorio (Ward, 1990). Análisis de los ARNrs 16S aislados a partir de muestras de suelo, han conducido a los mismos resultados (Liesack, 1992).

En los procariotes el *locus* genético de los ARNr contiene los tres genes que codifican para las distintas moléculas de ARNr (5S, 16S y 23S) (Brosius, 1981; Jensen, 1993a). Estos genes se encuentran separados por regiones espaciadoras que presentan un alto grado de variación de secuencia y de tamaño a nivel de géneros y especies

bacterianas. La región espaciadora entre los genes 16S y 23S ADNr contiene secuencias conservadas que codifican para ARNt o que conforman, en sus extremos, estructuras secundarias en forma de tallo, que son importantes en el procesamiento de los ARNr (Bott, 1982; Srivastava, 1990; Sechi, 1993; Lund, 1977; Loughney, 1982; Venegas y col., 1988). Las regiones espaciadoras están conservadas en tamaño en diferentes especies lo que ha permitido distinguir especies y géneros en base a esta propiedad (Jensen, 1993; Barry, 1991; Abed, 1995; Riijsens, 1996). La técnica consiste básicamente en amplificar por PCR la región espaciadora entre los genes ribosomales 16S y 23S, usando partidores complementarios a regiones conservadas del extremo 3' del gen para el ARNr 16S y para el extremo 5' del gen para el ARNr 23S. Los productos obtenidos se comparan por electroforesis en gel con aquellos de las principales especies aisladas en sistemas de biolixiviación (Pizarro, 1996). Utilizando esta técnica recientemente fue analizada directamente la complejidad de la población bacteriana presente en muestras provenientes de una mina, antes y después del cultivo, la que fue muy diferente entre ambas (Pizarro, 1996).

En la primera parte de esta tesis se analizó la composición de la población bacteriana originalmente presente en diversos sistemas de biolixiviación de minerales

sulfurados de cobre, y también en el proceso de selección después de cultivo en matraz, con mineral como única fuente de energía. El análisis de la composición de la población bacteriana se basó en la determinación del polimorfismo de tamaño de la región espaciadora entre los genes ARN ribosomales 16S y 23S en el ADN extraído.

5. Microflora en distintas condiciones de acidez.

La biolixiviación de cobre es un proceso que se realiza en un medio ácido que permite el crecimiento de microorganismos que aceleren la oxidación de sulfuros de cobre. Entre las bacterias encontradas en sistemas de lixiviación, *T. ferrooxidans* es considerada hasta ahora la más importante. Esta bacteria se mantiene activa hasta pH cercanos a 1 (Tuovinen, 1972). La lixiviación a altas concentraciones de ácido es preferida por los hidrometalurgistas, porque aumenta la recuperación desde óxidos de cobre y previene la formación de jarosita. Sin embargo, el pH de trabajo se mantiene sobre 1.3, de modo que pueda crecer *T. ferrooxidans* (Amaro, 1991; Harrison, 1984). No obstante, como se demostró en la primera etapa de esta tesis es posible obtener un crecimiento bacteriano significativo en un pH bastante más ácido, de 0.6 (0.6 N de ácido sulfúrico). La composición de la población bacteriana que creció en esta condición se determinó por análisis molecular del ADN extraído directamente del sistema. La amplificación de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S ARNr, permitió visualizar la composición de la población original y la de una población bacteriana finalmente

seleccionada en cultivos en mineral y alta acidez (ácido sulfúrico 0.7 N).

Otra etapa de esta tesis fue el aislamiento y la caracterización fenotípica y genotípica de la bacteria capaz de crecer en alta concentración de ácido sulfúrico (0.7 N) y cuya región espaciadora fuera de un tamaño diferente a todas las descritas anteriormente (Pizarro, 1996a; Pizarro, 1996b).

Con el propósito de explorar la relación filogenética entre la bacteria aislada y otras especies bacterianas, el 16S ARNr fue amplificado y posteriormente secuenciado. A su vez fue secuenciada la región espaciadora entre los genes 16S y 23S de la bacteria aislada y la de *T. thiooxidans* DSM 504. La secuenciación fue realizada en el laboratorio del Dr. Kenneth Timmis, en el Centro de Biotecnología de Braunschweig, GBF, con el apoyo del Dr. Michael Yakimov y Dr. Edward Moore.

La caracterización fenotípica de la bacteria aislada estuvo centrada en sus propiedades de resistencia al ácido.

6. Archaea en biolixiviación.

Recién a comienzos de la década de 1980 se estableció que un grupo de procariontes conformaban un dominio de vida distinta a los Eucariotes y Bacterias (Woese, 1990). Este dominio denominado Archaea, está compuesto de dos linajes. Un reino denominado *Chrenarchaeota*, conformada por las termófilas extremas, y el otro *Euryarchaeota*, que incluye a las metanogénicas y halófilas (Woese, 1990). Las termófilas extremas crecen todas anaeróbicamente y muchas de ellas utilizan azufre como fuente de energía (Fliermans, 1972). Sólo algunas pueden crecer además aeróbicamente. La temperatura óptima de crecimiento bordea los 80°C (Robb, 1995).

Las *Euryarchaeota* son menos parejas en cuanto al fenotipo encontrado. Las metanogénicas representadas por los géneros *Methanococcus*, *Methanobacter* y *Metanomicrobium*, muestran amplia variedad en morfología y hábitat, pero son homogéneas en cuanto a su metabolismo. Las halófilas extremas conforman un grupo muy singular. Estas son aerobias y crecen en soluciones de cloruro de sodio cercanas a la saturación. Ellas tienen una alta concentración de potasio intracelular (5M) y su mecanismo de fotosíntesis, en base a bacteriorodopsina, es único (Robb, 1995).

Desde hace algunos años ha sido descrito el aislamiento y la caracterización de numerosas *Archaea*, en diferentes nichos. Pero sólo recientemente fue publicada la secuencia completa del genoma de la primera *Archaea*, *Methanococcus jannaschii* (Bult y col., 1996). Aunque la mayoría de los genes en *M. jannaschii*, relacionados con la producción de energía, división celular y el metabolismo son muy similares a los encontrados en *Bacteria*, muchos de los genes involucrados en transcripción, traducción y replicación son más similares a aquellos encontrados en Eucariotes (Bult y col., 1996).

Algunas *Archaea* se han aislado en ambientes de condiciones similares a las de los sistemas de biolixiviación, tales como: suelos ácidos (Fliermans, 1972), pilas de escoria de carbón (Belly, 1973; Brock, 1978a), solfataras (Brock, 1978b; Stetter, 1986), etc. La habilidad para oxidar ferroso, azufre, compuestos reducidos de azufre o minerales sulfurados, ha sido ampliamente reconocida en *Archaea* termofílicas, en especial las del género *Sulfolobus*. Sin embargo, hasta el momento ninguna *Archaea* ha sido aislada directamente desde un sistema de biolixiviación industrial. Es por esto que resultó atractivo el determinar si existen *Archaea* en un sistema de lixiviación industrial.

Las muestras utilizadas en la detección de Archaea en sistemas de lixiviación, correspondieron a la solución de lixiviación (Refino), de la mina "Lo Aguirre", y a mineral aglomerado, lixiviado experimentalmente con refino. En "Lo Aguirre", casi todo el cobre es obtenido a través del sistema de biolixiviación en pilas. Particularmente en esta mina las características del refino son bastante extremas ya que además del pH extremo, cercano a 2, la concentración de ion sulfato varia entre 120 y 160 g/L. El objetivo central de esta parte de la tesis fue determinar mediante técnicas moleculares si existían Archaea presentes en los efluentes de una mina en activa producción. Adicionalmente, fue determinado el número de especies de Archaea presentes, a través de un novedoso método de formación de heteroduplex (Delwart, 1993). Por análisis filogenético fue posible determinar además las relaciones filogenéticas con las especies de Archaea ya descritas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y aislados de referencia. Las siguientes cepas bacterianas fueron utilizadas en la realización de esta tesis: *T. ferrooxidans* ATCC 19859, donada por el Dr. Manuel Rodríguez (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile) al Dr. Omar Orellana (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile); *T. thiooxidans* ATCC 19377, *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2391 y *Sulfolobus acidocaldarius* BC 65, originalmente donada al Dr. Carlos Jerez (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile). Las siguientes cepas fueron obtenidas directamente de la colección de cultivo DSM: *T. thiooxidans* DSM 504, *T. ferrooxidans* DSM 583.

Cultivo de cepas de referencia. Los cultivos de las cepas de *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* fueron realizados en medio MS9b [(NH₄)₂ SO₄ 0.4 g/L; K₂HPO₄·2H₂O 0.04 g/L; MgSO₄·H₂O 0.25 g/L] (Espejo, 1987). Para el cultivo de *T. ferrooxidans*, 100 ml de MS9b pH 1.8 conteniendo FeSO₄·7H₂O al 3% fueron

inoculados con 1×10^8 bacterias (Espejo, 1988). Para el cultivo de *T. thiooxidans*, 100 ml de MS9b pH 3.5, con 0.5 g de azufre elemental fueron esterilizados a 112 °C por 15 minutos y luego inoculados con una suspensión de azufre y medio que contenía aproximadamente 1×10^8 bacterias. La incubación en ambos casos se llevó a cabo a 28°C en un agitador orbital (Orbit Environ-shaker), hasta total oxidación del ferroso en el medio o hasta que el pH en el cultivo en azufre hubiese descendido a 1.5.

Los cultivos utilizando mineral concentrado como única fuente de energía se realizaron en matraces Erlenmayer de 250 ml, con mineral al 2% y MS9b pH 1.8. El mineral concentrado fue previamente esterilizado en autoclave por 30 minutos a 121°C. El medio de cultivo se cambió cada semana. Para subcultivar, una suspensión de mineral y medio de cultivo correspondiente al 1% de volumen de cultivo fue usado como inóculo nuevo. El crecimiento bacteriano fue determinado cuantificando el ADN extraído de 200 mg de mineral a los diferentes tiempos.

Cuantificación bacteriana. La determinación del número de bacterias totales presentes en el medio de cultivo, se llevó

a cabo por microscopía de epifluorescencia luego de filtrar y teñir con naranja de acridina (Hobbie, 1977).

Bioliixiviación en columnas. Los minerales utilizados en la preparación de las columnas contenían 1,36% de cobre, del cual 33% era óxido, un 61% calcocita y un 4,5% covelita. El mineral fue triturado hasta un tamaño de 1/4 de pulgada y luego aglomerado (Rauld, 1986). Se cargaron 2000 gramos de mineral aglomerado en columnas cilíndricas de vidrio (35 cm de altura y 13 cm de diámetro), las cuales se lixiviaron con 600 ml de MS9b por día, suplementado con ácido sulfúrico y ion ferroso a distintas concentraciones. Previo a la lixiviación, las columnas se inocularon con 100 ml de las soluciones de interés. La cuantificación del cobre lixiviado presente en la solución de salida de la columna se determinó por espectrometría de absorción atómica. Mediante este procedimiento, más del 90% del cobre, presente como sulfuro, fue recuperado.

Inóculos utilizados. En los cultivos en matraz se utilizó como inóculo una suspensión de mineral aglomerado de columnas de lixiviación (al 20% p/V). Este mineral fue utilizado cuando se había alcanzado un 90% o más de recuperación de

cobre. En esta etapa de la lixiviación el mineral presenta un alto número de bacterias con una alta actividad oxidativa. Los inóculos obtenidos de un proceso industrial de biolixiviación en la planta Lo Aguirre, de la Sociedad Minera Pudahuel, correspondieron al efluente de la solución de lixiviación que fluye bajo las pilas de mineral, lixiviadas por 2 a 4 meses. Estas pilas fueron lixiviadas con la solución resultante del proceso de la planta, que incluye extracción por solvente (refino).

Extracción de ADN. El ADN de las bacterias asociadas a mineral se extrajo a partir de 10 gramos de mineral aglomerado. Para lo cual el mineral inicialmente se lavó dos veces en H_2SO_4 0.04 N, y luego 2 veces con TE (pH 8.5), centrifugando a 1000 x g por 10 minutos. Posteriormente se realizó la lisis de las bacterias en el mineral con SDS al 1% en TE-NaCl 0.15 M, a 70 °C durante 10 minutos. Finalmente se centrifugó a 1000 x g y se recuperó el sobrenadante con el ADN de los microorganismos asociados al mineral. Este procedimiento de extracción se realizó por 4 veces sucesivas con el propósito de obtener una muestra representativa que incluya a los microorganismos que eventualmente pudieran ser más resistentes a la lisis con SDS. Los cuatro sobrenadantes

se mezclaron para un análisis posterior. Este método ha demostrado ser altamente eficiente en la lisis de distintas cepas de los géneros *Thiobacilli* y *Leptospirilli* (Pizarro, 1996a). El ADN bacteriano presente en los efluentes de las columnas se extrajo en forma similar por lisis directa luego de concentrar las bacterias presentes en 500 ml de solución y lavar con H_2SO_4 0,04 N y TE (pH 8,5), excepto que las centrifugaciones se realizaron a 10.000 x g por 20 minutos para concentrar las bacterias. La lisis se llevó a cabo de igual forma como se describió para las bacterias unidas a mineral, excepto que sólo se realizó una extracción. La cuantificación del ADN extraído se realizó por comparación visual de las bandas teñidas con Bromuro de Etidio con estándares apropiados, luego de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ADN de las bacterias cultivadas en matraz Erlenmayer se extrajo por el mismo procedimiento, con la excepción de que la extracción se hizo a partir de 50 ml de cultivo.

Amplificación por PCR. El ADN utilizado en la amplificación fue previamente tratado enzimáticamente, inicialmente con ribonucleasa A (0.1 mg/ml) durante 2 horas a 37 °C, y luego con Proteinasa K (1 mg/ml) durante 1 hora a 37 °C. El ADN

tratado fue amplificado directamente sin purificación adicional, solamente fue diluido al menos 100 veces en TE (Tris 0.01 M, EDTA 0.001M, pH 7.5). El ADN a amplificar fue desnaturalizado por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos, y enfriado rápidamente a 0 °C, para minimizar la reasociación de las hebras. 1.5 ng de este ADN desnaturalizado se mezcló con un volumen de mezcla de reacción (Tris 25 mM, pH 8.3; KCl 100 mM; MgCl₂ 6.5 mM; dATP, dCTP, dTTP, dGTP 0.4 mM de cada uno; gelatina 0.04%; Taq polimerasa 1.5 unidades). La mezcla contenía además los partidores adecuados a una concentración de 0.2 µM (Saiki, 1988). Finalmente, se agregaron 2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación de la solución durante la amplificación.

De acuerdo a la región de interés, fueron utilizados diferentes partidores, descritos en la Tabla 1. Las regiones espaciadoras entre los genes ribosomales 16S y 23S, fueron amplificadas con los partidores G1 y L1 de acuerdo con las condiciones de amplificación del programa 1, el cual consistió en: dos ciclos de 15 segundos a 94 °C, 1 minuto a 84 °C, 1 minuto a 74 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C; 23 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C; 1 ciclo de 15 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 10 minutos a 72 °C.

Luego de la amplificación, se agregaron 5 μ l de una solución de azul de bromofenol al 0,025% en glicerol al 50% en TE pH 7,5 (Tris 10 mM, pH 7,5; Na₂EDTA 1mM), y 5 μ l de esta mezcla fueron posteriormente utilizados para electroforesis en gel de acrilamida. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata.

La identificación de las especies a las que correspondían los amplificados predominantes bajo determinada condición de cultivo se hizo por el análisis de secuencia del ARNr 16S. Para ello se amplificó por PCR la mayoría del gen del ARNr 16S junto con la región espaciadora, usando el procedimiento de amplificación descrito por DeLong (DeLong, 1992) con los partidores Eubac27F (DeLong, 1992) y L1 (Jensen, 1993), o G₀ (DeLong, 1992) y L1 (Jensen, 1993).

La amplificación en la que fueron utilizados los partidores 1392R, 958R y 23F fueron realizadas de acuerdo a las condiciones descritas por DeLong (DeLong, 1992), excepto que la desnaturalización del ADN se realiza en un tubo con la mezcla de reacción menos la polimerasa. El programa utilizado en este caso fue: 3 minutos a 94°C, 10 minutos a 55°C (tiempo durante el cual debe agregarse 0.2 μ l de Taq polimerasa, a cada tubo); luego 30 ciclos de 1.5 minutos a 55°C, 1.5 minutos a 72°C, 1.5 minutos a 95°C; finalmente 1.5 minutos a 55°C, 5 minutos a 72°C.

Tabla 1. Partidores utilizados en la amplificación de zonas del locus ribosomal.

Partidores	Secuencia 5'-3'
G ₀	AGAGTTTGATCCTGG
G ₁	GAAGTCGTAACAAGG
L ₁	CAAGGCATCCACCGT
Eubac27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1392R	TGACGGGCGGTGTGTG
958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT
23F	TCYGGTTGATCCTGCC

Electroforesis en gel. La comparación de los tamaños aparentes de los productos obtenidos luego de la amplificación, se realizó por electroforesis en un gel de 17 cm de longitud con poliacrilamida al 7% en buffer Tris-Borato-EDTA. El ADN se visualizó mediante tinción con nitrato de plata (Espejo, 1993; Lee, 1996). Adicionalmente, a través de la tinción con nitrato de plata fue posible distinguir el ADN de doble hebra (negro) y el de simple hebra (rojizo) (Espejo, 1993).

Secuenciación. La secuenciación de las regiones espaciadoras entre el 16S y 23S ARNr, y la de los 16S ARNr fue realizada directamente con los productos de amplificación respectivos.

La secuenciación se hizo utilizando nucleótidos marcados fluorescentemente y las condiciones de electroforesis recomendadas (Perkin-Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Germany), en un secuenciador automático Applied Biosystem 377.

Análisis de secuencia. Para la identificación preliminar de género, las secuencias del 16S ARNr obtenidas se compararon inicialmente con las disponibles en el banco de datos de la EMBL, utilizando el programa Gene Works. En el caso de THA, las secuencias se alinearon posteriormente con las de los 16S ARNr de cepas de *Thiobacilli* y *Leptospirilli*, previamente determinadas.

El 16S ARNr de la bacteria aislada fue secuenciado en su totalidad (ambas hebras). En todas las secuencias las lecturas inciertas o anómalas fueron excluidas del análisis.

Marcación de 16S ADNr con ATP- α P³². El 16S ADNr de *Sulfolobus acidocaldarius* BC fue marcado radiactivamente durante la amplificación por PCR, utilizando para esto ATP- α P³² (actividad específica 3000 Ci/mmol) en la mezcla de amplificación (12 μ Ci).

Formación de heteroduplex entre amplificadores del 16S ADN_r. La desnaturalización y subsecuente renaturalización de los productos de amplificación del 16S ADN_r fue realizada diluyendo los productos de amplificación en 10 µl de tampón de renaturalización (10 mM Tris; 2mM EDTA; 0.1 M NaCl) (Delwart, 1993) y posteriormente fueron desnaturalizados y renaturalizados en un termociclador por calentamiento a 96°C durante 2 minutos, 72°C por 3 minutos y enfriados a 4°C. Finalmente, los productos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida-bis al 7%, preparados en una cámara Hoefer SE 250 (7 x 8 x 0.75 cm) y corrida a 150 V (Delwart, 1993; Jensen, 1993b). La tinción fue realizada con nitrato de plata (Espejo, 1993), lo que permitió visualizar el ADN de hebra doble (negro) y el hebra simple (rojizo).

Determinación de la resistencia bacteriana a la acidez del medio: La comparación de la resistencia al ácido fue realizada con cultivos de THA y *T. thiooxidans* ATCC 19377. La determinación consistió en cultivar estas bacterias en MS9b y azufre con cantidades crecientes de ácido sulfúrico. Los cultivos de THA fueron inoculados con $2,5 \times 10^6$ bacterias, y los de *T. thiooxidans* con 1×10^7 bacterias. Ambas bacterias fueron previamente crecidas en MS9b y azufre, con ácido sulfúrico 0.7 N. Fueron cultivadas a 30°C con agitación (200

rpm), durante 18 días. Luego, se determinó el crecimiento bacteriano midiendo la absorbancia a 420 nm (después de decantación del azufre a 1X g, durante 30 minutos). El crecimiento fue expresado como porcentaje, el 100% para *T. thiooxidans* correspondió a un valor de 1.0 y a 0.9 para THA.

Determinación del consumo de oxígeno: La respiración bacteriana fue determinada cuantificando el consumo de oxígeno en un medidor de oxígeno disuelto YSI modelo 59. Se utilizaron matraces Erlenmayer de 50 ml, manteniendo la temperatura a 30°C y con agitación constante.

RESULTADOS

1. Selección de la población bacteriana presente en minerales lixiviados, después del cultivo en el laboratorio.

Se estudió la población bacteriana crecida durante la biolixiviación de minerales de cobre y, aquellas obtenidas después de cultivarla en el laboratorio. Las diferentes especies bacterianas fueron distinguidas por el tamaño de la región espaciadora entre los genes ribosomales 16S y 23S, en el locus ADN_r bacteriano. Los diferentes espaciadores fueron visualizados mediante amplificación por PCR del ADN, utilizando partidores universales para esta región en bacterias, y posterior electroforesis en gel. La composición de la población original y aquella obtenida después del cultivo, fue estudiada con tres muestras diferentes.

1.1. Selección de bacterias capaces de crecer en alta concentración de ácido sulfúrico.

La lixiviación experimental de mineral aglomerado del tipo calcosina/covelina en columnas, realizado tal como se describió en la sección Materiales y Métodos, mostró que una población bacteriana significativa puede desarrollarse cuando el mineral es lixiviado con una solución salina (MS9b), que

contiene 0.6 N de ácido sulfúrico y 1 g/L de ion ferroso. El crecimiento bacteriano en estas columnas, estuvo reflejado por un incremento de la extracción de cobre y de la generación de ion férrico, medido en el efluente de las columnas (Pizarro, 1996b) (Figura 1). Como puede ser observado en la Figura 1 el desarrollo bacteriano empieza a detectarse a los 70 días aproximadamente, tiempo significativamente más largo que los 15 días observados cuando la solución lixiviante contiene 0.1 N de ácido sulfúrico (datos no mostrados). Sin embargo, esta fase se reduce a 20 días cuando las bacterias procedentes de esta columna fueron usadas para inocular una segunda columna lixiviada a la misma concentración de ácido (0.6 N).

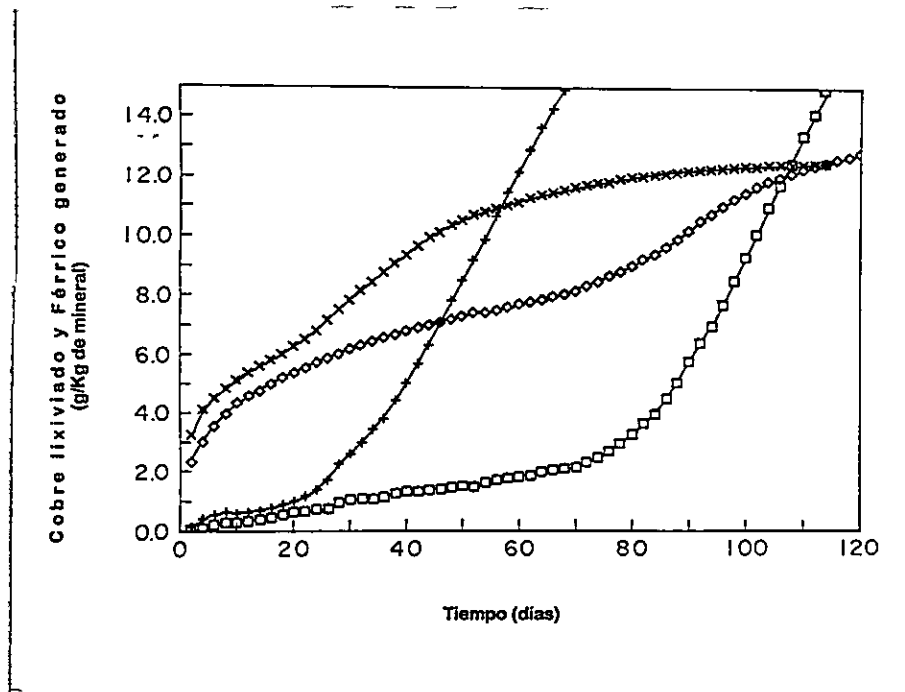


Figura 1: Cobre lixiviado y producción de ion férrico en columnas de mineral aglomerado, lixiviadas con medio MS9b y 0.6 N de ácido sulfúrico. Ion férrico (□) cobre (∅) obtenido del efluente de una columna, inoculada con bacterias procedentes de una columna lixiviada con 0.1 N de ácido sulfúrico. Ion férrico (+) y cobre (x) obtenido del efluente de una segunda columna inoculada con las bacterias provenientes de la primera columna.

1.1.2. Composición de la población bacteriana en mineral lixiviado con alta concentración de ácido sulfúrico (0.6 N), y en posteriores subcultivos en matraz.

Fue estudiada la composición de la población bacteriana originalmente presente en el mineral y los cambios ocurridos

después del cultivo en un medio mínimo, que contenía 37 g/L de ácido sulfúrico (0.7 N) y una mezcla de minerales concentrados. El inóculo original correspondió a mineral aglomerado del tipo calcocina/covelina lixiviado con una solución con 30 g/L de ácido sulfúrico (0.6 N), en el cual, a pesar de la alta concentración de ácido de la solución lixivante, se observó un crecimiento bacteriano significativo, como se mostró anteriormente. El mineral concentrado usado para el cultivo en el laboratorio fue una mezcla que contenía principalmente calcosina (36.4%), covelina (6.1) y calcopirita (40.1%). El crecimiento de las bacterias asociadas al mineral fue determinado por extracción y cuantificación del ADN bacteriano. La solución del cultivo fue cambiada cada semana, descartando las bacterias en suspensión, y dejando sólo las que se encontraban asociadas al mineral. Los subcultivos fueron realizados en las mismas condiciones, una vez observado un crecimiento bacteriano apropiado en la población asociada al mineral. Los espaciadores detectados en el inóculo original y en los sucesivos subcultivos posteriores se muestran en la Figura 2.

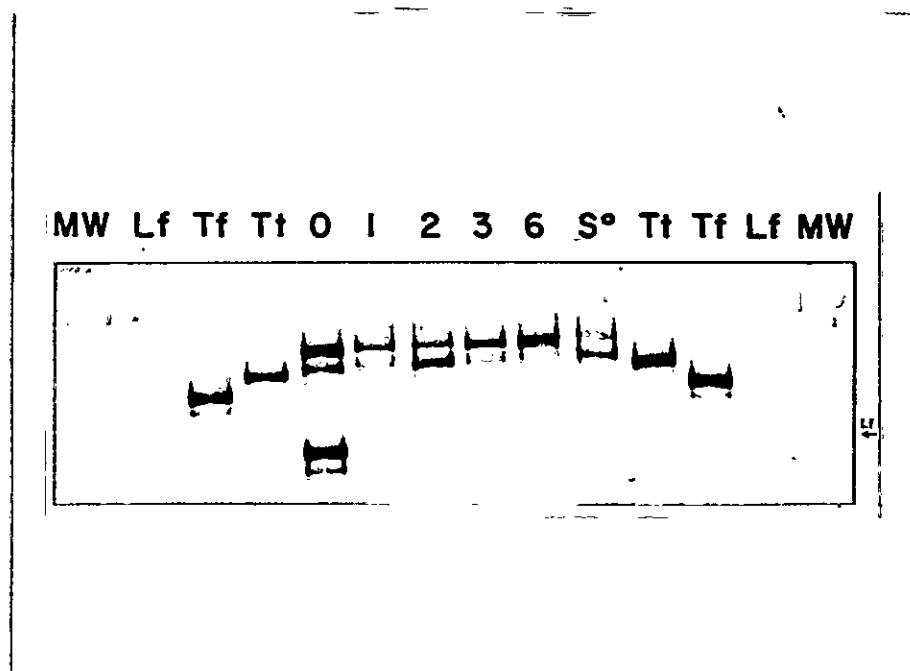


Figura 2. Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ribosomales del ADN extraído de diferentes muestras. Carril 0, inóculo original (aglomerado lixiviado en alta concentración de ácido); carriles 1, 2, 3 y 6, primero, segundo, tercero y sexto subcultivo respectivamente; carril S° cultivo en MS9b pH 3.5 y azufre elemental de las bacterias del 6^{to} subcultivo en mineral; carriles Lf, Tf y Tt, "*L. ferrooxidans*", *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, respectivamente. La línea MW muestra la banda de 603 pb de ϕ X174/*HaeIII*.

Aceptando que cada banda corresponde a una sola especie bacteriana (Jensen, 1993; Pizarro, 1996b), la Figura 2 mostró que la población original era compleja, es decir estaba conformada por varias especies bacterianas, y que en los subcultivos se produjo una selección, obteniéndose al final

del sexto subcultivo una población compuesta por dos cepas bacterianas. Aquellas bacterias cuyos espaciadores presentaron mayor migración fueron perdidas en los subcultivos. De acuerdo al largo aparente de los espaciadores de mayor migración, estas bacterias probablemente correspondan a "*L. ferrooxidans*". El largo del espaciador de una de las bacterias seleccionadas en el sexto subcultivo (observada más claramente en el segundo subcultivo), es muy similar al de *T. thiooxidans*. En el sexto subcultivo, el espaciador más largo, observado en la población original, fue el prevalente. Este espaciador no pudo ser asociado a ninguna de las especies bacterianas, características del proceso de biolixiviación, cuyo tamaño de espaciador sea conocido (Pizarro, 1996b). Por esta razón, esta bacteria fue estudiada en más detalle, como se describe posteriormente.

La población seleccionada en el último subcultivo fue incapaz de crecer en ion ferroso, pero creció en azufre como única fuente de energía (carril S⁰), sin embargo la proporción de los espaciadores, al cultivar en azufre, fue diferente a la del inóculo. En este cultivo realizado a pH 3.5 se observó un aumento del espaciador similar a *T. thiooxidans* (Figura 2, carril S⁰).

1.2. Composición de la población bacteriana en la solución lixiviante (Refino) de la planta de producción de cobre "Lo Aguirre", y posteriores subcultivos en matraz.

Fue estudiada la composición de la población bacteriana del Refino de planta, y los cambios ocurridos después del cultivo en matraz con agitación y mineral concentrado como exclusiva fuente de energía. El mineral utilizado contenía un 26% de cobre, casi exclusivamente como calcopirita. El pH del refino original y del medio de cultivo utilizado fluctuó entre 1,6 y 1,8. Los espaciadores detectados, mediante amplificación por PCR con los partidores G1 y L1, de el ADN extraído de la muestra original y del ADN de los sucesivos subcultivos, son mostrados en la Figura 3.

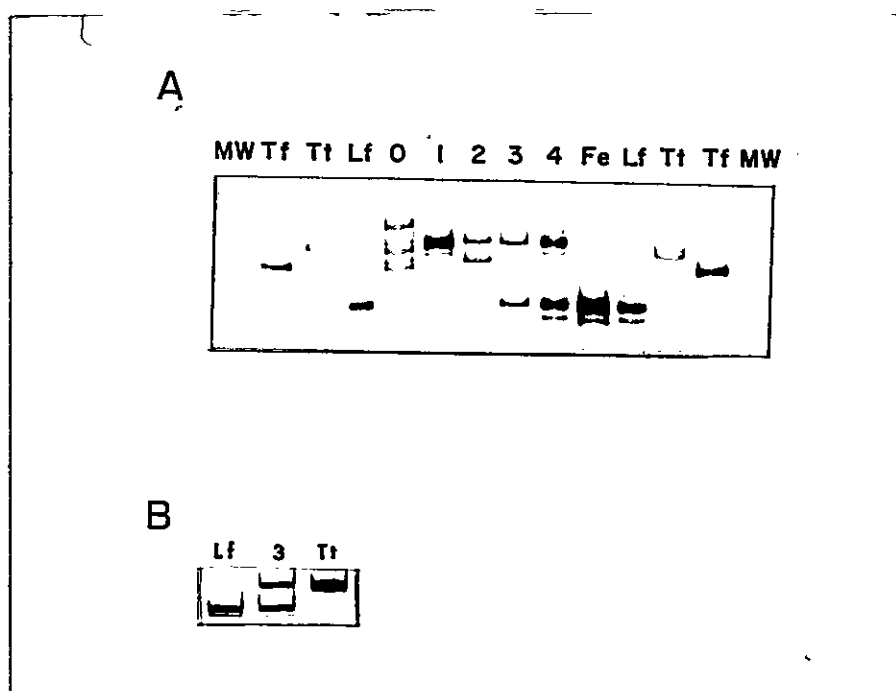


Figura 3: Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, del ADN extraído desde diferentes muestras. A. Carril O, inóculo original; carriles 1, 2, 3 y 4, primero, segundo, tercero y cuarto subcultivo respectivamente; carril Fe, cultivo en ion ferroso de las bacterias presentes en el cuarto subcultivo; carriles Lf, Tf y Tt, "*L. ferrooxidans*", *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, respectivamente. El carril MW muestra la banda de 603 pb de ϕ X174/*HaeIII*. B. Carril 3, tercer subcultivo; carriles Lf y Tt, "*L. ferrooxidans*" y *T. thiooxidans*, respectivamente.

Los cambios en las proporciones relativas de los espaciadores en los diferentes subcultivos, que se observaron en la Figura 3A, son difíciles de explicar. Es posible que estos se deban a diferencias en el sustrato a distintos

tiempos de incubación. A mayor tiempo de incubación pueden aparecer nuevos compuestos, generados por la oxidación de la calcopirita, tales como azufre elemental, ion ferroso, etc. La población seleccionada en el cuarto y último subcultivo estaba compuesta principalmente por dos bacterias con espaciadores diferentes. Cabe hacer notar que los espaciadores prevalentes en el último subcultivo no se detectan en la población original. El espaciador más corto era muy similar al que presentan cepas de "*L. ferrooxidans*". Este espaciador fue el único detectado cuando las bacterias presentes en el cuarto subcultivo fueron crecidas en ion ferroso como única fuente de energía. El espaciador más largo fue similar en longitud al observado para *T. thiooxidans*, lo que se observó claramente en la Figura 3B, en la que la electroforesis de los espaciadores del subcultivo 3 fue realizada con los controles de *L. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* adyacentes. Además, los espaciadores encontrados después del tercer subcultivo, digeridos con las enzimas de restricción Cfo I (ver Figura 4), Hae III y Alu I (datos no mostrados), presentaron el patrón esperado para una mezcla de espaciadores de "*L. ferrooxidans*" y *T. thiooxidans*.

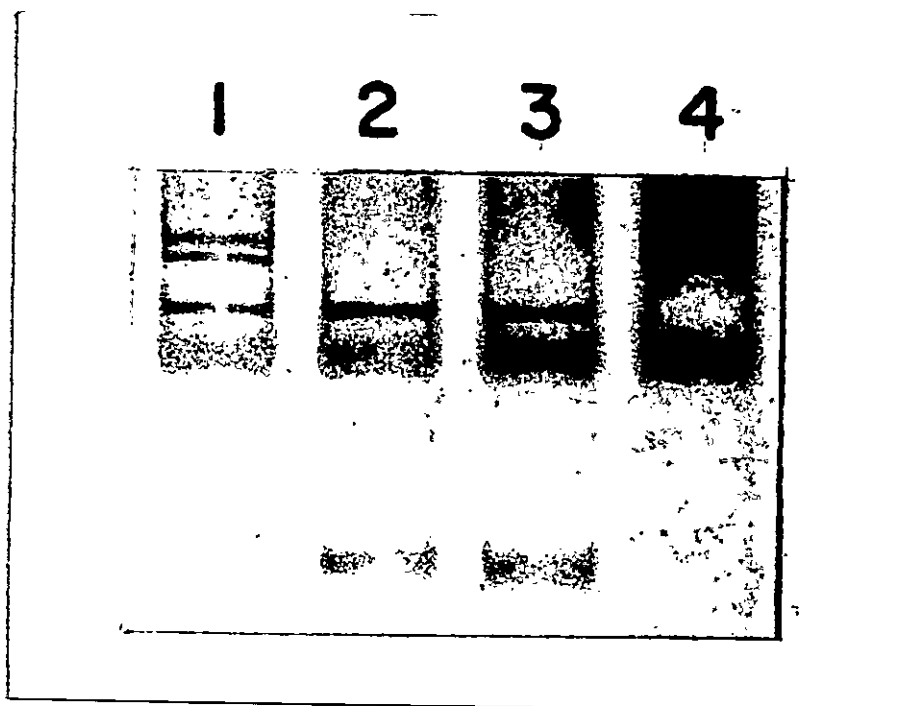


Figura 4: Patrón de los fragmentos de restricción obtenidos con *Cfo I* de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, procedentes de diferentes muestras. Carril 1, tercer subcultivo en mineral mostrado en la Figura 3 (carril 3); carril 2 y 3, "*L. ferrooxidans*"; carril 4, *T. thiooxidans*.

1.3. Composición de la población bacteriana en mineral lixiviado sin ion ferroso, y en posteriores subcultivos en matraz.

Al igual que en los experimentos previos, fue estudiada la composición de la población original y los cambios que ocurrieron después del cultivo en el laboratorio. El inóculo

consistió en mineral aglomerado (calcosina/covelina) lixiviado con una solución carente de ion ferroso. En la Figura 5 son mostrados los espaciadores observados en la muestra original, utilizada como inóculo, y después de subcultivos sucesivos en calcopirita.

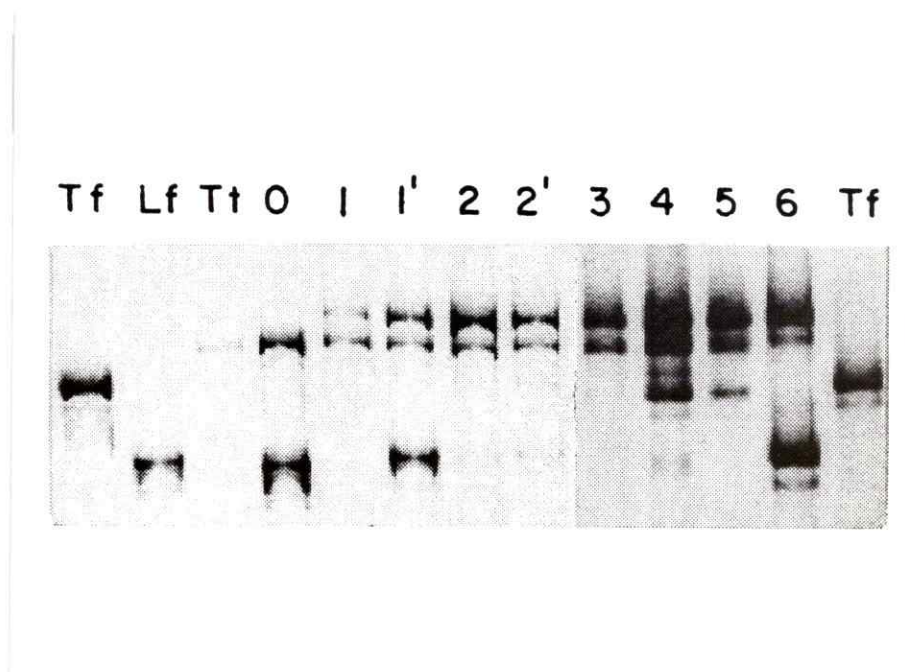


Figura 5: Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, de ADN extraído de diferentes muestras. Carril 0, inóculo original; carril 1, primer subcultivo a los 9 días; carril 1', primer subcultivo a los 18 días; carril 2, segundo subcultivo, después de 10 días; carril 2', segundo subcultivo después de 21 días; carriles 3, 4, 5 y 6, tercero, cuarto, quinto y sexto subcultivo, respectivamente. Los carriles Lf, Tf y Tt corresponden a "*L. ferrooxidans*", *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, respectivamente.

La Figura 5 mostró que la población original contenía dos espaciadores diferentes correspondientes probablemente a dos especies bacterianas. De acuerdo al tamaño de los espaciadores deberían corresponder a *T. thiooxidans* y "*L. ferrooxidans*". Esta correspondencia fue comprobada posteriormente a través de la secuenciación del 16S ARNr (Pizarro, 1996a; Pizarro, 1996b). En el primer subcultivo fue detectado un espaciador más grande que el de *T. thiooxidans* ATCC 19377, que no se observó en la muestra original. Además en el cuarto y quinto subcultivo se detectó un espaciador adicional, del tamaño esperado para *T. ferrooxidans*. Al realizar dos subcultivos en ion ferroso de las bacterias presentes en cuarto subcultivo, se seleccionó una sola bacteria, cuyo espaciador tenía igual tamaño que el de *T. ferrooxidans* (Figura 6). Las bandas que migran aproximadamente en el primer tercio del gel, probablemente corresponden a heteroduplex formados en el último ciclo de alineamiento del PCR (Jensen, 1993b; Delwart, 1993). La presencia de estos heteroduplex sugiere que la banda formada por el espaciador, esta conformada por dos espaciadores de igual tamaño, pero diferentes en secuencia nucleotídica (Jensen, 1993b).

Como se observó en la Figura 5, en el último subcultivo (sexto), parecieron prevalecer sólo dos especies bacterianas.

De acuerdo al tamaño un espaciador correspondería a "*L. ferrooxidans*" pero el otro no pudo asociarse a otra bacteria encontrada en sistemas de lixiviación con espaciador conocido (Pizarro y col., 1996b). En la Figura 5 es posible notar que la población también cambia durante un mismo subcultivo (primer subcultivo, carriles 1 y 1'). Igual que en el caso anterior, este cambio puede haberse debido a la generación de nuevos sustratos producto de la oxidación de la calcopirita, como por ejemplo ion ferroso, el que podría permitir un mayor desarrollo de bacterias ferrooxidantes.

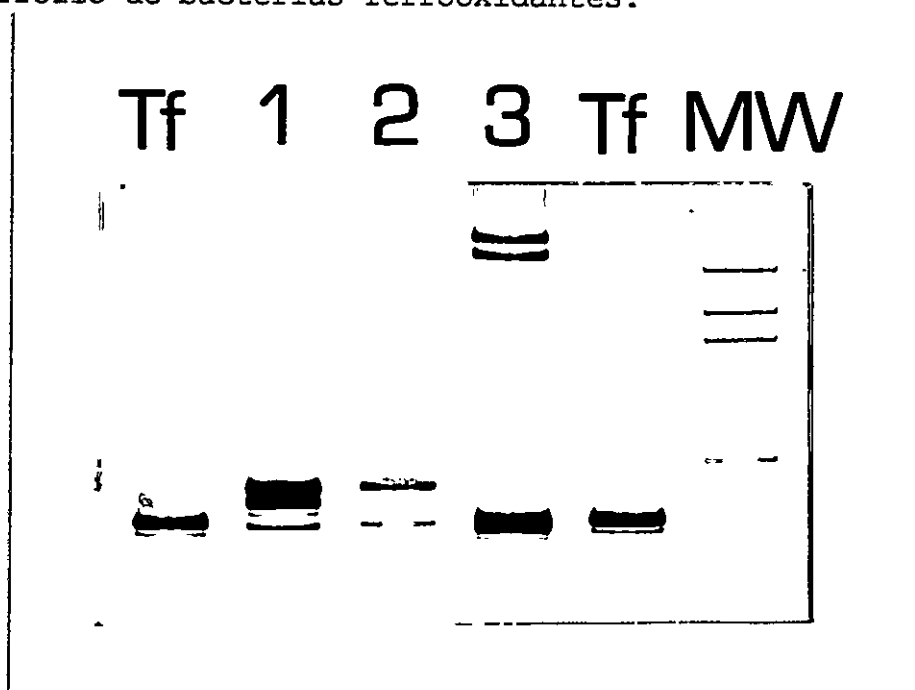


Figura 6: Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, de ADN extraído de diferentes muestras. Carril 1, cuarto subcultivo mostrado en Figura 5; carril 2, primer subcultivo en ion ferroso de las bacterias presentes en el cuarto subcultivo; carril 3, segundo subcultivo en ion ferroso de las bacterias provenientes del cuarto subcultivo; carril Tf, *T. ferrooxidans*. El carril MW muestra las bandas de ϕ X174/*HaeIII*.

2. Aislamiento y caracterización genética y fenotípica de una bacteria, presente en minerales de cobre lixiviados con una alta concentración de ácido sulfúrico.

2.1 Selección en cultivo, de una bacteria capaz de crecer en alta concentración de ácido.

El estudio de la composición bacteriana original en la columna y aquella seleccionada después de cultivos sucesivos en medio MS9b con 0.7 N de ácido sulfúrico, fue descrita anteriormente en el punto 1.1 de la sección Resultados. Tal como se describió, en el sexto subcultivo en matraz se seleccionaron principalmente dos especies bacterianas. Estas fueron capaces de crecer en azufre elemental como única fuente de energía, pero la proporción relativa de estas, estimada por los espaciadores, cambió dependiendo del pH del medio (Figura 7).

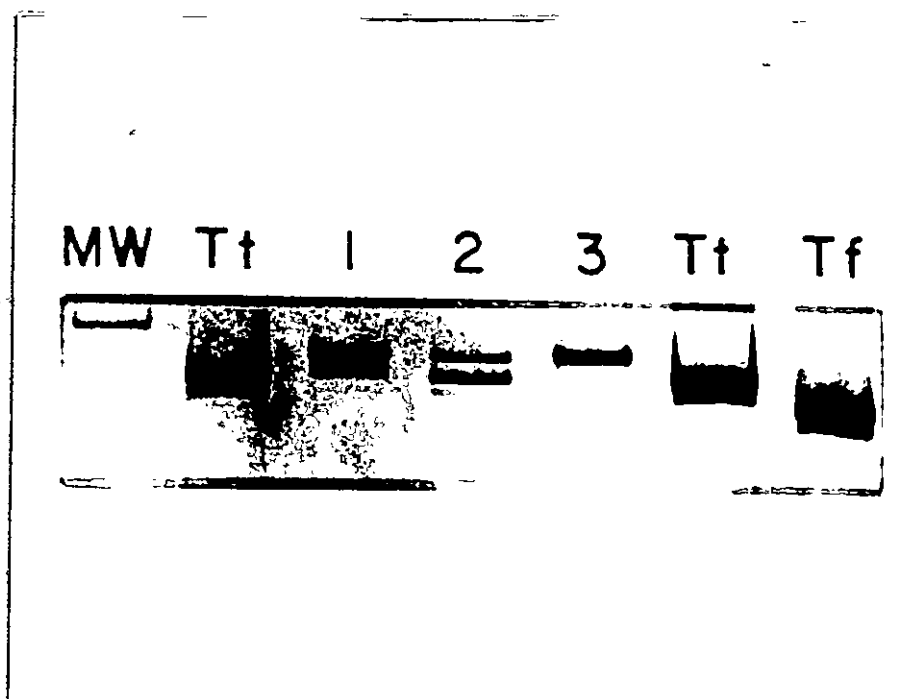


Figura 7: Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr del ADN extraído de diferentes muestras. Carril 1, sexto subcultivo en mineral con 0.7 N de ácido sulfúrico; carril 2, bacterias del sexto subcultivo crecidas en azufre a pH 3.5; carril 3, bacterias del sexto subcultivo crecidas en azufre con 0.7 N de ácido sulfúrico; carriles Tf y Tt, *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* respectivamente. El carril MW muestra la banda de 603 pb de ϕ X174/*HaeIII*.

El espaciador de tamaño similar al de la cepa de *T. thiooxidans*, estaba aumentado en los cultivos en azufre crecidos a pH 3.5 (0.01 N de ácido sulfúrico), mientras que el espaciador más largo fue el único detectado en los cultivos en medio con 0.7 N de ácido sulfúrico. Un cultivo

que contenía exclusivamente la cepa bacteriana de espaciador más largo, denominada **THA**, fue obtenido a través de subcultivos sucesivos en azufre y medio con 0.7 N de ácido sulfúrico. La pureza del cultivo fue verificada al no detectar el espaciador más pequeño cuando se realizaron cultivos en azufre a pH 3.5 (Figura 8). **THA** es una bacteria con forma de bacilo incapaz de crecer en ion ferroso.

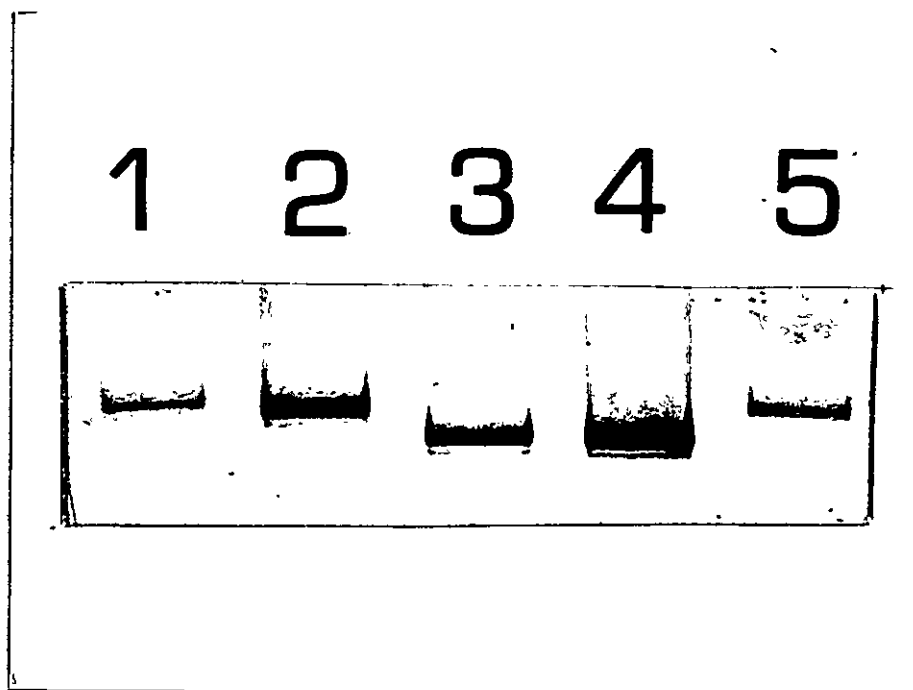


Figura 8: Productos de amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes 16S y 23S ARNr, de ADN extraído de las siguientes muestras: carril 1, **THA** crecida a pH 3.5; carril 2, **THA** crecida a pH 1.8; carril 3, *T. thiooxidans* ATCC 19377 crecido a pH 3.5; carril 4, *T. thiooxidans* ATCC 19377

crecido a pH 1.8; carril 5, THA crecido a 0.7 N de ácido sulfúrico.

2.2. Propiedades fenotípicas y genotípicas del aislado bacteriano, THA, capaz de crecer en azufre con alta concentración de ácido sulfúrico.

2.2.1 Caracterización genética de THA.

Se realizó una caracterización preliminar de THA, para explorar su relación filogenética con otras especies bacterianas capaces de crecer en ambientes ácidos. El gen 16S ARNr fue amplificado por PCR (Saiki, 1988) con los partidores 16F27 (DeLong, 1992) y L1 (Jensen, 1993a). El producto de la amplificación fue extraído con fenol-cloroformo y secuenciado directamente con Taq (Lane, 1991), (desde la posición 20 a la 1500, usando *E. coli* como referencia), usando dideoxinucléotidos marcados con fluorescencia. El análisis fue realizado en un secuenciador automático, tal como se describió en Materiales y Métodos. La secuencia del 16S ARNr de THA, mostrada en la Figura 9, resultó tener un 99.85% de similaridad con las cepas de *T. thiooxidans* ATCC 19377 y B-S3, indicando una alta cercanía a las cepas de *T. thiooxidans* conocidas (Goebel, 1994). Sin embargo, esta alta similaridad no permitió discriminar una diferencia filogenética mayor (Fox, 1992 ;Woese, 1987), como sugirió por la diferencia en

el tamaño del espaciador de THA respecto al de *T. thiooxidans*.

```

1   TGGCTCAAGA TGAACGCTGG CGGCATGCCT AACACATGCA AGTCGAACGG
51  TAACAGGTCT TCGGATGCTG ACGAGTGGCG GACGGGTGAG TAACCGCTAG
101 GAATCTGTCT TTGAGTGGGG GACAACCCAG GGAAACTTGG GCTAATACCG
151 CATAACCCCT GAGGGGGAAA GCGGGGGATC TTCGGACCTC GCGCTGGAAG
201 AGGAGCCTAC GTCTGATTAG CTAGTTGGTA GGGTAAAGGC CTACCAAGGC
251 GACGATCGGT AGCTGGTCTG AGAGGACGAC CAGCCACACT GGGACTGAGA
301 CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATTT TTCGCAATGG
351 GGGCAACCCCT GACGAAGCAA TGCCGCGTGA ATGAAGAAGG CCTTCGGGTT
401 GTAAAGTTCT TTCGTGGAGG ACGAAAAGGT GGGTGCTAAT ACCGCCTGCT
451 GTTGACGTGA ATCCAAGAAG AAGCACCGGC TAACTCCGTG CCAGCAGCCG
501 CGGTAATACG GGGGGTGCAA GCGTTAATCG GAATCACTGG GCGTAAAGGG
551 TGCGTAGGCG GTGCATTAGG TCTGTGCTGA AATCCCCGGG CTCAACCTGG
601 GAATGGCGGT GGAAACCGGT GTACTAGAGT ATGGGAGAGG GTGGTGGAAAT
651 TCCAGGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT CTGGAGGAAC ATCAGTGGCG
701 AAGGCGGCCA CCTGGCCCAA TACTGACGCT GAGGCACGAA AGCGTGGGGA
751 GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCCTAAAC GATGAATACT
801 AGATGTTTGG TGCCAAGCGT ACTGAGTGTC GTAGCTAACG CGATAAGTAT
851 TCCGCCTGGG AAGTACGGCC GCAAGGTAA AACTCAAAGG AATTGACGGG
901 GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGATGC AACCGGAAGA
951 ACCTTACCTG GGCTTGACAT GTCTGGAATC CTGCAGAGAT GCGGGAGTGC
1001 CCTTCGGGGA ATCAGAACAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT
1051 CGTGAGATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCCT TGTCCTTAGT
1101 TGCCAGCGGT TCGGCCGGGC ACTCTAGGGA GACTGCCGGT GACAAACCGG
1151 AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCCTCAT GGCCTTTATG TCCAGGGCTA
1201 CACACGTGCT ACAATGGCGC GTACAGAGGG AAGCCAAGCC GCGAGGTGGA
1251 GCAGACCCCA GAAAGCGCGT CGTAGTTCGG ATTGCAGTCT GCAACTCGAC
1301 TGCATGAAGT CGGAATCGCT AGTAATCGCG GATCAGCATG CCGCGGTGAA
1351 GACGTTCCCG GGCCTTGTAC ACACCGCCCG TCACACCATG GGAGTGGATT
1401 GTACCAGAAG CCGTTAGCCT AACCTTCGGG AGGGCGATGA CCACGGTATG
1451 GTTCATGACT GGGGGTGAAG TCGTAAC

```

Figura 9: Secuencia del 16S ADNr del aislado THA.

Con el propósito de investigar el significado de la diferencia en el tamaño del espaciador, fueron secuenciados

las regiones espaciadoras de THA y de *T. thiooxidans* DSM 504 (esta cepa tiene un espaciador de igual tamaño al de la cepa ATCC). La secuenciación directa de las regiones espaciadoras fue realizada después de la amplificación con los partidores G1 y L1, tal como se describió anteriormente (Jensen, 1993; Pizarro, 1996b). El alineamiento de las secuencias de los espaciadores de THA, *T. thiooxidans* DSM 504 y de *T. ferrooxidans* A4, mostradas en la Figura 10, indicó que esta región tiene regiones altamente homólogas en los extremos unidas por una región central heteróloga (se utilizó el programa FASTA). Los 80 a 100 nucleótidos de la región heteróloga fueron difíciles de alinear, ya que la similaridad en esta zona fue sólo del 30% con secuencias idénticas que no superaban los 6 nucleótidos continuos de largo. Este porcentaje de similaridad se obtuvo luego de incorporar inserciones y deleciones al alineamiento. Los 276 nucleótidos próximos al gen 16S ARNr y los 126 nucleótidos próximos al gen 23S ARNr tuvieron un 98.9% y un 100% de homología respectivamente.

```

TTDSM504      N T T G G G C G G G G G A A C T G C G G C T G G A T - C A C C T C C T T T A A A G A A A T G   45
THA           G T G G G A A C T G C G G C T G G A T T C A C C T C C T T T A A A G A A A A G   39
TF A4        C T C G A A T C A A C T C G G G A - - - G C A T C C A G A T - C A C C T C C T T T A A A G A A A A G   46

TTDSM504      G G T C C T A G A C C C C A C A C A C G C C A C T C G G T A A A G A A T C G G G C C T A T A G C T C   95
THA           G G T C C T A G A C C C C A C A C A C G C C A C T C G G T A A A G A A T C G G G C C T A T A G C T C   89
TF A4        G G T C - T A G A C C C C A C A C A C G C C A C T C G G T A A A G A A T T G G G C C T A T A G C T C   95

TTDSM504      A G C T G G C T A G A G C A C A C G A C T G A T A A T C G T G A G G T C A G T G G T T C G A G T C C   145
THA           A G C T G G C T A G A G C A C A C G A C T G A T A A T C G T G A G G T C A G T G G T T C G A G T C C   139
TF A4        A G C T G G C T A G A G C A C A C G C C T G A T A A G C G T G A G G T C A G T G G T T C G A G T C C   145

TTDSM504      A C T T G G G C C C A C C A A A T G G G G C T G T A G C T C A G C T G G G A G A G C A C C T G C T T   195
THA           A C T T G G G C C C A C C A A A T G G G G C T G T A G C T C A G C T G G G A G A G C A C C T G C T T   189
TF A4        A C T T G G G C C C A C C A A - T G G G G C T G T A G C T C A G T T G G G A G A G C A C C T G C T T   194

TTDSM504      T G C A A G C A G G G G G T C A C C G G T T C G A T C C C G G T C A G C T C C A C C A A A G G G A -   244
THA           T G C A A G C A G G G G G T C A C C G G T T C G A T C C C G G T C A G C T C C C C A A A G G G A -   238
TF A4        T G C A A G C A G G G G G T C A T C G G T T C G A G A C C G G T C A G C T C C A C C A C A G G G A T   244

TTDSM504      A G A - G G - C C C G C G C G C A G C G - G G T C G G A C G C T G G G G T G G A G A A G T A G G C G   291
THA           A G A - G G - C C C G C A C A C A G C G - G G T C G G A C G C T G G G G T G G A G A A G T A G C C G   285
TF A4        A G A A G G T C C C G C A A A G A G C G C G G T T C G - - - C T G G G G A - - A G C A G T A G - - -   286

TTDSM504      G C A G G A A G C G G G T C G G A C C C T G G G G T G G A G A A G T A G G C G G C A G G A A G C G G   341
THA           C C A G T A G A T G A A A A A G A G T A A A T A G A G A T T C A G A G A G T A G T A G C A G T G G T   335
TF A4        - - A G A A G G G G T T T A G G - - - - - - - G - - - T T T A G T G T G T A G T - - - - G C T G A   319

TTDSM504      G T A A C A G G T A A C A G G A A G T A G A G A A T A G G A A A G T A A T T A A A G A G T C C G T A   391
THA           A G A T C A T T T - - - - - A A A T C G A T C A T T G - - - - - - - T A A G G A G T C C G T A   370
TF A4        A T A A C G C T T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T A G G G A T G T A G G A   341

TTDSM504      G T A G T G A G T T T C T G A A T A A A G A A G C T G A G T A C T A C C G A T T C G C A G T A T G G   441
THA           G T A G T G A G T T T C T G A A T A A A G A A G C T G A G T A C T A C C G A T T C G C A G T A T G G   420
TF A4        - - A G T A A G G T G C T - - A T - - - - - - - T G A T C A C T G C C C A C T C G G A A G A T T G   379

TTDSM504      A A - G C G G T A T T G T - T C T T T G A C A G T T G A G G A A G G G A A G G C C A T G T T T G T C   489
THA           A A - G C G G T A T T G T - T C T T T G A C A G T T G A G G A A G G G A A G G C C A T G T T T G T C   468
TF A4        A G T G C G T T A G T T T G T C T T T G A C A G T T G A G G A A G G G A A G G C C A T G T T T G T C   429

TTDSM504      A T C T T T C C G A T G G C A G A C C T C C A G G T G G A T G C C T G N G G A T A T A T G G T C A A   539
THA           A T C T T T C C G A T G G C A G A C C
TF A4        A T C T T G C C G A T G G C A G A C C T C C A G G T G G   457

TTDSM504      T G A T C C   545
THA           487
TF A4        457

```

Figura 10: Alineamiento de las secuencias de las regiones intergénicas de los genes ribosomales 16S y 23S, de *THA*, *T. thiooxidans* DSM 504 (TTDSM504) y *T. ferrooxidans* A4 (TF A4). El símbolo (-) representa un espacio (con el propósito de mejorar el alineamiento). Las regiones sombreadas representan secuencias idénticas entre las tres bacterias.

Una representación esquemática de la similaridad entre los espaciadores de THA, *T. thiooxidans* DSM 504, y *T. ferrooxidans* cepa A4 (Sagredo, 1992), es mostrada en la Figura 11.

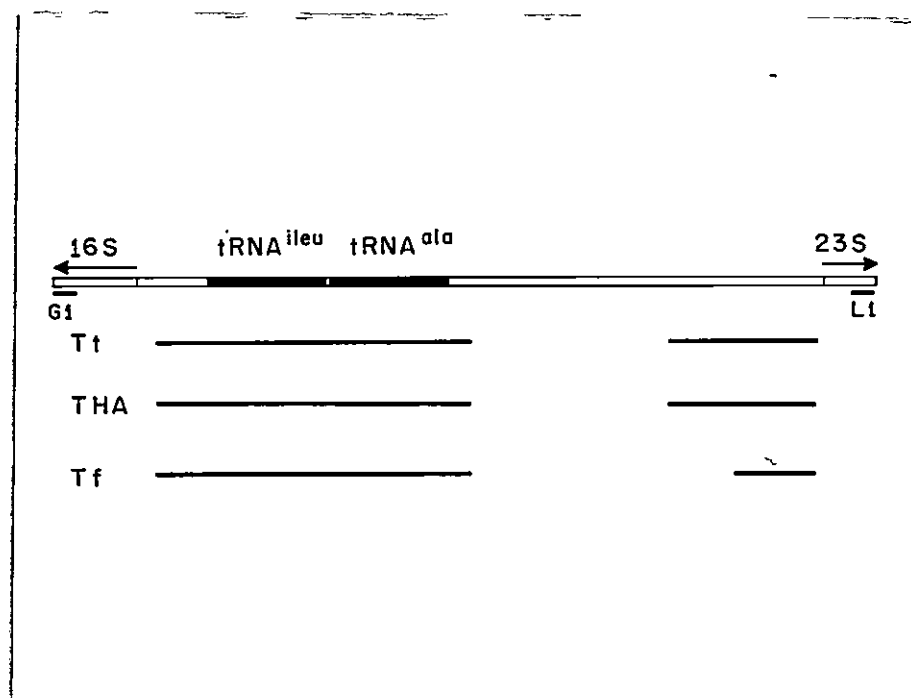


Figura 11: Representación esquemática de la similitud de secuencia entre las regiones intergénicas del 16S y 23S ARNr de diferentes bacterias. Tt DSM 504, *T. thiooxidans* DSM 504; Tf A4, *T. ferrooxidans* A4; THA, bacteria aislada capaz de crecer en alta concentración de ácido. La región conservada está indicada por ████████. G1 y L1 indican la posición de los partidores.

Los segmentos conservados y variables entre THA y *T. thiooxidans* DSM 504 estaban también presentes en *T. ferrooxidans* A4, pero en diferente magnitud. Entre THA y *T.*

thiooxidans se observó una región homologa más larga en la parte próxima al 23S ARNr. Al igual que en el espaciador de *T. ferrooxidans* (Sagredo, 1992; Salazar, 1989), la región próxima al 16S ARNr, de *T. thiooxidans* y THA incluye los ARN de transferencia para isoleucina y alanina, y la región próxima al 23S ARNr posee una secuencia antiterminadora del tipo Box A (Sagredo, 1992).

2.2.2. Caracterización fenotípica de THA.

La característica fenotípica más relevante de THA es su capacidad para crecer en un ambiente de extrema acidez, por lo tanto esta propiedad fue estudiada más extensamente. La resistencia relativa frente al ácido, de THA respecto de *T. thiooxidans* ATCC 19377, fue estudiada cultivando THA y *T. thiooxidans* en medio MS9b y azufre elemental, con cantidades crecientes de ácido sulfúrico (desde 0.02 N a 1.5 N). El crecimiento bacteriano fue medido en el medio de cultivo a los 18 días, determinando la turbidez a 420 nm, después de decantar el azufre. El resultado de esta comparación, mostrado en la Figura 12, indicó que la resistencia frente al ácido de THA, no es mucho mayor que la de *T. thiooxidans* ATCC 19377. Se pudo observar que desde 1.1 N, THA crece mejor que *T. thiooxidans*. Aunque THA fue más resistente al ácido

sulfúrico, esta diferencia no explica completamente la selección de THA observada después del cultivo en azufre elemental y 0.7 N de ácido sulfúrico (Figura 7). Tal como se observó en la Figura 12, *T. thiooxidans* ATCC 19377 fue también capaz de crecer eficientemente a esta concentración de ácido sulfúrico.

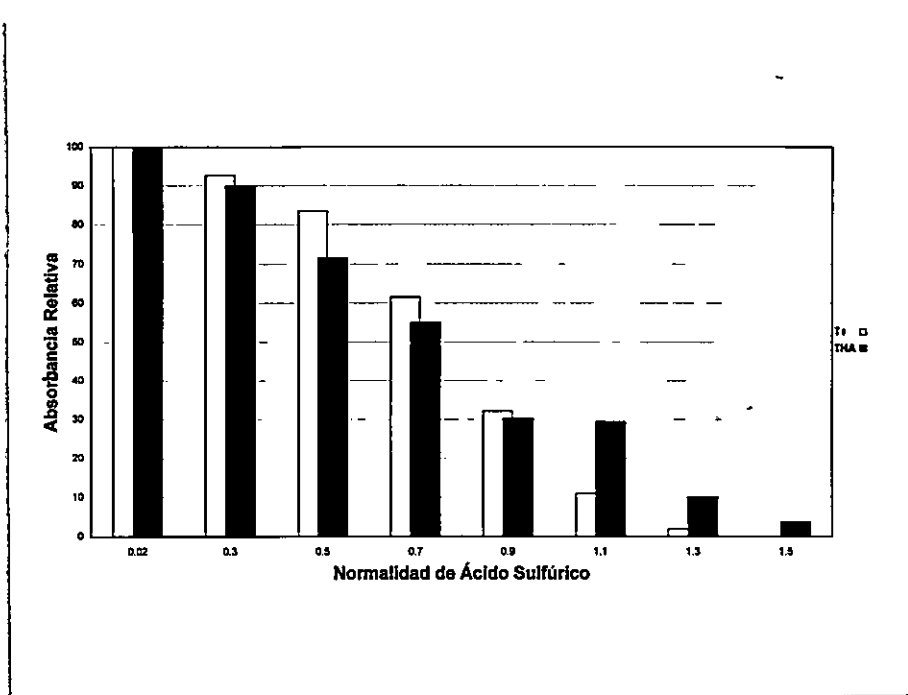


Figura 12: Crecimiento de THA y *T. thiooxidans* ATCC 19377 en medio salino MS9b con azufre elemental a concentraciones crecientes de ácido sulfúrico. En cada cultivo se utilizaron igual número de bacterias, las que previamente fueron crecidas en ácido sulfúrico 0.7 N y azufre elemental. La magnitud del crecimiento bacteriano fue medido después de 18 días de incubación, por la turbidez en el sobrenadante del cultivo, después de la sedimentación del azufre a 1X g. La

turbidez fue medida indirectamente midiendo la absorbancia a 420 nm. El valor de 100% corresponde a los valores de absorbancia de 0.9 para THA y 1.0 para *T. thiooxidans*. Las determinaciones fueron hechas en duplicado.

Adicionalmente, fueron realizadas comparaciones de la actividad bacteriana determinando el consumo de oxígeno de THA y *T. thiooxidans* ATCC 19377. Los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos comparando el crecimiento a diferentes pHs (no mostrados).

3. Estimación de la heterogeneidad de una población bacteriana, por la formación de heteroduplex entre los productos de amplificación del 16S ADNr.

La amplificación del ADN total de una población bacteriana con partidores específicos para el 16S ADNr, permite obtener una mezcla de amplificados de 16S ADNr presentes en la población. La desnaturalización y posterior renaturalización de estos amplificados, genera heteroduplex además de homoduplex. Los heteroduplex, con regiones no homologas, tendrán una movilidad electroforética, en geles de poliacrilamida, menor que los homoduplex (Delwart, 1993), ya que las zonas no homologas en estado de hebra simple presentan menor migración que las de doble hebra en geles de poliacrilamida (Yap, 1994; Jensen, 1993b). Por lo tanto, a mayor disimilaridad entre los amplificados del 16S ADNr, mayor será el retardo en la migración electroforética, ya que la proporción de ADN en estado de simple hebra (zonas no homologas) será mayor (Delwart, 1993).

3.1 % de homología y retardo en la migración electroforética de los heteroduplex de 16S ADNr.

Con el propósito de visualizar esta relación se prepararon amplificados del 16S ADNr de las siguientes bacterias: *E. coli*, *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans*. El

porcentaje de similaridad del 16S ADNr de *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans* respecto a *E. coli* es de un 82 %. El porcentaje de similaridad entre *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans* es de un 98.5 %. De acuerdo a esta homología los heteroduplex formados entre *E. coli* y *T. ferrooxidans* o *E. coli* y *T. thiooxidans*, deberían tener una migración electroforética bastante reducida. Así mismo, el heteroduplex formado entre los amplificadores de *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* debería tener una movilidad electroforética muy cercana al del homoduplex. La migración de los heteroduplex fue la esperada como se muestra en la Figura 13.

Cada una de las hebras del amplificado, positiva y negativa, puede formar dos heteroduplex que generalmente presentan diferente movilidad (Jensen, 1993b; Delwart, 1993). A esto se debe la observación de dos bandas de heteroduplex, como se observó en la Figura 13.

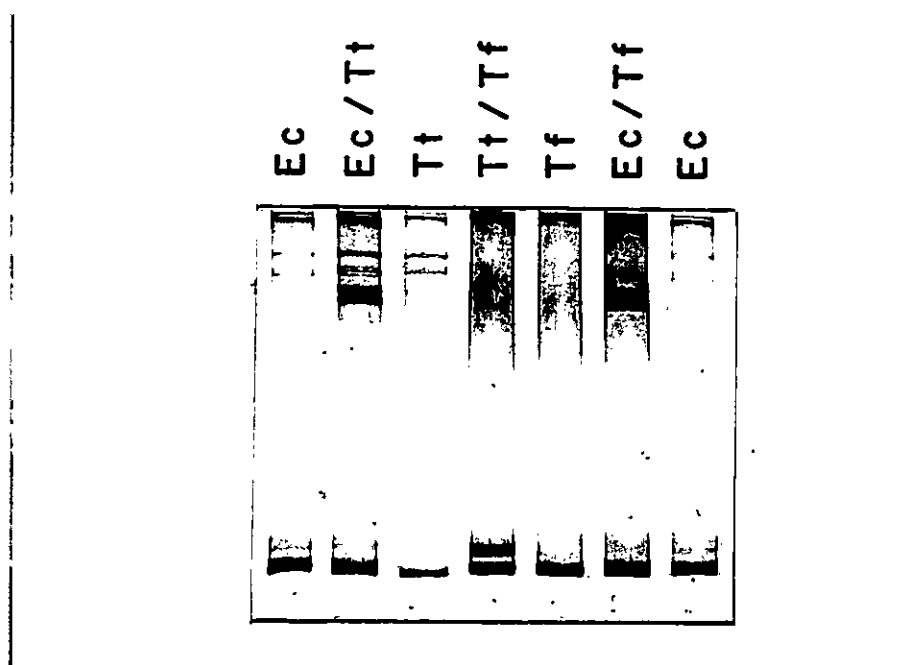


Figura 13: Electroforésis en gel de poliacrilamida de los homoduplex y heteroduplex formados entre los productos de amplificación del 16S ADNr de bacterias. Los carriles Ec corresponden al homoduplex nativo de *E. coli*. Los carriles Tt y Tf corresponden al homoduplex nativo de *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans*, respectivamente. Los carriles Ec/Tt, Tt/Tf y Ec/Tf corresponden a los homoduplex y heteroduplex formados al denaturar el amplificado de *E. coli* y *T. thiooxidans*; *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans*; *E. coli* y *T. ferrooxidans*, respectivamente, durante 2 minutos a 96°C y luego renaturar 3 minutos a 72°C.

4. Determinación de la presencia de Archaea en sistemas de biolixiviación.

4.1. Detección preliminar de Archaea en la solución de lixiviación de la planta de extracción de cobre "Lo Aguirre".

La presencia de archaea fue inicialmente detectada en la solución lixivante utilizada en la mina Lo Aguirre (Refino) y en cultivos de esta solución. Los microorganismos presentes en el Refino fueron cultivados en un medio sintético (Refino Sintético) cuyas características de pH, concentración de ion ferroso y sulfato son similares a las del Refino de la planta. Posteriormente, el ADN extraído de las bacterias presentes en los subcultivos 4, 5 y 6 fue amplificado usando los partidores 23F y 1392R para el 16S ADNr. El primero específico para archaea y el segundo universal. La electroforesis del producto mostró varias bandas, una de las cuales tenía el tamaño esperado para el amplificado del 16S ADNr. Esta banda de aproximadamente 1400 pb, apareció aumentada en los últimos subcultivos.

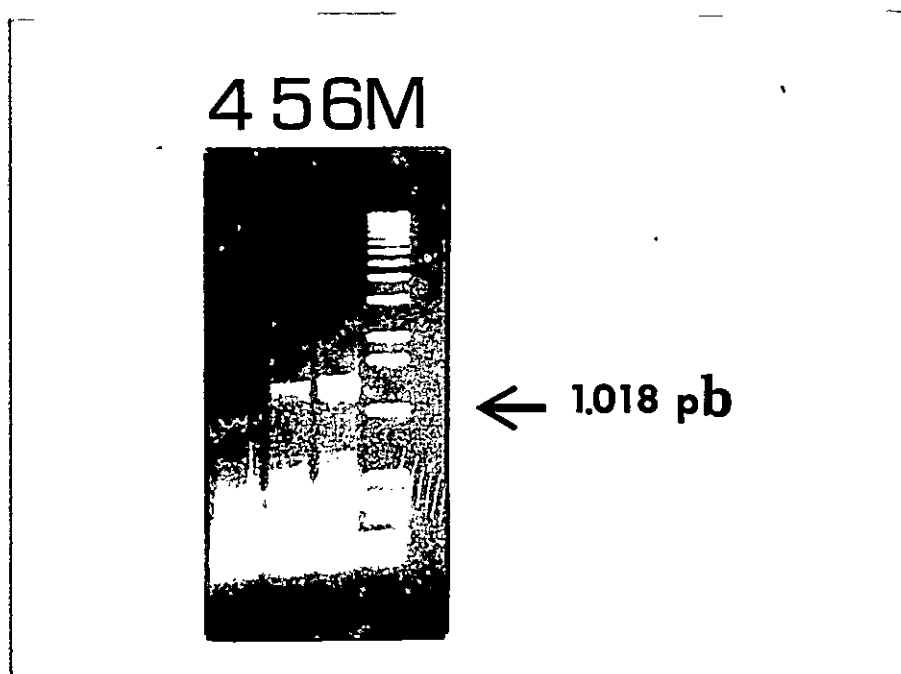


Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación por PCR del 16S ADNr, usando los partidores 23F y 1392R. El ADN utilizado en la amplificación corresponde al de los subcultivos 4 (carril 4), 5 (carril 5) y 6 (carril 6) en refino sintético. El inóculo inicial fue el 1% v/v de refino de la planta Lo Aguirre. M corresponde al marcador ladder GIBCO de 1 Kb.

4.1.2 Secuenciación del 16S ADNr amplificado, de la población de archaea presente en Refino de planta.

El fragmento de 1400 pb fue recuperado desde un gel de agarosa en la forma descrita en materiales y métodos, y luego secuenciado. Para esta secuenciación se utilizó el partidore

340R (5' CCTGCTGCGCCCCGTAGG 3'), específico para archaea y que funcionaba eficientemente para otras archaea (comunicación personal Dr. Edward Moore). La secuencia obtenida, de 157 nucleótidos, se comparó con las existentes en el banco de secuencias del Ribosomal Data Projects (RDP). La secuencia se muestra en la Figura 15. Las secuencias más similares correspondieron todas al dominio Archaea. La región secuenciada no presentó ambigüedades indicando que el producto de amplificación tenía una secuencia única.

```

1  CAGTGTCCAT CTCCGGGCGA CCCTCCCAGG GCCCGTACCC GTCTGAGGCT
51 AGGTGGTCCA TTACACCACC TACTACCTGA TAGGTCGCAG ACTCATCCTT
101 GAGCGTCGTA ACTTTTATTG CAAAAACATT CCAGTTTTAA GCAATTATAW
151 GGTATTA

```

Figura 15: A. Secuencia parcial del producto de amplificación de 1400 pb, obtenido con los partidores 23F y 1392R a partir del ADN total del sexto subcultivo de Refino de la planta "Lo Aguirre".

4.2 Especificidad de los partidores utilizados en la detección de Archaea.

Debido a que la amplificación del ADN de los subcultivos de PS, utilizando los partidores F23 y R1392 no fue específica, como se observó en la Figura 14, el partidore universal R1392 fue reemplazado por el partidore R958,

específico para archae. Para probar la especificidad de estos partidores fueron utilizados como templados ADNs de la archaea *Sulfolobus acidocaldarius* cepa BC y de las bacterias *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y "*L. ferrooxidans*".

La comparación de las amplificaciones realizadas con ambas parejas de partidores, F23 con R1392 y F23 con R958, es mostrada en la Figura 16. La amplificación hecha con los partidores F23 y R1392 dió como resultado bandas adicionales al fragmento esperado para *Sulfolobus acidocaldarius* cepa BC, y varias bandas débiles para bacterias (*T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y "*L. ferrooxidans*"). En la amplificación con los partidores F23 y R958 en cambio, se observó que amplifican específicamente el ADN de archaea, obteniéndose una sola banda del tamaño esperado. De acuerdo a estos resultados, esta última combinación de partidores se utilizó para la confirmación de la presencia de archaea en el sistema.

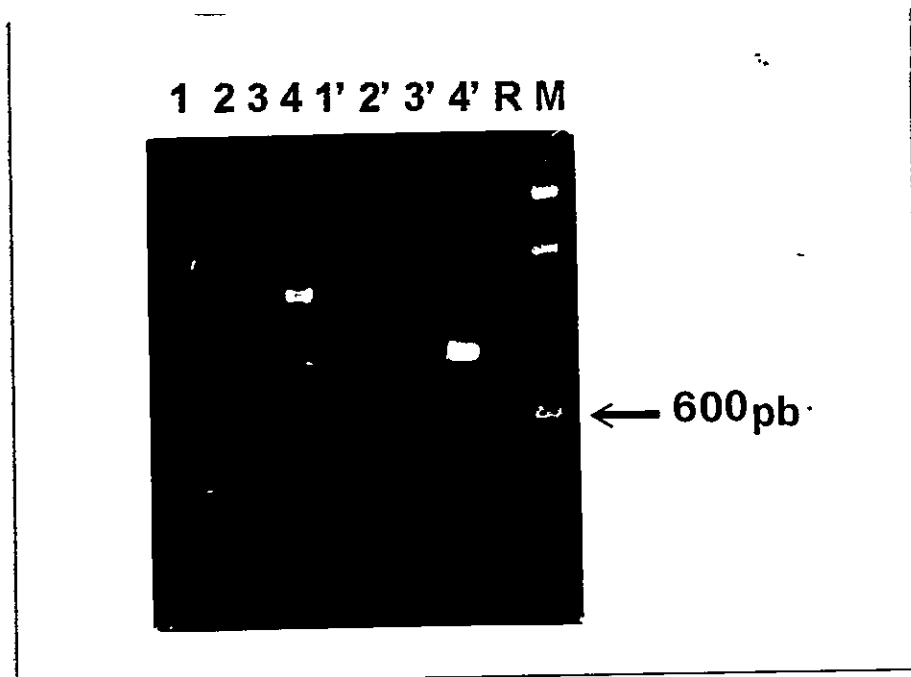


Figura 16: Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación por PCR del 16S ADNr de bacterias y de archaea, utilizando los partidores F23 con R1392 (carriles 1-4) y F23 con R958 (carriles 1'-4'). El ADN utilizado en la amplificación fue el de *T. ferrooxidans* (carril 1 y 1'), *T. thiooxidans* (carril 2 y 2'), *L. ferrooxidans* (carril 3 y 3') y *Sulfolobus acidocaldarius* cepa BC (carril 4 y 4'). El carril R corresponde al control de reactivos. El carril M muestra el marcador ladder GIBCO de 100 pb.

4.3. Cultivo y selección de la población de Archaea originalmente presente en mineral.

La presencia de *archaea* fue investigada en el mineral aglomerado y lixiviado en una columna con Refino de la planta "Lo Aguirre". El refino tenía un pH de 1.6, 120 g/L de ion sulfato, 2.7 g/L de ion ferroso y 4.5 g/l de fierro total. Como control se preparó otra columna con el mismo mineral pero lixiviada con medio mínimo MS9b, utilizado generalmente para los cultivo de laboratorio.

Las muestras de mineral aglomerado fueron tomadas a los 120 días de lixiviación, cuando la extracción de cobre era de un 97%. Utilizando como inóculo el mineral colonizado, se prepararon cultivos en ion ferroso, azufre, calcopirita y extracto de levadura. El medio utilizado en estos cultivos fue el Refino de la planta Lo Aguirre. Debido a que esta solución contiene casi 3 g/L de ion ferroso, no se agregó ferroso adicional a los cultivos en ion ferroso, en este caso el medio fue esterilizado por filtración a través de un filtro de 0.2 μ m. En los cultivos en azufre, calcopirita y extracto de levadura, el ion ferroso fue oxidado con peróxido de hidrogeno previo a la adición del nutriente, y luego el Refino fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 20 minutos.

Una vez realizados cuatro o cinco subcultivos a 30°C en cada fuente de energía, se extrajo el ADN de las bacterias presentes en el cultivo.

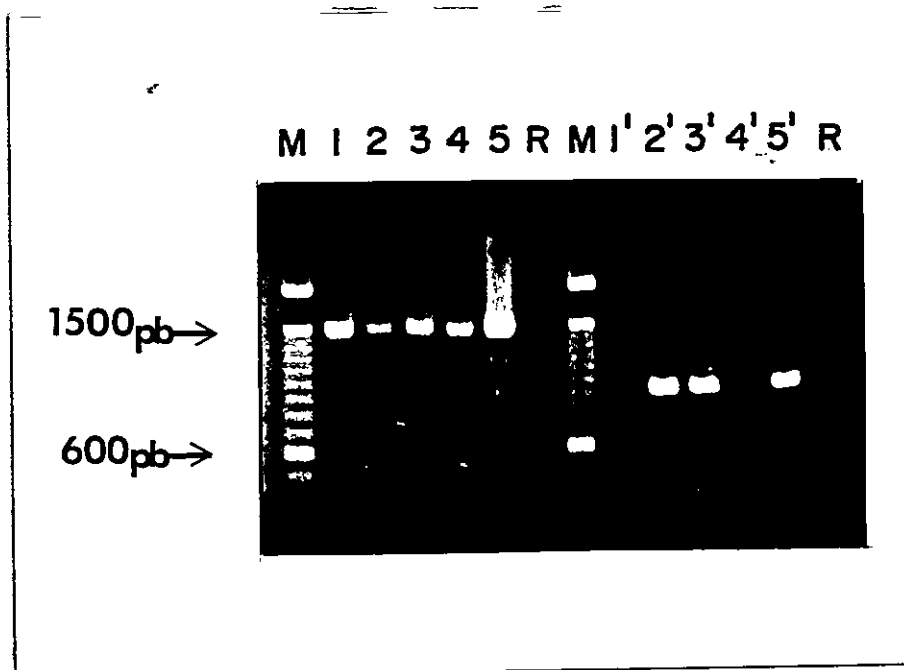


Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, de los productos de amplificación por PCR del 16S ARNr, a partir del ADN extraído de mineral, bacterias y archaea. Se utilizaron los partidores para bacterias Eubac27F- R1492 (carriles 1-5) y para archaee F23-R958 (carriles 1'-5'). Fueron utilizados los ADN de las siguientes especies: *T. thiooxidans* (carriles 1 y 1'), *Sulfolobus acidocaldarius* (carriles 2 y 2'), mineral lixiviado con refino de planta (carriles 3 y 3'), mineral lixiviado con medio MS9b (carriles 4 y 4') y 4^{to} subcultivo en ion ferroso, cuyo inóculo original fue mineral lixiviado con refino de planta (carriles 5 y 5'). El carril R corresponde al control de reactivos. El carril M corresponde al marcador de peso molecular ladder GIBCO de 100 pb.

También se observó amplificación específica en los subcultivos azufre y calcopirita, como se muestra en la

4.4. Detección de Archaea en mineral lixiviado con refino de planta.

Una vez obtenido el ADN del mineral y de los subcultivos en las diferentes fuentes de energía, como se describe en el punto anterior, este fue amplificado con partidores específicos para bacterias (Eubac27F y R1492) y para archaea (F23 y R958). Los resultados (Figura 17) mostraron que la pareja de partidores específicos para archaea F23 y R958 amplifican el ADN de la muestra de mineral lixiviado con refino de planta y no el del mineral lixiviado con medio sintético. A su vez hay amplificación positiva también para el ADN de los subcultivos en ion ferroso.

Figura 18. No se detectó el producto de amplificación específico de archaea en el subcultivo en extracto de levadura (datos no mostrados).



Figura 18: Electroforesis en gel de poliacrilamida, teñido con nitrato de plata, de los productos de amplificación por PCR (utilizando los partidores F23 y R958) del 16S ARNr, de los ADNs extraídos de diferentes muestras. *Sulfolobus acidocaldarius* cepa BC, carril 1; quinto subcultivo en azufre elemental, cuyo inóculo original fue mineral lixiviado con refino de planta, carril 2; cuarto subcultivo en calcopirita, cuyo inóculo original fue el mismo utilizado en los cultivos en azufre, carril 3. El carril 4 muestra el marcador de peso molecular ladder GIBCO de 100 pb.

4.5 Homogeneidad de la población de Archaea presente en mineral.

La posible heterogeneidad del producto de amplificación del 16S ADNr fue examinada a través de la formación de heteroduplex, previa desnaturalización y renaturalización, según condiciones descritas en Métodos. El 16S ADNr amplificado del ADN procedente del mineral lixiviado con Refino no formó heteroduplex, lo cual indicó que la población presente es homogénea en 16S ARNr, sugiriendo que hay sólo un tipo de archaea en la muestra (Figura 19). Cuando el amplificado del 16S ADNr de *Sulfolobus acidocaldarius*, una archaea quimioautotrófica aislada en sistemas similares a los de biolixiviación (Rossi, 1990), fue desnaturalizado y renaturalizado, en mezcla con el amplificado procedente del mineral, se observó la formación de una sola banda de muy baja migración. Esto indicó que existe una baja homología entre el amplificado del 16S ADNr de la muestra de mineral y el de *Sulfolobus acidocaldarius* (Figura 19).

En los carriles 4, 5, 6, 8 y 9 de la Figura 19 se observaron bandas entre los homoduplex y las hebras simples, estas corresponden a simples hebras de un producto de amplificación de menor tamaño, que se distingue levemente en los carriles 3' y 5' de la Figura 17. Es posible identificar estas bandas como ADN de hebra simple y distinguirlas del ADN

de hebra doble porque aparecen disminuidas después de la renaturalización y son de color rojizo, en vez del característico negro del ADN de doble hebra, después de la tinción con nitrato de plata (Lee, 1996; Espejo, 1993).

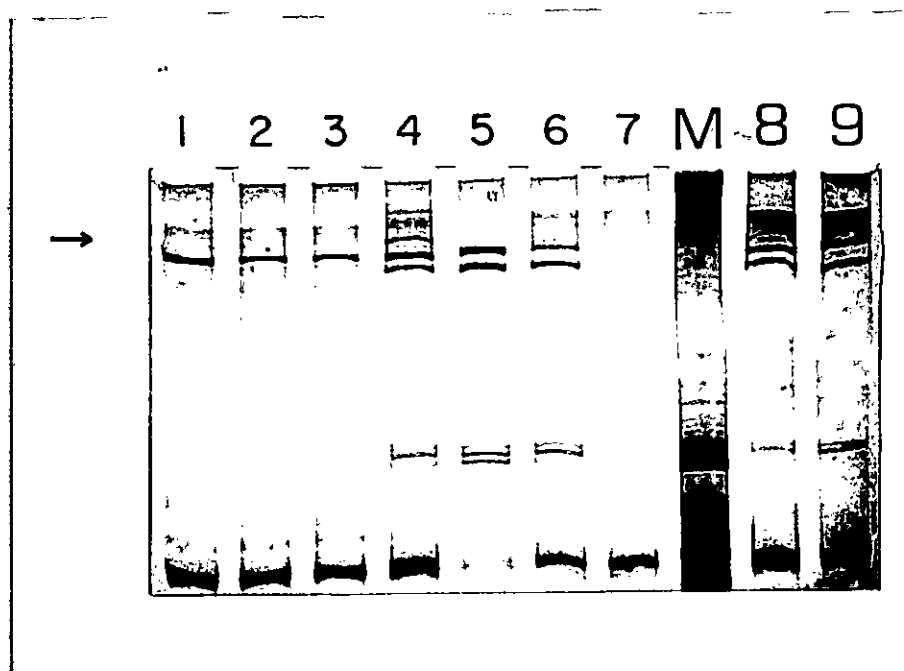


Figura 19: Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de amplificación del 16S ADNr de archaea procedentes de mineral lixiviado y de cultivos, solo o en combinación con *S. acidocaldarius*, después de desnaturalización y renaturalización.

Los carriles 1, 2 y 3 corresponden al 16S ADNr amplificado de *S. acidocaldarius*, nativo, desnaturalizado y renaturalizado a 72°C, y desnaturalizado sin renaturalizar, respectivamente. El carril 4 corresponde a la mezcla de los productos de amplificación de mineral lixiviado y de *S. acidocaldarius*, desnaturalizado y renaturalizado a 72°C. Los carriles 7, 6 y 5 corresponden a 16S ADNr amplificado desde mineral, nativo, desnaturalizado y renaturalizado a 72°C, y desnaturalizado sin renaturalizar, respectivamente. El carril 8 corresponde al producto de amplificación del 16S ADNr del cultivo en ion ferroso (cuarto subcultivo), desnaturalizado y renaturalizado en mezcla con *S. acidocaldarius*. El carril 9 corresponde sólo al amplificado del cultivo en ion ferroso (el mismo del carril 8), desnaturalizado y renaturalizado. M corresponde al marcador de peso molecular ladder GIBCO (100bp). El heteroduplex formado está indicado por →.

4.5.1 Formación de heteroduplex entre el amplificado del 16S ADNr de *S. acidocaldarius*, marcado radiactivamente y amplificados del 16S ADNr de mineral y cultivos.

Para confirmar que entre el 16S ADNr de *S. acidocaldarius* y el amplificado proveniente de ADN extraído de mineral se forma un solo heteroduplex, y descartar la formación de heteroduplex de migración similar o igual al homoduplex, se marcó radiactivamente el producto de amplificación del 16S ADNr de *Sulfolobus*, utilizando α -P³² ATP en la amplificación. Este fue posteriormente hibridizado con amplificados de 16S ADNr del ADN de los cultivos en azufre, ion ferroso y calcopirita. Cada una de las muestras formó un solo heteroduplex (flecha en Figura 20) de igual migración, idéntico al ya detectado anteriormente (flecha en Figura 19), entre las dos hebras simples de *Sulfolobus acidocaldarius*.

La formación de un único heteroduplex, de baja migración indica la presencia de un solo microorganismo del dominio archaea muy poco relacionada con *Sulfolobus acidocaldarius*. Considerando que se trataba de un amplificado homogéneo en secuencia diferente de *S. acidocaldarius*, los amplificados del 16S ADNr de ADN procedente de mineral y del cuarto subcultivo en ion ferroso fueron directamente secuenciados.

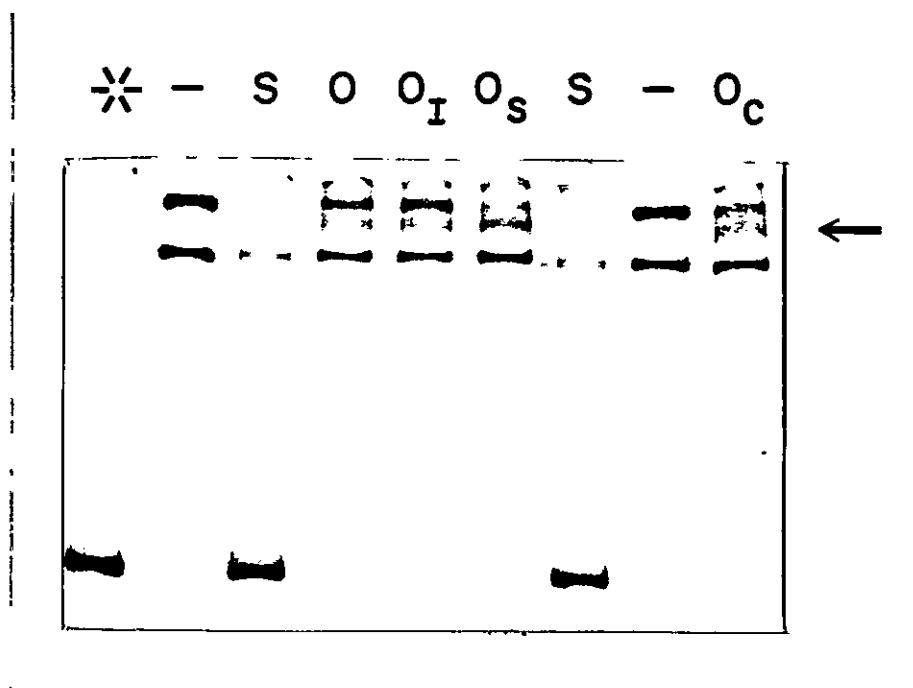


Figura 20: Hibridización de 16S ADNr de *S. acidocaldarius* marcado radiactivamente con 16S ADNr amplificado de mineral y cultivos. 16S ADNr de *S. acidocaldarius* fue marcado radiactivamente durante la amplificación con α - P^{32} deoxiadenosina trifosfato (Delwart, 1995). El producto marcado (*) fue posteriormente desnaturalizado y renaturalizado ya sea solo (-) o en mezcla con 16S ADNr obtenido de *S. acidocaldarius* (S), mineral lixiviado (O), cultivo en ion ferroso (O_I), azufre elemental (O_S), o calcopirita (O_c). Después de la electroforesis el gel fue secado y sometido a autoradiografía. El heteroduplex formado está indicado por →.

4.6. Secuenciación del 16S ADNr, amplificado con partidores específicos para archaea, desde ADN obtenido de mineral y de cultivo en ion ferroso.

Las secuencias parciales, tanto del amplificado procedente de mineral como del de cultivo en ion ferroso, fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. Edward Moore (GBF-Braunschweig). Estas presentaron indeterminaciones mínimas lo que sugirió identidad (Figura 21). A su vez esta secuencia parcial contenía a la detectada inicialmente en los cultivos del Refino de la planta "Lo Aguirre". La comparación de esta secuencia con otras existentes en el banco de datos del RDP, mostró que la especie más estrechamente relacionada corresponde a *P. oshimae* (Figura 21, B), una archaea acidófila recientemente descubierta (Schleper, 1995). El archaeon conteniendo este 16S ADNr se ha nombrado Aglo 120.

A.

5'

TCCGGTTGAT CCTGCCRCGG GCCACTGNTA TCAAGTTCCG ANTAAGCCAT 50
 GCGAGTCAAG GTATCGTAAG ATGCCGGCAA ACTGCTCAGT AACACGTGGA 100
 TAATCTAACC TTGAGTAAGG GATAACTTCG GGAAACTGAA GGTAATACCT 150
 TATAATTGCT TAAAACTGGA ATGTTTTTGC AATAAAAGTT ACGACGCTCA 200
 AGGATGAGTC TGCGACCTAT CAGGTAGTAG GTGGTGTAAAT GGACCACCTA 250
 GCCTCAGACG GGTACGGGCC CTGGGAGGGG TAGCCCGGAG ATGGACTCTG 300
 AGACATAAGT CCAGGCCYTA CGGGGCGCAG CAGGCGGCGA AACTGTGCA 350
 ATGCGCGAAA GCGCGACACG GGNAGCTTG AGTGTCTTGG CATAGCCAAG 400
 ACTTTTCTCA TTCCTAAAAA GCATGAGGAA TAAGTGCTGG GTAAGACSGG 450
 TGCCAGCCGC CGCGGTAACA CCCGCAGCAC GAGTAGTGGT CACTTTTATT 500
 GAGCCTAAAG CGTTCGTAGC CGGTTTTGTA AATCTTCAGA TAAAGCCTGA 550
 AGCTTAACTC CAGAAAGTCT GAAGAGACTG CAAGACTTGA GATCGGGTGA 600
 GGTAAACGT ACTTTCAGGG TAGGGGTAAA ATCCTGTAAT CCCGGAAGGA 650
 CGACCAAGTG CGAAAGCGTK KAACTAGAAC GAATCTGAMR GTARGNAACG 700
 AAGGCTAGGG TRRCAARYNG GATYARATAC CCGGGTAGTC CTAGCTGTAA 750
 ACATTGCCCA TTTGATGTTG CTTTTCCGTT GAGGGAAGGC AGTGTCGGAG 800
 CGAAGGTGTT AAATGGGCCG CTTGGGAAGT ATGGTCGCAA GACTGAAACT 850
 TAAAGGAATT GCGGGGGGAG CACCGCAACG GGAGGAATGT GCGGTTTAAAT 900
 TGGAGTCCAC GC 3' 912

B.

Especies mas relacionadas con Aglo 120	% de identidad
<i>P. oshimae</i> 16S rRNA gene.	86.4
<i>Thermoplasma acidophilum</i> 16S rRNA	84.4
<i>Methanococcus jannaschii</i>	72.4
Archaeal sp. (clon SBAR16) ribosomal	72.2
Archaeal sp. (clon WHARN) ribosomal	71.3
Unidentified hydrothermal vent arch.	72.0
<i>Thermococcus peptonophilus</i> gene	70.6
<i>Thermococcus</i> sp. gene for 16S ribosomal	70.6
<i>Archaeobacterium</i> clon ANTARCTIC5 16S	71.6
<i>Archaeobacterium</i> clone OARB 16S rRNA	73.4

Figura 21: A. Secuencia parcial del 16S ADNr amplificado desde ADN de mineral lixiviado con refino de planta. La secuenciación directa del fragmento de 930 pb, amplificado con los partidores F23 y R958 fue realizada en un secuenciador automático Applied Biosystems 373. Los nucleótidos destacados corresponden a la secuencia del 16S ADNr obtenida del 4^{to} subcultivo en ferroso, de microorganismos provenientes de mineral lixiviado con refino de planta. B. Especies cuyo 16S ADNr tiene mayor relación con la secuencia determinada (915 posiciones) y los % de homología respectivos.

4.7. Relaciones filogenéticas entre el archaeon Aglo 120, aún no identificado, y las archaea ya descritas.

El archaeon detectado en el refino de la planta de biolixiviación "Lo Aguirre" y en el mineral lixiviado con refino de planta tuvo una secuencia de 16S ADNr, lo suficientemente diferente de las ya descritas, como para ser considerado una nueva especie, de un nuevo género, dentro de una nueva familia en el orden *Thermoplasmales*, de la subdivisión *Euryarchaeota*, del dominio *Archaea* (Schleper, 1995; Woese, 1990). El dendrograma de la Figura 22, muestra la posición filogenética de Aglo 120 en relación a otras *archaea* ya descritas.

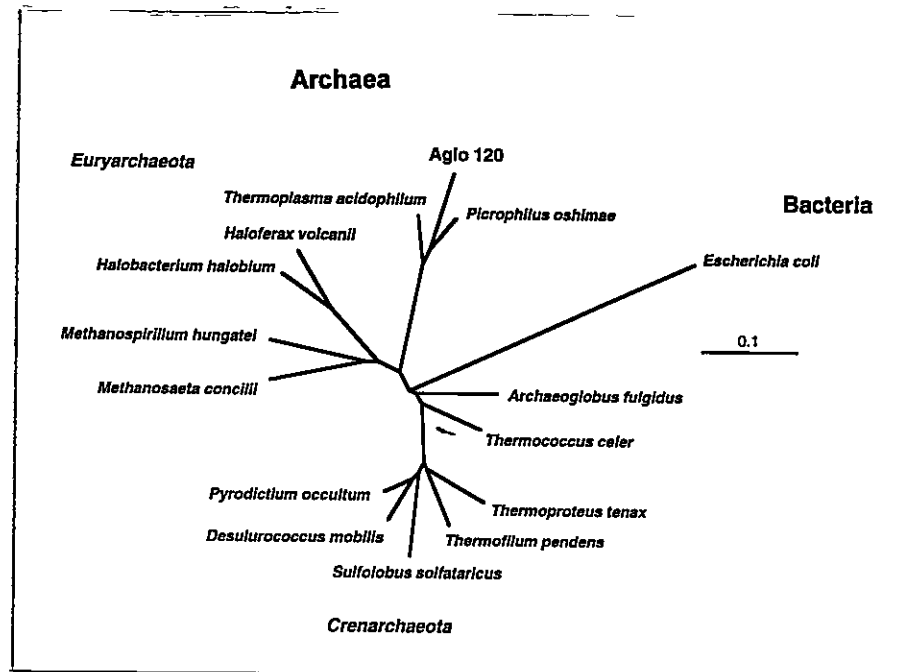


Figura 22: Dendrograma de las relaciones filogenéticas estimadas del archaeon Aglo120. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el programa DNADIST y el dendrograma fue hecho usando el algoritmo FITCH en el programa PHYLIP.

DISCUSIÓN

La hipótesis de esta tesis fue: "La cantidad y diversidad de las bacterias quimiolitotróficas capaces de crecer oxidando minerales sulfurados es mucho mayor que la reflejada por métodos de cultivo clásicos". Para probar esta hipótesis se estudió la diversidad bacteriana, empleando una metodología que no involucra el cultivo de la muestra, tanto antes como después de cultivar en los medios comúnmente empleados para este objeto. Se estudió también la diversidad bacteriana en diferentes condiciones de lixiviación y finalmente se exploró además la presencia de archaea, previamente denominadas archaeobacterias.

En esta tesis fueron analizadas principalmente las bacterias asociadas al mineral, sin embargo los resultados representan la composición de la población total, ya que más del 90% de las bacterias permanecen asociadas al mineral (Pizarro, 1996a).

Los resultados de esta tesis serán discutidos separadamente, en cuatro grandes áreas:

1. Selección de las poblaciones bacterianas presentes en sistemas de lixiviación.

Los estudios de diversidad bacteriana, antes y después de cultivo, realizados en esta tesis demostraron que al cultivar ocurre una drástica selección y por consecuencia hay una disminución de la diversidad observada inicialmente.

El análisis de la microflora presente en numerosos sistemas de biolixiviación ha resultado en la descripción de un número reducido y poco diverso de microorganismos (Rossi, 1990; Harrison, 1984). En la hipótesis se postulaba que, probablemente, una de las principales causas de la escasa diversidad observada es que la descripción se realizaba por aislamiento de microorganismos en medios diferentes al original de lixiviación. Esto provocaba una selección y en algunos casos también un enriquecimiento de cepas que podrían no ser las prevalentes en la muestra original (Harrison, 1984, Hutchins, 1986; Rossi, 1990).

El estudio de la composición de la población de microorganismos originalmente presentes en un sistema de biolixiviación y, de aquella resultante después de cultivar se realizó por un método directo. Este consiste en la

determinación de los tamaños de las regiones intergénicas de los genes ribosomales 16S y 23S, presentes en las diferentes muestras, técnica descrita por Jensen y otros autores (Jensen, 1993a; Pizarro, 1996b; Abed, 1995).

Las diferentes condiciones de lixiviación presentaron poblaciones originales de composiciones distintas. Después del cultivo en el laboratorio se observaron cambios drásticos en la composición de la población. Estos cambios pueden tener distintas causas, sin embargo tal vez la más determinante sea que: el cultivo en el laboratorio rara vez reproduce las condiciones que existen en la lixiviación original. En los diferentes casos estudiados cambió el tipo de incubación (de aglomerado regado a matraz agitado), el tipo de mineral o la fuente de energía, el pH, la concentración de sales, etc. Aunque la magnitud de los cambios fue diferente en cada caso, la disimilitud más importante fue probablemente el método de incubación, esto es columnas de mineral aglomerado versus incubación en matraz con agitación. El cultivo en matraz produce un continuo cambio en la composición del medio líquido. En el caso de cultivo en mineral, el ferroso puede acumularse durante la lixiviación y servir como sustrato a cepas bacterianas incapaces de crecer eficientemente utilizando el mineral. De esta forma especies bacterianas que

oxidan preferentemente ferroso y que pueden estar en un bajo porcentaje en la población original, se ven favorecidas en esta nueva condición y aumentan su proporción. El cultivo en matraz también puede producir una acumulación de iones en el medio, por ej. Cu, con un efecto inhibitorio para algunas cepas bacterianas. Una o varias de las causas antes mencionadas podrían explicar cada uno de los resultados obtenidos. Los cambios en la composición de la población observados a distintos tiempos de incubación de un mismo subcultivo pueden explicarse por la variación de la composición de la solución con el tiempo de incubación. La selección final de cepas bacterianas indetectables en la población original puede ser consecuencia de una diferencia mayor entre el medio de cultivo y el de lixiviación. Sin embargo, las explicaciones para cada caso particular son principalmente especulativas. La explicación de cada caso requeriría un estudio exhaustivo que estaba fuera de los intereses de esta tesis.

En conjunto los resultados sugirieron que las cepas comúnmente aisladas por cultivo pueden ser muy diferentes a aquellas prevalentes en el mineral lixiviado. La extrapolación de las características de las cepas aisladas a aquellas presentes en el sistema de lixiviación, puede

incorporar errores importantes para el manejo eficiente del proceso de biolixiviación. La caracterización genética y fisiológica de las bacterias **prevalentes** en el mineral y que **realmente** participan en el proceso permitiría mejorar y controlar el proceso de biolixiviación, al utilizar parámetros para el crecimiento bacteriano directamente extrapolables a la condición de lixiviación.

Un ejemplo particularmente interesante, fue el análisis de la selección bacteriana observada en las muestras provenientes de la mina "Lo Aguirre". En esta mina luego de extraer el cobre, toda la solución lixivante es reciclada. Este reciclaje, además de la evaporación, concentra las sales no cúpricas extraídas del mineral. Las condiciones de lixiviación en esta mina son por lo tanto especialmente extremas, ya que además del bajo pH de la solución de lixiviación (1,8-2,0), ésta contiene una concentración de iones sulfato muy alta (120 a 150 g/L). Los cationes más abundantes, debido a las características propias del mineral utilizado en "Lo Aguirre", son los de aluminio y magnesio. En estas condiciones de lixiviación sólo las bacterias acidófilas y osmoresistentes podrán crecer eficientemente. La alta concentración de iones sulfato, probablemente constituya uno de los factores más importantes de selección de la

población presente. Por lo anterior, la población bacteriana de la mina "Lo Aguirre" es muy característica y probablemente sea diferente a la encontrada en otros sistemas de biolixiviación. Tal como se mostró en la primera parte de los resultados de esta tesis, el cultivo sucesivo de las bacterias presentes en muestras provenientes de efluentes de la mina, provoca la selección de las bacterias. El cultivo en medios de mínima osmolaridad y con ferroso como fuente de energía, resultó en el enriquecimiento de espaciadores típicos de bacterias ya descritas mediante los métodos de cultivo clásicos, esto es *T. thiooxidans* y "*L. ferrooxidans*". Estos espaciadores no fueron detectables en la población original, sin embargo el sistema y las condiciones de cultivo provocaron finalmente su selección. Por lo tanto sería un error, suponer que al estudiar las bacterias seleccionadas después del cultivo, se está estudiando a las bacterias prevalentes en la mina. Adicionalmente, de lo anterior se desprende que en un sistema de lixiviación determinado, pueden estar viables diversas especies bacterianas, pero por las condiciones de crecimiento algunas de ellas pueden corresponder a un porcentaje muy pequeño de la población bacteriana. Por lo tanto, es razonable pensar que es posible controlar el tipo de especies bacterianas de un sistema

variando solamente las condiciones de crecimiento, sin necesidad de reinocular el sistema.

El análisis de las regiones intergénicas de los genes ribosomales 16S y 23S de las diferentes muestras estudiadas, mostró que la cantidad y diversidad de las bacterias no fue significativamente mayor a lo ya descrito por los métodos que involucran cultivo. Este análisis involucra la siguiente premisa: cada espaciador es característico de una especie bacteriana determinada (Jensen, 1993a; Barry, 1991; Bourque, 1995). Esta premisa debe ser considerada en la interpretación de los resultados, ya que es posible que una misma especie tenga un tamaño conservado en la región intergénica de los genes ribosomales 16S y 23S, pero existan variaciones en la secuencia de las regiones espaciadoras de diferentes cepas, de modo que más de una bacteria tengan un mismo tamaño de espaciador (García-Martínez, 1996).

En algunas muestras, analizadas en esta tesis, se detectaron algunas regiones espaciadoras totalmente diferentes en tamaño a las ya descritas (Pizarro, 1996b). En este caso fue de interés el análisis más profundo de las bacterias con estas regiones espaciadoras diferentes y que podrían corresponder a especies no descritas anteriormente.

2. Crecimiento bacteriano en alta concentración de ácido sulfúrico.

Uno de los sistemas estudiados fue la lixiviación en alta concentración de ácido sulfúrico (0.6 N). La principal ventaja de la lixiviación a altas concentraciones de ácido sulfúrico es que aumenta la recuperación desde óxidos de cobre y previene la formación jarosita, lo que aumenta la eficiencia de lixiviación (Rossi, 1990). En estas condiciones de pH, el crecimiento de *T. ferrooxidans* estaría limitado, ya que el pH límite descrito al cual esta bacteria es activa es 1.0 (Rossi, 1990). Por lo tanto como se considera que *T. ferrooxidans* sería una de las principales responsables del proceso de oxidación, el pH de las soluciones de lixiviación en las plantas se mantiene generalmente sobre 1.3.

Los resultados mostrados en esta tesis indicaron que en una columna de mineral aglomerado lixiviada con una solución de pH 0.6, es posible obtener un crecimiento bacteriano significativo. El crecimiento, determinado a través del aumento de la oxidación de ferroso y del aumento en la extracción de cobre soluble, permitió alcanzar los niveles de oxidación que se observan en columnas lixiviadas a pH mucho más alto (1.6-1.8). Inicialmente el crecimiento bacteriano, en la primera columna lixiviada con una concentración de

ácido alta, fue muy lento, observándose un tiempo de retardo de 70 días. La población bacteriana desarrollada en esta columna parece haberse "adaptado" a las condiciones de acidez, ya que en una segunda columna lixiviada en las mismas condiciones de alta acidez, e inoculada con bacterias de la primera, el tiempo de retardo disminuyó a 20 días. Lo anterior, permite afirmar que en la lixiviación en alta concentración de ácido sulfúrico (0.6 N) es posible lograr un crecimiento bacteriano significativo.

El análisis de la población bacteriana asociada al mineral, seleccionada en la lixiviación con una alta concentración de ácido sulfúrico, fue realizado a través de la caracterización de las regiones espaciadoras entre los genes ribosomales 16S y 23S. La comparación de los tamaños de las regiones espaciadoras indicó que la población bacteriana prevalente en el mineral, estaba compuesta por al menos cuatro especies, ya que se detectaron cuatro tamaños diferentes. Dos de los espaciadores tenían tamaños descritos para cepas de "*L. ferrooxidans*" (Pizarro, 1996b). Otro espaciador tenía igual tamaño al determinado para cepas de *T. thiooxidans* (Pizarro, 1996b), el último de los espaciadores detectados, tenía un tamaño diferente a todas las especies típicamente encontradas en sistemas de lixiviación. Sin

embrago, entre estas bandas, la banda de menor tamaño, correspondiente a un putativo espaciador de "*L. ferrooxidans*" puede deberse a un artefacto en la amplificación, ya que una banda débil, más pequeña que la banda principal, es observada frecuentemente después de la amplificación, aun tratándose de cepas de colección (ver Figura 7, carriles Tt y Tf).

El análisis de la población bacteriana crecida en matraz y agitación, con mineral concentrado como fuente de energía, mostró sólo la presencia de bacterias con las regiones espaciadoras de mayor tamaño, observados en la muestra original. Los espaciadores, similares en tamaño a los observados en "*L. ferrooxidans*" no fueron detectados a partir del primer subcultivo. Adicionalmente, la oxidación del ion ferroso pareció no continuar en los subcultivos, ya que cuando se midió la concentración de ion ferroso y férrico en el cuarto subcultivo, la razón ferroso/férrico no fue significativamente diferente a la observada en los controles sin bacterias. La pérdida de "*L. ferrooxidans*" en el cultivo en matraz, puede tener diversas causas, pero como se indicó en el punto 1 de la discusión, la más determinante seguramente es la diferencia en las condiciones de cultivo (de columna con riego a matraz agitado). Los dos espaciadores de mayor tamaño se mantuvieron presentes hasta el sexto

subcultivo aunque las proporciones variaban. La variación en proporción de los espaciadores indicó que éstos corresponden a bacterias diferentes, y no a dos operones de la misma bacteria, capaces de crecer ambas en matraz a la alta concentración de ácido empleada.

2.1 Aislamiento de una bacteria de alta resistencia al ácido.

Las bacterias que presentaban el espaciador más grande, diferente al de todas las especies típicamente presentes en sistemas de biolixiviación, fue aislada y caracterizada genética y fenotípicamente. Tal como se describió en Resultados, el aislamiento de la bacteria que poseía el espaciador de tamaño diferente a los ya descritos fue realizado a través de cultivos sucesivos en matraz con azufre y alta concentración de ácido sulfúrico (0.7 N). La bacteria aislada fue nombrada **THA**. La secuencia del 16S ADNr de **THA** tiene un 99.85% de homología con las cepas de *T. thiooxidans* ATCC 19377 y B-S3 (Goebel, 1994). Este porcentaje de similaridad no permite discriminación a nivel de especie, y por si solo no es suficiente para determinar si **THA** pertenece a la especie *T. thiooxidans*, ya que se han descrito bacterias con una alta homología en el 16S ARNr (98%) y muy baja homología en el ADN total (25%) (Fox, 1992). Sin embargo, su

capacidad de oxidar azufre y no ferroso, sugieren que probablemente pertenezca a la especie *T. thiooxidans*.

La región intergénica, entre los genes ribosomales 16S y 23S de THA, es aproximadamente 10 pb más grande que la de *T. thiooxidans*. Como se ha mencionado anteriormente *T. thiooxidans* es una especie mucho más homogénea que *T. ferrooxidans*, representa un taxón coherente tanto por hibridación de ADN-ADN como por el tamaño de la región espaciadora (Pizarro, 1996b; Harrison, 1982). Hay antecedentes que han sugerido una alta conservación en el tamaño de la región espaciadora, entre especies (Abed, 1995; Barry, 1991; Bourque, 1995; Jensen, 1993; Pizarro, 1996b; Salazar, 1989). Se ha descrito que, en bacterias que contienen varios operones ribosomales, la secuencia del espaciador en operones ribosomales de la misma clase es muy conservada (Bott, 1982; Fleischmann, 1992). Sin embargo, la región espaciadora de THA, presenta un tamaño diferente y el análisis de su secuencia indicó que existe entre dos zonas de alta homología, muy conservadas entre los espaciadores de THA, *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans*, una zona variable. Las zonas conservadas se encuentran localizadas en los extremos cercanos al 16S y 23S ADNr, y probablemente están involucradas en la maduración del 16S y del 23S ARNs. El

extremo cercano al 16S comprende también genes conservados que codifican ARNt, en este caso particular los de isoleucina y alanina (Lund, 1977; Sechi, 1993; Srivastava, 1990). La utilidad de las variaciones en la secuencia del espaciador de THA para la caracterización filogenética es incierta. Se han descrito, en otras especies, bajos % de disimilitud entre diferentes locus ARNr en el mismo cromosoma, entre diferentes cepas bacterianas (García-Martínez, 1996; Barry, 1991; Dolzani, 1994; Jensen, 1993b; Sagredo, 1992). Regiones espaciadoras de tamaños diferentes se han observado en *T. ferrooxidans* (Pizarro, 1996b), pero este polimorfismo en tamaño puede deberse a una inadecuada definición de especie. Ensayos de hibridización DNA-DNA han mostrado que la especie *T. ferrooxidans* es genotípicamente más diversa que lo habitual para una especie única (Harrison, 1982). El conjunto de antecedentes relativos al tamaño y a la secuencia de la región entre los genes 16S y 23S, sugieren que el análisis de las secuencias de estas regiones, con mayor variabilidad que el 16S ARNr, podría ser de gran utilidad para determinar relaciones filogenéticas intragénero o intraespecie, y como una herramienta adicional para definir mejor a una especie.

La característica fenotípica más interesante de THA fue su resistencia al ácido, la cual fue consistentemente más alta

que la de *T. thiooxidans* ATCC 19377, cuando fue crecida en una solución salina MS9b y azufre elemental (ver Resultados, Figura 12). Sin embargo, esta diferencia no fue del grado esperado, de acuerdo a lo observado inicialmente durante la selección de esta cepa, en condiciones de alta acidez. La comparación de la actividad metabólica medida por el consumo de oxígeno de cultivos a pH decreciente también muestran que THA tenía una resistencia al ácido levemente mayor que *T. thiooxidans*. Sin embargo, aunque THA fue más resistente al ácido que *T. thiooxidans* ATCC 19377, ésta diferencia no explica la selección obtenida en medio ácido 0.7 N y azufre elemental (ver Resultados, Figura 7), ya que como se observó en la Figura 12, *T. thiooxidans* ATCC 19377 también fue capaz de crecer eficientemente a esa concentración de ácido sulfúrico. La explicación de la selección obtenida en medio ácido puede estar en una diferencia entre las cepas de *T. thiooxidans*, ya que la cepa de *T. thiooxidans* de la población originalmente presente en el mineral, podría haber tenido características fenotípicas diferentes a la cepa ATCC 19377 utilizada en la caracterización fenotípica. Otra hipótesis, para explicar la selección obtenida, es que la velocidad de crecimiento de THA en azufre y alta concentración de ácido sea mucho mayor que la de la cepa de *T. thiooxidans* presente

en el cultivo. Esta diferencia en la velocidad de crecimiento puede ser atribuible a diferencias en la adherencia de las bacterias al azufre o a una mayor labilidad de las células no adheridas al azufre.

El conjunto de resultados obtenidos muestran que la oxidación de ion ferroso y de sulfuros por acción bacteriana, puede existir en un nivel significativo cuando la lixiviación se realiza con 0.6 N de ácido sulfúrico. La población responsable de la oxidación a este pH estaba compuesta por cepas bacterianas estrechamente relacionadas a *T. thiooxidans* y de otras cepas relacionadas con "*L. ferrooxidans*". La oxidación de ferroso en las columnas lixiviadas es atribuible a "*L. ferrooxidans*" y no a *T. ferrooxidans*, ya que los espaciadores observados fueron del tamaño de "*L. ferrooxidans*", bastante menor a aquellos observados en cualquier cepa de *T. ferrooxidans* estudiada. Es posible que el papel de "*L. ferrooxidans*" en biolixiviación haya sido subvalorado debido a la mayor dificultad en el cultivo o a la imposibilidad de cultivarlo (Sand, 1992). Poblaciones bacterianas compuestas de *T. thiooxidans* y "*L. ferrooxidans*", también han sido recientemente descritas en otros sistemas de biolixiviación, en los cuales se han empleado en el análisis métodos que no involucran cultivo (Rawlings, 1995).

3. Evaluación de la heterogeneidad de una población mediante el método de formación de heteroduplex.

La complejidad de una población bacteriana ha sido generalmente determinada a través de técnicas que involucran el cultivo, pero como ya se ha mencionado este método permite la identificación de un porcentaje muy bajo de la población. En los últimos años la mejor aproximación, ya que no requiere del cultivo para determinar la complejidad de una población, ha consistido en extraer el ADN total, amplificar mediante PCR el 16S ADNr, clonar los fragmentos amplificados y secuenciarlos (Woese, 1987). Una vez obtenidas las secuencias, las diferentes secuencias observadas indican la diversidad. Adicionalmente, éstas pueden ser comparadas con las existentes en el banco de secuencias, y determinar las relaciones filogenéticas con las especies ya descritas. Sin embargo, la secuenciación del 16S ADNr es la técnica más ampliamente utilizada para estimar la complejidad de una población y establecer las relaciones filogenéticas entre las especies (Woese, 1987). Sin embargo, el clonamiento y la secuenciación de los clones requiere de bastante tiempo de trabajo y recursos. Además, si se desea una mejor caracterización de las especies presentes, es necesario

obtener la secuencia completa del 16S ARNr, esto es aproximadamente 1500 pb. Un trabajo de esta magnitud requiere de una tecnología disponible en pocos laboratorios, ya que es prácticamente imprescindible disponer de un secuenciador automático. Considerando lo anterior, en esta tesis se desarrolló un método más sencillo, que no involucra el clonamiento ni la secuenciación, y que permite visualizar la heterogeneidad y diversidad de una población bacteriana. Además permite establecer relaciones entre las especies presentes en una muestra y alguna especie en particular.

Este método se basa en la formación de heteroduplex y su movilidad relativa en electroforesis en gel. Fue descrito en detalle en la sección Métodos y también en Resultados, ya que esta metódica no había sido utilizada anteriormente para establecer la heterogeneidad de una población bacteriana, ni tampoco las relaciones filogenéticas de las especies presentes con otras ya aisladas. Este método está basado en un sistema ampliamente utilizado para estimar la distancia genética entre subtipos de HIV-1 (Delwart, 1993). A través del retardo en la movilidad de los heteroduplexes, ha sido posible estimar con mayor exactitud la distancia genética entre cuasiespecies virales, resultando esta metódica más apropiada que la determinación y comparación de las

secuencias para trabajos con gran número de muestras, y para laboratorios de regular equipamiento.

Lo realizado en esta tesis consistió, en términos generales, en amplificar con partidores específicos el 16S ADNr de las especies a comparar, y posteriormente desnaturalizar y renaturalizar los productos de amplificación. De esta forma fue posible distinguir claramente los heteroduplexes incluso formados por ADNs con un 98,5 % de homología. Esto significa que sin necesidad de secuenciar es posible distinguir diferencias de 22 nucleótidos entre 1500 pb. Adicionalmente, es posible estimar la relación entre los ADNs, puesto que ADNs con un menor porcentaje de homología tendrán un retardo mayor en la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida.

El uso de este método para estimar la heterogeneidad de la población bacteriana, puede ser de gran utilidad a futuro para establecer de forma rápida y sencilla (sin necesidad de secuenciar), la complejidad de la población y las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas.

4. Archaea en un proceso comercial de biolixiviación de cobre.

El sistema comercial de lixiviación de cobre elegido para la determinación de la posible presencia de archaea en éstos medios, fue el de la mina "Lo Aguirre", en la cual casi todo el cobre es obtenido mediante biolixiviación. En la planta "Lo Aguirre", la alta concentración de iones en la solución lixivante, producto del reciclaje de la solución una vez extraído el cobre, puede afectar drásticamente las posibilidades de crecimiento bacteriano (Montealegre, 1991). En esta planta la solución de lixiviación (denominada Refino), contiene aproximadamente 120 a 150 g/L de ion sulfato, principalmente como sales de magnesio y aluminio, y en menor concentración cobalto y manganeso. En esta planta al igual que en otros sistemas de biolixiviación, el pH fluctúa entre 1.6 y 2.0, y el proceso se desarrolla a temperatura ambiente. En la planta "Lo Aguirre", es posible detectar en la solución de lixiviación diversas especies bacterianas (Pizarro, 1996a; esta tesis). Sin embargo, a la fecha no se habían explorado la presencia de Archaea. En ambientes, de características similares a las de sistemas de biolixiviación (solfataras y géisers), se han aislado algunas archaea (Brock, 1978a; Brock, 1978b; Stetter, 1986). Entre estas, las

más estudiadas son las termófilas *Sulfolobus acidocaldarius* y *S. solfataricus* (Rossi, 1990). Debido a las características fenotípicas de estas archaea, tales como oxidar azufre y crecer oxidando minerales sulfurados (Rossi, 1990), en medios ácidos y alta temperatura, se las ha asociado indirectamente a procesos de biolixiviación. Sin embargo, en la literatura no hay descripciones de alguna archaea aislada de una planta comercial de biolixiviación de cobre (Rossi, 1990). Sólo se han realizado ensayos experimentales relacionados con la lixiviación de minerales sulfurados, especialmente con calcopirita, la cual es recalcitrante a la lixiviación bacteriana (Rossi, 1990).

La estrategia utilizada para la detección de archaea, fue el análisis de cultivos enriquecidos, cuyo inóculo original era el Refino de la planta "Lo Aguirre", o el análisis de mineral de columnas experimentales lixiviadas con Refino de la planta "Lo Aguirre". La detección preliminar fue hecha en un cultivo enriquecido del Refino de planta. Esta fue realizada amplificando el 16S ARNr, con un partidador específico para Archaea y otro universal, el fragmento amplificado fue secuenciado directamente por PCR. La secuencia obtenida, la cual no presentaba ambigüedades, fue comparada con el banco de secuencias (RDP y EMBL). Los

resultados indicaron que la secuencia agrupaba con las de archaea, y que era además bastante diferente a las ya descritas en este dominio. Estos resultados, aunque preliminares, sugirieron que existían archaea en el Refino de la planta de lixiviación de cobre "Lo Aguirre".

A continuación la detección de archaea fue realizada en el ADN extraído directamente desde el mineral aglomerado de una columna lixiviada con Refino de planta. En este caso fueron utilizados 2 partidores específicos para regiones del 16S ADNr de archaea, que permitieron la amplificación de un fragmento de aproximadamente 950 pb. La estrategia convencional, en esta parte de la investigación habría sido el clonamiento de los fragmentos amplificados y luego la secuenciación de los clones. Sin embargo, la alternativa utilizada fue determinar primero, cuan heterogéneo era el fragmento amplificado y luego decidir si era necesario realizar el clonamiento. El método de formación de heteroduplex para evaluar la heterogeneidad y estimar la distancia genética entre especies, permitió determinar que el amplificado era muy homogéneo en secuencia. Esto se manifestó porque la desnaturalización y renaturalización del amplificado del 16S ARNr de archaea, no originó heteroduplexes. Con el propósito de determinar la relación

existente entre la archaea presente (nombrada Aglo 120) y *Sulfolobus acidocaldarius* (otra archaea aislada en ambientes de características similares a los sistemas de biolixiviación), se utilizó también la técnica de formación de heteroduplex, pero empleando el producto de amplificación del 16S ADNr de *S. acidocaldarius*, marcado radiactivamente con P³². El amplificado marcado de *S. acidocaldarius* formó un heteroduplex, entre el amplificado de Aglo 120, con un alto retardo en la migración (migra entre las hebras simples). Ese nivel de retardo en la movilidad electroforética implica que ambas secuencias están muy poco relacionadas entre sí. En consideración a lo anterior, se realizó la secuenciación directa por PCR del fragmento amplificado. La secuencia del amplificado, de aproximadamente 900 nucleótidos, no presentaba ambigüedades. La comparación de la secuencia con las ya descritas indicó que se trataba de un archaeon diferente. Los microorganismos más relacionadas eran el recientemente descrito *Picrophilus oshimae* (88.1%) (Schleper, 1995), y *Thermoplasma acidophilum* (86.3%). Estas diferencias en la secuencia del 16S ADNr sugieren que Aglo 120 es una especie, aún desconocida, dentro de una tercera nueva familia del orden *Thermoplasmales*, de la subdivisión Euryarchaeota, del dominio Archaea (Schleper, 1995; Woese, 1990).

Adicionalmente, se realizaron cultivos en matraz utilizando como inóculo mineral aglomerado lixiviado con Refino, y como fuente de energía azufre, ferroso, calcopirita o extracto de levadura. El 16S ADNr de archaea fue observado en los cultivos en azufre, ferroso y calcopirita, pero no en extracto de levadura. El heteroduplex formado entre el amplificado del 16S ADNr de *Sulfolobus acidocaldarius* y los 16S ADNr amplificados con partidores específicos para archaea, provenientes de los diferentes cultivos, fue único y de igual migración al formado entre el 16S ADNr amplificado de *S. acidocaldarius* y el obtenido a partir del ADN presente en el mineral lixiviado con Refino, utilizado para determinar la secuencia de nucleótidos.

También se realizó la secuenciación parcial del 16S ADNr amplificado a partir del ADN presente en el cultivo en ferroso. Esta secuencia resultó idéntica a la del 16S ADNr amplificado a partir del ADN obtenido del mineral lixiviado con Refino de planta y a la del cultivo enriquecido del Refino de la planta, donde se detectó originalmente. Aunque, esta archaea fue detectada en mineral aglomerado, y en cultivos en azufre, ferroso y calcopirita, no es posible afirmar que sea capaz de oxidar ferroso, azufre y mineral, ya que en estos cultivos crecen bacterias que podrían

suplementar compuestos orgánicos. Tampoco es posible afirmar que el que no haya sido detectada en el cultivo con extracto de levadura, signifique que no es una heterótrofa. Se ha descrito, por ejemplo, que para el cultivo de especies del género *Thermoplasma*, archaea heterótrofas relacionadas con Aglo 120, se requiere de concentraciones bien definidas de extracto de levadura (Robb, 1995). Altas concentraciones pueden inhibir el crecimiento de estos microorganismos. La obtención de un cultivo puro es imprescindible para describir con certeza las características fenotípicas de Aglo 120.

En la actualidad existen en el banco de secuencias, aproximadamente 5000 secuencias del dominio Bacterias (en algunos de estos casos se trata de los mismos organismos). Sin embargo, hay solamente 158 secuencias del dominio Archaea. Por lo tanto, no resulta extraño que Aglo 120 sea una nueva especie, pero si es muy interesante que pudiera constituir un nuevo miembro de un nuevo género y una nueva familia.

Aglo 120 sería el primer miembro del dominio Archaea detectado en un proceso comercial de lixiviación de cobre. El rol que cumpliría Aglo 120 dentro del proceso es incierto, ya que no es claro que este sea un microorganismo autótrofo, capaz de oxidar ferroso y azufre. Sin embargo, resulta

interesante que este microorganismo se haya detectado tanto en Refino como en mineral, y que sólo se detecte en altas concentraciones de sales (sulfatos) y no cuando el mineral es lixiviado con medio mínimo (baja concentración de sulfatos). Un trabajo futuro que implique el desarrollo de estrategias de aislamiento será indispensable para el estudio de la función de Aglo 120 en el proceso de biolixiviación de la planta de obtención de cobre "Lo Aguirre".

Los resultados obtenidos en esta tesis han sugerido que, contrariamente a lo expuesto en la hipótesis de esta tesis, la diversidad de las bacterias quimiolitotróficas capaces de crecer oxidando minerales sulfurados no es mucho mayor que la descrita por los métodos de cultivo clásicos, como ha sido descrito en otros sistemas. Aunque la diversidad de las bacterias en sistemas de lixiviación no es muy diferente a la descrita a través de los métodos de cultivo clásicos, resulta importante destacar la presencia de *archaea* en un sistema comercial de biolixiviación de cobre. La función que cumplirían las *archaea* y particularmente este *archaeon* dentro del proceso de biolixiviación es incierto, pero sin duda resulta de gran interés el estudio de estos microorganismos para evaluar su relevancia dentro del proceso de lixiviación de cobre.

En este caso particular, la diversidad de las archaea presentes fue mínima, ya que lo más probable es que se trate de una sola especie.

CONCLUSIONES

-El análisis del polimorfismo del tamaño de la región intergénica entre el 16S y 23S ADNr, permite seguir los cambios que se producen en una población microbiana durante el crecimiento.

-El cultivo de los microorganismos presentes en sistemas de biolixiviación, incluso utilizando minerales sulfurados como fuente de energía, provoca una drástica selección y en algunos casos ocasiona un enriquecimiento de una población indetectable en la muestra original.

-Durante el cultivo en matraz utilizando minerales sulfurados como fuente de energía, la composición de la población puede variar en cada subcultivo y durante un mismo subcultivo.

-La diversidad de las bacterias presentes en varios sistemas de biolixiviación estudiados no fue mayor a la ya determinada a través de los métodos de cultivo clásicos.

-Es posible obtener un crecimiento bacteriano significativo cuando la lixiviación se realiza con alta concentración de ácido sulfúrico (0.6 N).

-La población bacteriana compuesta por bacterias del tipo "*Leptospirillum ferrooxidans*" y *Thiobacillus thiooxidans* es capaz de lixiviar eficientemente en condiciones de alta acidez (ácido sulfúrico 0.6 N). Esta asociación de bacterias, también observada en otros sistemas analizados sin mediar cultivo, sugiere que tal vez "*L. ferrooxidans*" tenga un rol más importante dentro del proceso de biolixiviación, del que se le ha atribuido hasta el momento.

-La bacteria THA, capaz de crecer en azufre y 1.5 N de ácido sulfúrico, tiene un 16S ADNr con una homología de un 99.85% con *T. thiooxidans*, cepas ATCC 19377 y B-S3. Sin embargo, tiene un espaciador intergénico 16S-23S ADNr más grande que el de *T. thiooxidans*, con una alta disimilaridad en la región central.

-El método de formación de heteroduplex permite la evaluación de la heterogeneidad de un amplificado de 16S ADNr, y adicionalmente estimar la relación filogenética de este con

otras especies ya descritas. Este método se puede constituir a futuro en herramienta útil para estimar, en forma rápida, la heterogeneidad de una población de microorganismos y la relación filogenética entre ellos.

-En un sistema particular de biolixiviación comercial de cobre, existen además de bacterias, microorganismos del dominio Archaea.

-El archaeon detectado en la planta "Lo Aguirre", corresponde a una nueva especie, tan diferente a las ya descritas que sería el representante de un nuevo género y de una nueva familia dentro del orden *Thermoplasmales*.

BIBLIOGRAFIA

- Abed Y., D-Regli, C. Bollet, and P. de Micco. 1995. Efficient discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by 16S-23S spacer region-based random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1418-1420.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Amaro, A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I., Jerez, C.A. 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**: 910-915.
- Apel, W.A., Dugan, P.R., Filippi, J.A., Rheins, M.S. 1976. Detection of *Thiobacillus ferrooxidans* in acid mine environments by indirect fluorescent antibody technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**: 159-165.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L.K., Gannon, F. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Applications* **1**:51-56.
- Belly, R.T., Bohlool, B.B., Brock, T.D. 1973. The genus *Thermoplasma*. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* **225**:94-107.
- Blake, R., Shute, E.A., Waskovsky, J., Harrison Jr., A.P. 1992. Respiratory components in acidophilic bacteria that respire on iron. *Geomicrobiol. J.* **10**: 173-192.
- Bott, F. K., and M. A. Hollis. 1982. Nucleotide sequence of intergenic spacer DNA of three 16S-23S RNA genes from *B. subtilis*. p. 3-10. In *Molecular cloning and gene regulation in bacilli*. Academic press, new York.
- Bourque, S. N., J. R. Valero, M. C. Lavoie, and R. C. Levesque. 1995. Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thurigiensis* strains and subspecies and of closely related species. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1623-1626.

Brierley, C.L., Brierley, J.A. 1973. Chemolithoautotrophic and thermophilic microorganism isolated from an acid hot spring. *Can. J. Microbiol.* **19**:183.

Britschgi, T.B., Giovannoni, S.J. 1991. Phylogenetic analysis of a natural marine bacterioplankton population by rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(6): 1707-1713.

Brock, T.D. 1978a. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. pp 386-418. Springer-Verlag, New York.

Brock, T.D. 1978b. Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. pp 346-418. Springer-Verlag, New York.

Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., Noller, H.F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**:107-127.

Bull, A.T., Goodfellow, M., Slater, J.H. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**:219-252.

Bult, C.J., White, O., Olsen, G.L., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S.M., Weidman, J.F., Fuhrmann, J.L., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Roberts, K.M., Hurts, M.A., Kaine, B.P., Borodovsky, M., Klenk, H., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R., Venter, J.C. 1996. Complete genome sequence of the Methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**:1058-1073.

Bustos, S., Castro, S., Montealegre, R. 1993. The Sociedad Minera Pudahuel bacterial thin-layer leaching process at Lo Aguirre. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**: 231-236.

DeLong, E. F. 1992. Archaea in costal marine environments. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* **89**:5685-5689.

Delwart, E.L., Shpaer, E.G., Louwagie, J., McCutchan, F.E., Grez, M., Rübbsamen-Waigmann, H., Mullins, J. 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* **262**:1257-1261.

Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Monti-Bragadin, C. 1994. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**:167-174.

Espejo, R.T. & Romero, P. 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(8): 1907-1912.

Espejo, R.T., Escobar, B., Jedlicki, E., Uribe, P., Badilla-Ohlbaum R. 1988. Oxidation of ferrous iron and elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(7): 1694-1699.

Espejo, R.T., Escanilla, D. 1993. Detection of HIV1 ADN by a simple procedure of polymerase chain reaction, using "primer-dimer" formation as an internal control of amplification. *Reg. Virol.* **144**: 243-246.

Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J-F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, K. McKenney, G. Sutton, W. FitzHugh, C. Fields, J. D. Gocayne, J. Scott, R. Shirley, L-I. Liu, A. Glodek, J. M. Kelley, J. F. Weidman, C. A. Phillips, T. Spriggs, E. Hedblom, M. D. Cotton, T. R. Utterback, M. C. Hanna, D. T. Nguyen, D. M. Saudek, R. C. Brandon, L. D. Fine, J. L. Fritchman, J. L. Fuhrmann, N. S. M. Geoghagen, C. L. Gnehm, L. A. McDonald, K. V. Small, C. M. Fraser, H. O. Smith, and J. C. Venter. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**:496-512.

Fliermans, C.B., Brock, T.D. 1972. Ecology of sulfur-oxidizing bacteria in hot acid soils. *J. Bacteriol.* **111**:343-350.

Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, and P. Jurtshuk, Jr. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:166-170.

Furhman, J., McCallum, K., Davis, A. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. *Nature* **356**:148-149.

García-Martínez, J., Martínez-Murcia, A., Antón, A.I., Rodríguez-Varela, F. 1996. Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some

Escherichia coli strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. J. Bacteriol. **178**:6374-6377.

Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. Nature **345**:60-63.

Goebel, B.M., Stackebrandt, E. 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 1614-1621.

Golovacheva, R.S., Karavaiko, G.I. 1978. A new genus of thermophilic spore-forming bacteria, *Sulfobacillus*. Mikrobiologiya. **47**: 815.

Hallman, R., Friedrich, A., Koops, H.P., Pommerening-Roser, A., Rohde, K., Zenneck, K., Sand, W. 1992. Physiological characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* and physicochemical factors influence microbial metal leaching. Geomicrobiol. J. **10**: 193-206.

Harrison Jr., A.P. 1981. *Acidiphilium cryptum* gen. Nov. Sp. nov., heterotrophic bacterium from acidic mineral environments. Int. J. Syst. Bacteriol. **31**:327.

Harrison Jr., A.P. 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. Arch. Microbiol. **131**: 68-76.

Harrison, A.P., Jr. 1984. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. Annu. Rev. Microbiol. **38**: 265-292.

Harrison Jr., A.P. & Norris, P.R. 1985. *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: some characteristics and genomic diversity. FEMS Microbiol. Lett. **30**: 327-332.

Harrison Jr., A.P. 1986. Characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other iron-oxidizing bacteria, with emphasis on nucleic acid analyses. Biotechnol. Appl. Biochem. **8**: 249-257.

Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1225-1228.

Huber, H. & Stetter, K. 1990. *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 315-322.

Hutchins, S.R., Davidson, M.S., Brierley, J.A., Brierley, C.L. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 311-336.

Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N. 1993a. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal ADN spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(4): 945-952.

Jensen, M.A., Straus, N. 1993b. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Meth. Appl.* **3**:186-194.

Johnson, J.L. Chapter 27. Similarity analysis of rRNAs. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G., Wood, W.A., Krieg, N.R. (eds.), American Society for Microbiology, 1994, p. 683-700.

Kelly, D. P. 1988. Evolution of the understanding of the microbiology and biochemistry of the mineral leaching habitat, p. 3-14. In P. R. Norris and D. P. Kelly (ed.) *Biohydrometallurgy*. Science and Technology Letters. Kew, United Kingdom.

Lane, D.J., Stahl, D.A., Olsen, G.J., Heller, D.J., Pace, N.R. 1985. Phylogenetic analysis of the genera *Thiobacillus* and *Microspira* by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **163**(1): 75-81.

Lane, D. J. 1991. 16S/23S sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.

Lane, D.J., Harrison Jr., A.P., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S.J., Olsen, G.J., Pace, N.R. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 269-278.

- Lee, D., Zo, Y., Kim, S. 1996. Nonradiative method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3112-3120.
- Le Roux, N.W., Wakerley, D.S., and Hunt, S.D. 1977. Thermophilic *Thiobacillus*-type bacteria from Icelandic Thermal areas. *J. Gen. Microbiol.* **100**: 197.
- Liesack, W., Stackebrandt, E. 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol.* **174**(15): 5072-5078.
- Lobos, J.H., Chisolm, T.E., Holmes D.S. 1986. *Acidiphilium-organovorum* new-species an acidophilic heterotroph isolated from a *Thiobacillus-ferrooxidans* culture. *Int.J. Syst. Bacteriol.* **36**: 139-144.
- Loughney, K., Lund, E., Dahlberg, J.E. 1982. tRNA genes are found between the 16S and 23S genes in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **10**:1607-1624.
- Lund, E., and E. J. Dahlberg. 1977. Transfer RNA genes between 16S and 23S rRNA genes in rRNA transcription units of *E. coli*. *Cell* **7**:165-177.
- Lundgren, D.G. 1980. Ore leaching by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **34**:263-283.
- Montealegre, R., Bustos, S. Industrial application of the bacterial thin layer process (BTL). En *Bioleaching: From molecular biology to industrial applications*. Badilla-Olhubaum, R. T. Vargas, y L. Herrera (de) 1991. Editorial Universitaria, Chile.
- Muyzer, G., de Bruyn, A., Schmedding, D., Bos, P., Westbroek, P., Kuenen, G. 1987. A combined immunofluorescence-ADN fluorescence staining technique for enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* in a population of acidophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 660-664.
- Olsen, G., Woese, C.R., Overbeek, R. 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* **176**:1-6.
- Pizarro, J.L. 1996a. Estudio del crecimiento en superficie de *Thiobacillus ferrooxidans*. Tesis Ph D. Universidad de Chile.

- Pizarro, J., E. Jedlicki, O. Orellana, J. Romero, and R.T. Espejo. 1996b. Bacterial population in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1323-1328.
- Rauld, J., Montealegre, R., Schmidt, P., Domic, E. 1986. T.L. leaching process: A phenomenological model for oxide copper ores treatment, in *Hydrometallurgical reactor design and kinetics*. TMS-AIME., Bautista, K., Wesley, R., Warren, G. (eds.), p. 75.
- Rawlings D.E. & Kusano, T. 1994. Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**(1): 39-55.
- Rawlings, D. E. 1995. Restriction enzyme analysis of 16S rRNA genes for the rapid identification of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, and *Leptospirillum ferrooxidans* strains in leaching environments, p. 9-17. En T. Vargas, C. Jerez, J. Wiertz and H. Toledo (eds). *Biohydrometallurgical Processing*. University of Chile. pp 1-8. 1995.
- Riijpens, N. P., G. Jannes, M. Van Asbroeck, R. Rossau, and L. M. F. Herman. 1996. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1683-1688.
- Robb, F.T., Place, A.R., Sowers, K.R., Schreier, H.J, DasSarma, S., Fleischmann, E.M. 1995. *Archaea a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Rossi, G. In *Biohydrometallurgy*, Rossi, G. (ed.) , McGraw-Hill, Hamburg, 1990.
- Roszak, D.B., Grimes, D.J., Colwell, R.R. 1984. Viable but non recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.*, **30**: 334-338.
- Sagredo, B., Jedlicki, E., Orellana, O. 1992. Organization of the 16S-23S intergenic spacer region of the two rRNA operons from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.* **10**:239-247.
- Saiki, R.K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi,, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Ehrlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491

- Salazar, O., Takamiya, M., Orellana, O. 1989. Characterization of the two rRNA gene operons present in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEBS Lett. **242**: 439-443.
- Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C. 1992. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 85-91.
- Sayler, G.S., Layton, A.C. 1990. Environmental application of nucleic acids hybridization. Ann. Rev. Microbiol. **44**:625-648.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H-P., Zillig, W. 1995. *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. J. Bacteriol. **177**: 7050-7059.
- Schmidt, T.M., DeLong, E.F., Pace, N.R. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. J. Bacteriol. **173**(14): 4371-4378.
- Sechi, L.A. & Daneo-Moore, L. Characterization of intergenic spacers in two *rrn* operons of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. J. Bacteriol. **175**(10): 3213-3219.
- Srivastava, A. K., and Schlessinger, D. 1990. Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. Annu. Rev. Microbiol. **44**:105-129.
- Stackebrandt, E., Liesak, W., Goebel, B.M. 1993. Bacterial diversity in a soil sample from a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. FASEB. **7**:232-236.
- Steffan, R.J., Atlas, R.M. 1991. Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. Ann. Rev. Microbiol. **45**:137-161.
- Stetter, K.O., Segerer, A., Zillig, W., Huber, G.F., Huber, R., König, H. 1986. Extremely thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. System. Appl. Microbiol. **7**:393-397.
- Tuovinen, O. H., and D. P. Kelly. 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ores. Z. Allg. Mikrobiol. **12**:311-316.

- Vásquez, M. and R. Espejo. 1997. Chemolithotrophic bacteria in copper ores leached at high sulfuric acid concentration. *Appl. Env. Microbiol.* **63**: 332-334.
- Venegas, A., Hevia, E., Sánchez, H. 1988. Sequence of two tRNA genes from a *Thiobacillus ferrooxidans* ribosomal operon. *Nucleic Acid Res.* **16**: 8179-8184.
- Ward, D.M., Weller, R., Bateson, M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature (London)* **345**: 63-65.
- Ward, D.M., Bateson, M.M., Weller, R., Ruff-Roberts, A.L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. In *Advances in Microbial Ecology*. Marshall K.C. (ed.), Plenum Press, New York, 1992, vol. 12, p. 219-286.
- Wichlacz, P.L., Unz, R.F., and Langworthy, T.A. 1986. *Acidiphilium angustum* sp. nov., *Acidiphilium facilis* sp. nov., and *Acidiphilium rubrum* sp. nov.: Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic coal mine drainage. *Int.J. Syst. Bacteriol.* **36**:197.
- Woese, C. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- Woese, C., Kandler, O., Wheelis, M. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:4576-4579.
- Yap, E.P.H. y McGee, J.O. 1994. Non-isotopic single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of PCR products. En H.G. Griffin y A.M. Griffin(eds.), *PCR technology: current innovations*. pp. 165-177. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Yates, J.R., Lobos J.H., Holmes, D.S. 1986. The use of genetic probes to detect microorganisms in biomining operations. *J. Indust. Microbiol.* **1**:129-136.