

UCH-FC  
DOC-B  
P695

C.J

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO EN SUPERFICIE DE *Thiobacillus*  
*ferrooxidans*.

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

JOSE LEONARDO PIZARRO LUCERO

ENERO, 1996



Director de Tesis: Dr. Romilio Espejo Torres.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

I N F O R M E   D E   A P R O B A C I O N

T E S I S   D E   D O C T O R A D O

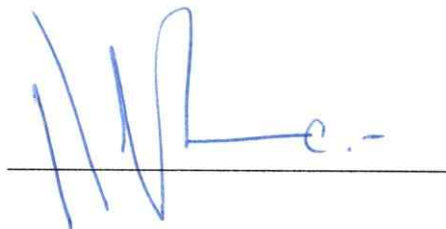
Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

JOSE LEONARDO PIZARRO LUCERO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 14 de Diciembre de 1995.

Director de Tesis:

Dr. Romilio Espejo T.



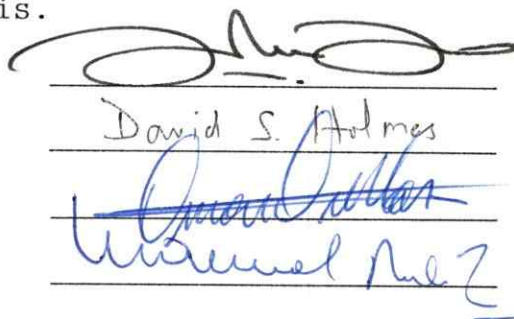
Comisión de Evaluación de la Tesis.

Dr. Carlos Jeréz

Dr. David Holmes

Dr. Omar Orellana

Dr. Manuel Rodríguez



David S. Holmes

A JACQUELINE, JAVIER Y ROCIO

A MIS PADRES

## AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

- Dr. Romilio Espejo T., por su permanente apoyo y motivación en la realización y finalización de esta tesis.
  
- Dra. María Orfelía Celedón, por otorgarme todas las facilidades para poder finalizar esta tesis.
  
- Dra. Mónica Vásquez y Sr. Jaime Romero por su amistad y permanente apoyo y colaboración.
  
- A la Dirección del Departamento de Medicina Preventiva Animal, en la persona del Dr. Héctor Alcaíno, por el permiso otorgado para concluir esta tesis.
  
- A todo el personal de los laboratorios de Virología de Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile y de la Gerencia de Investigación y Desarrollo de Sociedad Minera Pudahuel, por su permanente apoyo y amistad.
  
- A todas aquellas personas que colaboraron y apoyaron la realización de esta tesis.

## INDICE DE MATERIAS

	página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE MATERIAS.....	v
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS Y NOMENCLATURA.....	xiv
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	5
INTRODUCCION.....	8
1. Crecimiento de bacterias en minerales sujetos a biolixiviación.....	8
2. Microflora en los sistemas de biolixiviación.....	11
3. Cultivo de <i>T. ferrooxidans</i> en mineral.....	13

4. Cultivo de <i>T. ferrooxidans</i> en azufre elemental como modelo para el estudio del cultivo en superficie.....	19
5. Estudios de la población bacteriana que crece en mineral.....	21
5.1. Bacterias prevalentes en biolixiviación.....	23
5.2. Análisis directo de la población bacteriana.....	23
6. Determinación de la complejidad de la población bacteriana presente en distintos ecosistemas.....	25
7. Propiedades de las bacterias encontradas en biolixiviación. Diversidad intraespecie.....	27
MATERIALES Y METODOS.....	36
Cepas y aislados de referencia.....	36
Cultivo de <i>T. ferrooxidans</i> en medios de cultivo.....	36
Análisis bacteriano.....	37
Cinética de adsorción.....	38
Sistema experimental para la determinación de la proliferación en superficie de <i>T. ferrooxidans</i> .....	38
Biolixiviación en columnas.....	40
Toma de muestras.....	40
Extracción de ADN.....	41
Amplificación por PCR.....	42
Electroforesis en gel.....	43
Clonamiento y secuenciamiento.....	43
Análisis de secuencia.....	45

RESULTADOS.....	47
1. Caracterización del crecimiento de <i>T. ferrooxidans</i> sobre la superficie de azufre elemental.....	47
1.1. Colonización de la superficie de azufre elemental por <i>T. ferrooxidans</i> .....	47
Tipo de unión de las bacterias al azufre.....	49
1.2. Crecimiento de <i>T. ferrooxidans</i> sobre la superficie de azufre elemental.....	52
2. Estudio del crecimiento bacteriano en mineral.....	60
2.1. Extracción del ADN bacteriano por sonicación.....	60
2.2. Extracción del ADN bacteriano por lisis a alta temperatura en presencia de SDS.....	62
2.2.1. Extracción del ADN a partir de bacterias en suspensión.....	63
2.2.2. Extracción del ADN de las bacterias que crecen en el mineral.....	65
2.3. Determinación de la distribución bacteriana en el mineral lixiviado.....	67
3. Determinación de las especies bacterianas presentes en el ADN extraído del sistema de lixiviación.....	72
3.1. Amplificación de la región espaciadora intergénica de los ARNr 16S y 23S, a partir del ADN extraído directamente del sistema.....	72

3.1.1. Obtención de un ADN apropiado para la reacción de amplificación de la región espaciadora intergénica de los ARNr 16S y 23S.....	73
3.2. Amplificación de los ADNs obtenidos por extracciones secuenciales del mineral lixiviado.....	78
3.3. Determinación de la diversidad bacteriana presente en un sistema de biolixiviación de cobre por análisis de ADN.....	79
3.3.1. Análisis de las regiones espaciadoras entre los genes ribosomales 16S y 23S en aislados obtenidos a partir de operaciones de biolixiviación.....	79
3.3.2. Análisis de las regiones espaciadoras intergénicas de los RNA ribosomales 16S y 23S, de bacterias crecidas durante un proceso de lixiviación.....	85
3.3.3. Identificación de las bacterias crecidas cuando el mineral se lixivió sin Fe(II).....	88
3.3.4. Selección de la población bacteriana durante el crecimiento en medios de cultivos con diferentes fuentes de energía.....	91
3.3.5. Caracterización de las bacterias seleccionadas en los medios sintéticos con Fe(II).....	96



DISCUSION.....	99
1. Crecimiento bacteriano en azufre y extrapolación al crecimiento en mineral.....	99
2. Diversidad poblacional bacteriana.....	105
3. Implicancia de los resultados en la lixiviación industrial.....	113
CONCLUSIONES.....	123
BIBLIOGRAFIA.....	127

## LISTA DE TABLAS

	página
Tabla 1. Bacterias que permanecen unidas al azufre al tratar por 1 hora con distintas concentraciones de SDS.....	49
Tabla 2. Desorción de las bacterias unidas al azufre por efecto del detergente Tween 20.....	50
Tabla 3. Cinética de adsorción sobre azufre de <i>T. ferrooxidans</i> crecidos en Fe(II) o azufre.....	51
Tabla 4. Adsorción sobre azufre elemental de las bacterias tratadas por 5,5 horas con 0, 5 y 50 ppm de Hg(II).....	52
Tabla 5. Tamaño estimado de los productos de la amplificación de la región espaciadora intergénica de los genes ribosomales de los ARN 16S y 23S, en cepas pertenecientes a diferentes especies asociadas a la biolixiviación.....	84
Tabla 6. Similitud de secuencias entre los genes del ARNr 16S.....	90

## LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Distribución de las bacterias a distintas distancias de la superficie de un sustrato, de acuerdo a la ecuación de sedimentación a equilibrio.....	17
Figura 2. Diseño experimental para determinar la dinámica de crecimiento de <i>T. ferrooxidans</i> sobre la superficie del azufre.....	39
Figura 3. Fotografías de la colonización de <i>T. ferrooxidans</i> de las superficies de azufre ubicadas paralelas a la fuerza de gravedad.....	54
Figura 4. Fotografía de la acumulación bacteriana sobre la superficie del azufre ubicada perpendicular a la fuerza de gravedad.....	55
Figura 5. Esquema de la distribución bacteriana en la superficie lateral del azufre.....	55
Figura 6. Fotografía de colonias de <i>T. ferrooxidans</i> sobre la superficie del azufre.....	58
Figura 7. Esquema de la distribución bacteriana esperada sobre la superficie de mineral.....	59

Figura 8. Efecto del mineral sobre la lisis por sonicación.....	61
Figura 9. Efecto del mineral sobre el ADN bacteriano.....	62
Figura 10. Efecto de la temperatura, fuerza iónica y presencia del mineral sobre la extracción de ADN.....	63
Figura 11. Efecto del SDS y tiempo de lisis sobre la extracción de ADN.....	64
Figura 12. ADN bacteriano de la extracción de 1 gramo de mineral.....	67
Figura 13. Extracción del ADN de las bacterias presentes en el sobrenadante.....	68
Figura 14. ADN obtenido de extracciones sucesivas del mineral.....	70
Figura 15. Amplificados del ADN de <i>T. ferrooxidans</i> y de las bacterias del mineral.....	73
Figura 16. Tratamiento enzimático del ADN extraído del mineral.....	75
Figura 17. Purificación del ADN extraído por Sefadex G/200.....	76
Figura 18. Amplificados del ADN extraído de <i>T. ferrooxidans</i> y del mineral.....	77
Figura 19. Amplificados del ADN obtenido de las extracciones secuenciales.....	79

Figura 20. Amplificados de las regiones espaciadoras de diferentes cepas de <i>L. ferrooxidans</i> y <i>T. thiooxidans</i> .....	80
Figura 21. Amplificados de las regiones espaciadoras de diferentes cepas de <i>T. ferrooxidans</i> .....	82
Figura 22. Amplificados de las regiones espaciadoras de las bacterias presentes en el mineral y en las soluciones efluentes.....	86
Figura 23. Amplificados de las regiones espaciadoras clonadas.....	89
Figura 24. Amplificados de las regiones espaciadoras de las bacterias presentes en el mineral de las columnas y luego de cultivar en Fe(II).....	93
Figura 25. Amplificados de la región espaciadora de las bacterias presentes en las soluciones de lixiviación y luego de cultivar en Fe(II).....	95
Figura 26. Patrones de restricción de los amplificados de las regiones espaciadoras de las bacterias aisladas.....	97

## ABREVIATURAS O NOMENCLATURAS

ADN: Acido desoxiribonucleico

ARN: Acido ribonucleico

ARNr: Acido ribonucleico ribosomal.

ARNsa A: Ribonucleasa A

ATCC: Colección americana de microorganismos y células de cultivo.

°C: grados celcius

dATP, dCTP, dGTP, dTTP: desoxiribonucleótidos

DSM: Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares.

Fe(II): ión ferroso

Fe(III): ión férrico

x g: fuerza de gravedad

g/l: gramos/litro

IFO: Instituto de Fermentación de Osaka.

ng: nanogramos

p/v: peso/volumen

pb: pares de bases

ppm: partes por millón

PCR: Reacción de la 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.

TE: Solución tampón Tris 10 mM - EDTA 1 mM

ug: microgramos

ug/ml: microgramos/ml

## RESUMEN

La biolixiviación es parte de un proceso de extracción de cobre y otros metales que depende fundamentalmente del aumento de la oxidación de los sulfuros del mineral por parte de los microorganismos que crecen en el sistema. En esta tesis se estudió algunos aspectos del crecimiento de las bacterias en el mineral biolixiviado.

Este trabajo consta de dos partes: en la primera parte se estudió la colonización de *T. ferrooxidans* sobre la superficie de un sustrato oxidable. La colonización se estudió desde el punto de vista de los requerimientos de unión a la superficie a colonizar y del tipo de estructura de crecimiento que las bacterias son capaces de formar sobre la superficie colonizada. Para este estudio se utilizó azufre elemental como superficie y fuente de energía, por ser el sistema más adecuado para el diseño experimental utilizado. La adsorción y proliferación de las bacterias en las diferentes superficies se siguió por observación directa o por tinción con un fluorocromo. Las observaciones se registraron en video. Los resultados sobre la dinámica de ésta colonización y la distribución de las bacterias indicaron que las bacterias forman una monocapa de células que finalmente logra saturar la superficie de azufre. Estas



bacterias permanecen unidas apicalmente y no están en equilibrio con las bacterias en suspensión. Las observaciones sobre la influencia de la gravedad en la colonización bacteriana muestran que ésta determina la distribución de la progenie de acuerdo a la ubicación de las superficies colonizadas con respecto a la gravedad. En las regiones de la superficie que se encuentran ubicadas en forma paralela a la fuerza de gravedad se observó la formación de una monocapa de células, pero en aquellas regiones de la superficie que enfrentaban la fuerza de gravedad, se observó una acumulación de bacterias, pero sin llegar a la formación de un biofilm. Estas observaciones son extrapoladas a la posible distribución de las bacterias sobre las superficies del mineral durante la lixiviación. Con respecto a la adsorción inicial de las bacterias al azufre, se concluye que la unión sería de tipo hidrofóbica y no requeriría de bacterias metabólicamente activas (incapaces de multiplicarse y de llevar a cabo respiración oxidativa).

En la segunda parte de ésta tesis, se estudió la población bacteriana prevalente en un sistema de biolixiviación y cómo ésta se ve influenciada por cambios en la composición del medio lixivante. La composición de la población bacteriana presente en columnas experimentales de biolixiviación de cobre se determinó por el análisis del ADN extraído a partir de mineral y de soluciones de lixiviación. Se empleó éste método para evitar una potencial selección

durante la proliferación de la bacteria en los medios de cultivos convencionales.

El análisis inicial consistió en la observación de las regiones espaciadoras ubicadas entre los genes ribosomales 16S y 23S en los loci genéticos de los ARNr bacterianos luego de la amplificación por PCR. La comparación del tamaño aparente de las regiones espaciadoras amplificadas a partir del ADN extraído, con aquellas obtenidas a partir de las principales especies que han sido aisladas de sistemas de biolixiviación, permitió una identificación preliminar de las especies bacterianas. La identificación definitiva de las bacterias se hizo por secuenciamiento parcial de los genes del ARNr 16S, adyacentes a las regiones espaciadoras observadas. Este análisis indicó la presencia de poblaciones bacterianas diferentes en columnas lixiviadas con diferentes concentraciones de Fe(II). En las columnas lixiviadas con una alta concentración de Fe(II), el principal producto observado correspondió a la región espaciadora de *Thiobacillus ferrooxidans*. A bajas concentraciones de Fe(II), ninguno de los productos obtenidos correspondió al de *T. ferrooxidans*, detectándose en gran abundancia dos regiones espaciadoras que de acuerdo al tamaño de éstas y a la secuencia de los genes ARNr 16S adyacentes, corresponden a cepas de las especies *Thiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. Esto indicaría que el tipo de fuente de energía disponible en el sistema de biolixiviación va a ser determinante en

seleccionar a las especies prevalentes en el sistema.

Se observaron drásticos cambios en la composición de la población luego de cultivar muestras de las columnas en un medio que contenía Fe(II) como fuente de energía, observándose una fuerte selección de *T. ferrooxidans*, lo que concuerda con la prevalencia de éstas especies, determinada por métodos de cultivo. En cambio, el cultivo en mineral seleccionó una población con una composición similar a la observada en la muestra original.

Finalmente se discuten las proyecciones de los resultados obtenidos sobre la optimización de los procesos industriales de biolixiviación.

## SUMMARY

Bioleaching is part of a copper extraction process that depends primarily on the bacterial enhancement of copper sulfides oxidation. In this thesis some relevant aspects of the growth of bacteria in the leached ores were studied.

This thesis consists of two parts. First, the growth of *T. ferrooxidans* on the solid surface was studied. The growth was studied in two ways: (i) the requirements for bacterial attachment to the surfaces consisting of elemental sulfur were identified and (ii) the kind of growth structures that the bacteria are able to form on these surfaces were described. Growth and accumulation of bacteria on the different surfaces was followed by optical microscopy either by direct observation or after staining. Observations were recorded on video tape. The results on the growth dynamic and the distribution of the bacteria showed that bacteria grew as a monolayer of cells that finally covered the whole sulfur surfaces. These bacteria were irreversibly, apically bound to the substrate. The observations about the influence of gravity on the bacteria growth, indicated that this force determines the distribution of the progeny according to the location of the colonized surfaces with respect to gravity. A monolayer of cells is developed on the surfaces located parallel to gravity. In contrast, the upward facing surfaces,

located perpendicular to gravity, bacteria accumulated more than one layer of bacteria but in a form different from a biofilm. The early attachment to the sulfur does not require metabolically active bacteria and the attachment would be hydrophobic.

In the second part of this thesis, the composition of bacterial population in the bioleaching system and the effect on this population of different leaching solutions were studied. The composition of bacterial population in experimental copper bioleaching columns was investigated by analysis of DNA extracted from ores and leaching solutions. This method was employed to avoid potential selection upon growth in conventional culture media. The initial analysis consisted of the observation of the spacer regions between the 16S and 23S genes in the bacterial rRNA genetic loci after PCR amplification. Comparison of the apparent size of the spacer regions amplified from the extracted DNA with those obtained from reference species that have been previously isolated from bioleaching systems, allowed a preliminary assessment of the bacterial species. Identification of the bacteria was subsequently done by partial sequencing of the 16S rRNA genes adjacent to the observed spacer region. An analysis of the DNA isolated from columns leached at different iron concentrations indicated the presence of a mixture of different bacteria that changed according to the ferrous iron concentration in the leaching

solution. At high ferrous iron concentration, the spacer region found in *T. ferrooxidans* was the main product observed. At low ferrous iron concentration, none of the DNA products corresponded to that obtained from *T. ferrooxidans*. Instead, two spacer regions of different lengths were observed in greater abundance. According to the lengths of the spacer regions and the DNA sequence of their neighboring 16S rRNA genes, they corresponded to the species *T. thiooxidans* and *L. ferrooxidans*.

Drastic changes in population composition were observed after cultivation of samples from bioleaching systems in medium containing ferrous iron as energy source. A strong selection of *T. ferrooxidans* was observed, that is according to the observed prevalence of this bacterial strain with culture method. Cultivation on a mixture of minerals, selected instead, a population with similar composition to that observed in the original sample.

Finally, the impact of the obtained results on the optimization of the bioleaching process was discussed.

## INTRODUCCION

### 1. Crecimiento de bacterias en minerales sujetos a biolixiviación.

La biolixiviación es un proceso industrial de creciente aplicación en la minería del cobre. Este proceso permite la obtención del cobre al estado de sulfuros secundarios ( $\text{CuS}$  y  $\text{Cu}_2\text{S}$ , covelina y calcosina respectivamente), por el aumento de la oxidación química natural producto del metabolismo de los microorganismos presentes en el mineral. Se estima que este proceso de obtención de cobre, es responsable de más del 10% del cobre obtenido en Estados Unidos y que su utilización aumentará notablemente en el futuro. La razón de ello es que es un proceso industrial que resulta tener un menor costo de producción que el método tradicional y porque además genera una menor contaminación del medio ambiente (48).

Actualmente existen varias técnicas de biolixiviación que se aplican en procesos a escala comercial. Entre las principales tenemos: la lixiviación *in situ*, lixiviación en vertederos, lixiviación en pilas, 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 tienen un bajo porcentaje del mineral. La lixiviación en pilas, estanques y por agitación pueden

aplicarse a minerales de alta ley. La lixiviación en reactores se aplica solamente en la extracción de metales usando concentrados del mineral (48).

En nuestro país, Sociedad Minera Pudahuel (SMP), en su mina de Lo Aguirre obtiene la totalidad del cobre que produce utilizando el proceso de biolixiviación en pilas de mineral aglomerado. En 1994, comenzaron a funcionar otras dos minas que utilizan esta tecnología: Quebrada Blanca y Cerro Colorado.

El proceso de biolixiviación aplicado en estas tres plantas mineras, básicamente, consiste en triturar el mineral a lixiviar hasta un tamaño de 0,5 cm, aproximadamente. Luego, el mineral se mezcla con una solución diluída 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 estructuras esféricas en las cuales en el centro se ubican las partículas grandes de mineral y sobre éstas se ubican los trozos más pequeños, conformando lo que se llama un "mineral aglomerado" ó "aglomerado". Posteriormente, el mineral aglomerado se deposita en pilas de 3 a 6 metros de altura, las cuales se riegan con una solución ácida diluida de ácido sulfúrico, denominada "Refino", sin llegar a inundar la pila.

A medida que la solución lixiviante pasa a través de la pila, el cobre que se encuentra en la solución que rodea al mineral aglomerado pasa a la solución lixiviante que fluye a



través de la pila. De esta manera la solución lixiviante se va enriqueciendo con el cobre lixiviado, el que finalmente, por procesos de extracción por solvente (SX) y posterior electrólisis dará lugar a la obtención de cobre catódico con una pureza superior al 99,9 %.

Las reacciones de oxidación de los sulfuros secundarios en el mineral, aumentada por la acción de la microflora presente, que van a permitir la solubilización del cobre, ocurrirán en cada partícula de mineral que tenga las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos responsables de la lixiviación. Es por ello que la obtención del mineral aglomerado adecuado es un punto crítico del proceso, ya que de esta manera el interior de la pila de mineral queda en condiciones que permiten una alta permeabilidad líquida y gaseosa que va a conducir a un activo crecimiento bacteriano.

Al regar estas pilas con la solución lixiviante, preocupándose de no hacerlo en exceso, es decir, sin llegar a inundar el mineral regado, el refino es capaz de pasar a través de la pila de mineral, sin romper la aglomeración del mineral. Esto sería así, ya que sobre cada partícula de mineral aglomerado, se formaría una capa estacionaria de líquido, lo cual haría que el líquido de regado no entre en contacto directo con el mineral, disgregándolo, sino que sólo lo haría con esta capa de líquido estacionario, situación similar a lo que ocurre en el interior de un tubo por el cual

pasa un flujo laminar de una solución cualquiera.

En un sistema de este tipo, todos los mecanismos de transporte de solutos entre el líquido que fluye y la superficie del mineral, se haría por difusión a través de esta capa estacionaria.

El proceso oxidativo de los sulfuros presentes en el mineral, si bien ocurre en forma química, requiere ser acelerado para su utilización como un proceso industrialmente viable en la recuperación de cobre. En la naturaleza, este proceso oxidativo se ve acelerado por la acción de los microorganismos presentes en el sistema de lixiviación (22,27,48).

Debido a la importancia que está adquiriendo este proceso en la producción mundial de cobre a partir de sulfuros secundarios, es importante conocer más sobre el crecimiento de las bacterias presentes en los minerales lixiviados, tanto desde el punto de vista de la diversidad de la población, como de su comportamiento bajo las condiciones de biolixiviación. Esto, 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 la eficiencia de éste.

## **2. Microflora en los sistemas de biolixiviación.**

Al estudiar los tipos de microorganismos presentes en los distintos sistemas de biolixiviación, no se ha encontrado una

población tan diversa como la observada en otros ecosistemas naturales, tales como suelo, aguas, etc, probablemente por constituir un ecosistema de condiciones extremas (alta acidez, hiperosmótico, metales pesados). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la identificación de la población microbiana presente en los sistemas de biolixiviación, generalmente se ha hecho por el cultivo de los microorganismos, lo que podría subestimar el número real de especies microbianas. Por lo tanto, el empleo de nuevas técnicas de identificación, que no utilizan el cultivo dentro de su metodología, podría aumentar la diversidad de los microorganismos aislados de los sistemas de biolixiviación.

La microflora detectada se encuentra compuesta por protozoos, tales como *Amoebas* y *Euglenas* y hongos, tales como *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichosporon* y *Rhodotorula*. Sin embargo, la población de microorganismos más numerosa está compuesta por bacterias (48). 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 que están la mayoría de los procesos industriales hoy en uso, incluyendo mina Lo Aguirre, se ha observado la presencia de varias especies de bacterias litotróficas, altamente acidófilas, entre las cuales tenemos a *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y bacterias heterotróficas

acidófilas del género *Acidiphilium*, tales como *A. cryptum*, *A. angustum*, *A. facilis*, *A. rubrum* y *A. organovorum* (22,48). A temperaturas mayores de 45 °C, las especies bacterianas dominantes cambian, predominando entre otras *Thiobacillus TH*, una cepa moderadamente termofílica y varias especies de *Sulfobacillus*, como por ejemplo, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. A temperaturas aún mayores, se ha encontrado que predominan bacterias termófilas extremas del tipo arquea, tales como *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus ambivalens* y *Acidianus brierleyi* (22,48).

En procesos industriales de biolixiviación llevados a cabo a temperatura ambiente, debido a su ubicuidad y a su capacidad para crecer solubilizando los cationes metálicos unidos a sulfuros insolubles, *T. ferrooxidans* es considerado el miembro más importante de la población bacteriana y por consecuencia el principal responsable del proceso de biolixiviación (22,46,48). Debido a esto, es que los investigadores que trabajan en biolixiviación realizan grandes esfuerzos en la investigación de ésta bacteria, ya que un mayor conocimiento sobre su fisiología, permitiría mejorar una operación industrial de biolixiviación.

### 3. Cultivo de *T. ferrooxidans* en mineral.

Para explicar el efecto catalítico del proceso oxidativo de sulfuros por la acción de *T. ferrooxidans*, se han

postulado dos mecanismos. En uno, el "efecto indirecto", la oxidación de los sulfuros se llevaría a cabo por el Fe(III) presente en las soluciones de lixiviación y la función que tendría la bacteria en este proceso sería la regeneración del Fe(III), por oxidación del Fe(II). En el mecanismo de "efecto directo" en cambio, la acción catalizadora de la bacteria se postula que estaría dada por la secreción de moléculas que actuarían directamente sobre el mineral removiendo el azufre y transportándolo al interior de la célula para ser oxidado (27,47).

El requerimiento de contacto entre *T. ferrooxidans* y los sulfuros insolubles a ser lixiviados es imprescindible para lograr un efecto directo y tal vez también en el efecto indirecto, ya que ha sido postulado como un factor clave en la lixiviación microbiológica de sulfuros. Esto debido a que en cultivos en mineral, la mayoría de las bacterias se encuentran unidas a él (64), incluso dejando rastros de su unión a través de marcas de erosión del tamaño de la bacteria sobre la superficie del mineral (3,4,47). Se postula, que este halo de corrosión podría deberse a la acción de un metabolito sintetizado por la bacteria luego de unirse a la superficie del mineral (47). Apoyando lo anterior, se ha observado que moléculas tensoactivas, tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria en mineral (4).

En pirita, aparentemente la corrosión bacteriana de la

superficie de un mineral sería producto de la acción conjunta del Fe(III), producido como consecuencia de la oxidación bacteriana del Fe(II) en solución (efecto indirecto) y de la acción de la bacteria sobre la superficie de la pirita (efecto directo) (58).

La fase inicial de la colonización del mineral por las bacterias suspendidas en la solución de lixiviación, presenta como primer paso la adhesión de las bacterias al mineral.

La adhesión de una bacteria a un sustrato puede ser descrita en términos de dos aproximaciones fisicoquímicas, por la teoría DLVO y por el balance de energías de Gibbs superficiales (37,38). Según la teoría DLVO, que considera a las bacterias como partículas coloidales vivas, cuando las bacterias se acercan a la superficie de un sustrato, la adhesión de las bacterias a este sustrato va a depender de las interacciones de rango largo que se establezcan entre las superficies de la bacteria y el sustrato (sumatoria entre las interacciones de Van der Waals y las interacciones electrostáticas). El que haya adhesión dependerá de cuán cerca las interacciones de rango largo permitan que la bacteria se acerque al sustrato.

Si la bacteria puede acercarse lo suficiente al sustrato, se unirá reversiblemente a éste. Pero si las interacciones de rango largo permiten a la bacteria llegar muy cerca de la superficie del sustrato, la interacción adhesiva entre la bacteria y el sustrato no podrá ser explicada por la teoría

DLVO, sino que por las interacciones de rango corto, que podrían permitir la adhesión irreversible de la bacteria al sustrato. Para que ello ocurra, la unión deberá estar termodinámicamente favorecida, en términos de que la energía interfacial bacteria-mineral sea menor a la suma de las energías interfaciales bacteria-liquido y mineral-liquido (37,38).

Para que las bacterias puedan adherirse a la superficie de un sustrato, tienen que acercarse a la superficie de éste. En un sistema sin agitación, con bacterias no móviles, los principales mecanismos que harían que las bacterias se acerquen a la superficie del sustrato, serían la sedimentación por efecto de la gravedad y la difusión por movimiento Browniano.

La difusión por movimiento Browniano para una bacteria se ha estimado aproximadamente en  $55 \times 10^{-8}$  mm<sup>2</sup>/segundo (28,57) y si bien el coeficiente de sedimentación de *T. ferrooxidans* no ha sido determinado, se sabe que el coeficiente de sedimentación de una bacteria tipo es del orden de  $1 \times 10^{-8}$  segundos.

Al aplicar la ecuación de sedimentación a equilibrio para un sistema de dos componentes, que considera tanto la difusión por movimiento browniano como la sedimentación por gravedad de la partícula, con el fin de calcular la distribución de las bacterias sobre la superficie de un sustrato sumergido en una solución, se puede apreciar que la

mayoría de las bacterias se encontrarían sobre la superficie superior del mineral, cruzando la capa de líquido estático que rodea a las partículas (figura 1).

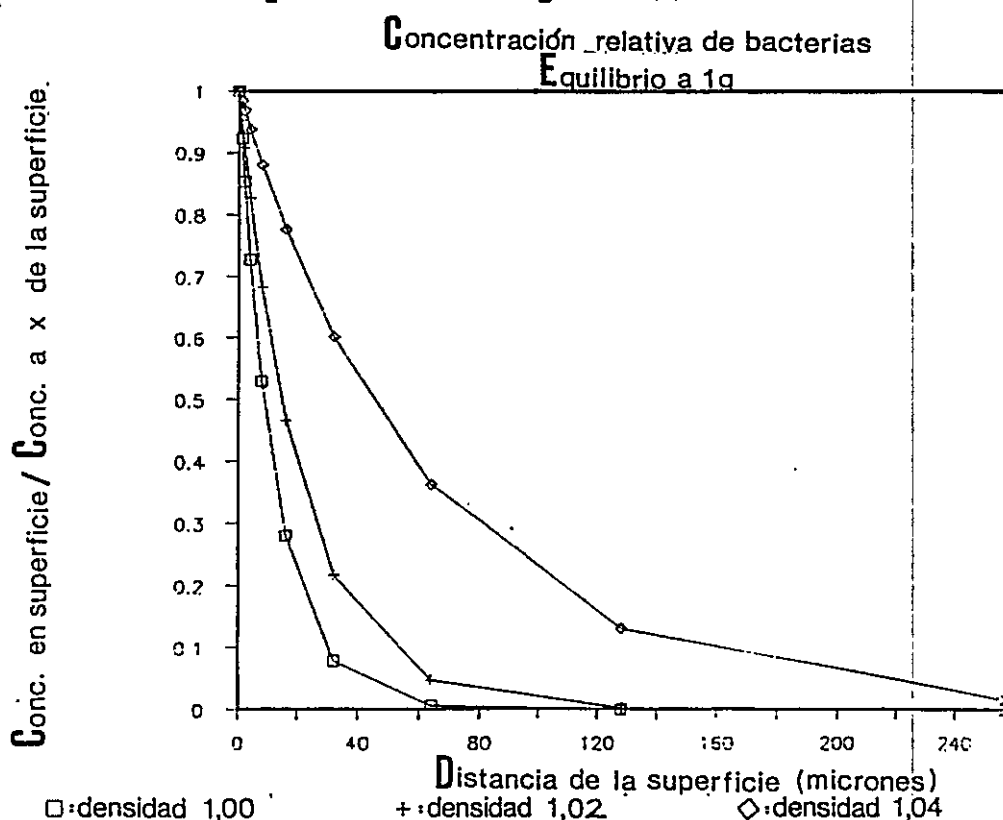


Figura 1. Distribución de las bacterias a distintas distancias de la superficie de un sustrato, de acuerdo a la ecuación de sedimentación a equilibrio. Dens: Densidad de la solución.

Bajo estas consideraciones, el mecanismo más importante que haría que las bacterias se acerquen a la superficie de los minerales lixiviados, sería por sedimentación sobre la superficie superior de las partículas.

Las bacterias al proliferar sobre la superficie colonizada, pueden eventualmente llegar a formar un biofilm bacteriano (10,17,56). Si bien hay evidencias de que *T. ferrooxidans* es capaz de formar una estructura de este tipo



(31), en ese caso en particular la bacteria se cultivó sobre un soporte inerte (poliestireno) y la fuente de energía se encontraba en forma soluble (Fe(II)). En nuestro caso, la fuente de energía se encuentra en el soporte sobre el cual va a crecer la bacteria. Por lo tanto, la formación de un biofilm dependerá de si la bacteria es capaz o no de sintetizar una matriz orgánica, generalmente de tipo polisacárida, al crecer en la superficie del azufre, de tal manera de mantener a las bacterias inmersas en ella y si así lo hiciera, ser capaz de transportar la fuente de energía hacia el interior del biofilm. Solo si la bacteria es capaz de cumplir con estos requerimientos al proliferar sobre la superficie del azufre podría formar un biofilm.

Al determinar la unión irreversible de *T. ferrooxidans* sobre la pirita presente en carbón, primer paso en la colonización del sustrato, se observó que esta es extremadamente rápida, eficiente y selectiva (90% de la población bacteriana en suspensión, se une al sustrato en menos de 2 minutos postinoculación). En este caso no toda la superficie es adecuada para la unión de la bacteria y esta ocurriría predominantemente en zonas expuestas de pirita en el sustrato (2,40). Experiencias similares en minerales como pirita y calcopirita, han confirmado la selectividad de esta unión (43).

Al cultivar *T. ferrooxidans* en minerales que constituyen su fuente de energía, se ha observado que aumenta la

hidrofobicidad de la superficie bacteriana (12). Estudios utilizando espectroscopía infraroja indican que esto se debería a la síntesis de una molécula de origen proteico, que no se encuentra cuando la bacteria se cultiva con una fuente de energía soluble como Fe(II) (12). Si bien la función de este cambio no ha sido dilucidada, pensándose en un posible rol en la adhesión de las bacterias a la superficie del mineral, esto nos indica que el crecimiento en superficie de la bacteria, determina cambios importantes en su fisiología.

Una evidencia que confirma lo anterior se observa al cultivar *T. ferrooxidans* en un reactor, utilizando poliestireno como soporte sobre el cual proliferar y con Fe(II) como fuente de energía (31). En estas condiciones la bacteria es capaz de formar un biofilm y se comporta fisiológicamente distinta a como lo hace al cultivarse en suspensión. Así por ejemplo, la velocidad de oxidación de Fe(II), que en un cultivo en suspensión de la bacteria, tiene un óptimo a 30 °C y pH 2,2, con inhibición de la reacción a concentraciones de Fe(III), superiores a 6 g/l, se hace casi independiente a cambios de temperatura entre 13 y 38 °C; de pH entre 1,3 y 2,2 y no hay inhibición por concentraciones de Fe(III) hasta de 14 g/l.

#### 4. Cultivo de *T. ferrooxidans* en azufre elemental, como modelo para el estudio del cultivo en superficie.

Las bacterias que se encuentran presentes en un sistema

de lixiviación pueden proliferar en dos formas: en suspensión en la solución lixivante, utilizando los solutos necesarios para su crecimiento a partir de los solutos solubles, presentes en la solución de lixiviación; ó unidas al mineral, situación en la cual pueden oxidar sustratos insolubles.

En cuanto a las características de la proliferación de la bacteria sobre la superficie del sustrato colonizado, poco es lo que se sabe al respecto. A pesar de que la proliferación de esta bacteria en los procesos de lixiviación tiene características del tipo señalado, su fisiología se ha estudiado principalmente en suspensión, en estado planctónico. Pocos esfuerzos han sido publicados para entender el crecimiento de esta bacteria cuando se encuentra unida a superficies sólidas (3,4,14,15,47).

Al estudiar el crecimiento de *T. ferrooxidans* sobre perlas de azufre elemental como única fuente de energía, se ha podido determinar que en los estadios tempranos del crecimiento, toda la progenie queda inmediatamente adsorbida, pero a medida que el crecimiento avanza, se observa un aumento de las bacterias libres, debido a la liberación de la progenie resultante de la replicación de un número constante de bacterias adsorbidas, pero que sin embargo no serían metabólicamente activas (14). Estudios recientes indicarían que las bacterias que se encuentran en solución también serían capaces de duplicarse sin necesidad de estar unidas directamente a la superficie del azufre, debido a la

utilización de metabolitos intermediarios de la oxidación del azufre, principalmente sulfitos y tiosulfatos, liberados a la solución como producto de la actividad oxidativa bacteriana en la superficie del azufre (5). Esto indicaría que en un cultivo de *T. ferrooxidans* utilizando azufre sólido como fuente de energía, las bacterias no necesariamente van a tener que estar unidas sobre la superficie del azufre para ser metabólicamente activas y poder crecer y duplicarse.

Aparentemente, la estructura cristalina del azufre es importante en el crecimiento bacteriano, al igual que lo observado en pirita, ya que no toda la superficie del azufre es capaz de ser colonizada por la bacteria, pues aún después de 4 meses es posible observar zonas sin crecimiento bacteriano (14,33).

En presencia de  $Fe(II)$ , una fuente de energía soluble, las bacterias son capaces de unirse y crecer sobre el azufre con la misma eficiencia mostrada en ausencia de  $Fe(II)$ , ya que *T. ferrooxidans*, puede utilizar simultáneamente ambas fuentes de energía (15). Aunque bajo estas condiciones, si bien la velocidad de oxidación de azufre no se ve alterada, la velocidad de oxidación de  $Fe(II)$ , es 3 a 7 veces menor que la obtenida con la bacteria adaptada a crecer en  $Fe(II)$  (14,15).

**5. Estudios de la población bacteriana que crece en mineral lixiviado.**

### 5.1. Bacterias prevalentes en biolixiviación.

La investigación microbiológica de un sistema de biolixiviación de este tipo se centró inicialmente en la identificación de los principales microorganismos presentes en el sistema. Estos estudios, que utilizan técnicas convencionales de aislamiento bacteriano consistentes en la proliferación de las bacterias presentes en una muestra natural en medios de cultivos con Fe(II) o azufre elemental, llevaron a aceptar que la bacteria prevalente era *T. ferrooxidans* y como especies secundarias era posible encontrar a *T. thiooxidans*, *L. ferrooxidans*, algunos heterótrofos del género *Acidiphilium*, etc (22,27,48). Sólo en algunos casos aislados se han estudiado por cultivo en minerales sulfurados o en medios diferentes, lo que ha conducido al aislamiento de nuevas especies como, *Thiobacillus cuprinus*, cultivado en medio con minerales (26).

Esta tesis se inició con el convencimiento que *T. ferrooxidans* constituía la bacteria mas importante en biolixiviación. Sin embargo hallazgos recientes, obtenidos en la determinación de las bacterias presentes en diversos ecosistemas por el uso de técnicas moleculares que no emplean cultivo dentro de su metodología, han indicado que en la mayoría de los casos los microorganismos encontrados no corresponden a los identificados previamente por los métodos tradicionales de cultivo (60,53,36,18,8).

En vista de que la aceptada prevalencia de *T.*

*ferrooxidans* en los sistemas de biolixiviación se ha obtenido por los métodos de cultivo tradicionales, que podrían haber alterado la composición de la población bacteriana inicialmente presente en el sistema, esto nos llevó a considerar que era necesario revisar la supuesta prevalencia de *T. ferrooxidans* en el sistema, y por ende su uso como bacteria modelo en los estudios microbiológicos de optimización de procesos industriales de biolixiviación. A continuación se revisa esta situación.

#### **5.2. Análisis directo de la población bacteriana en mineral biolixiviado.**

Los medios de cultivo utilizados para el análisis de las bacterias en un sistema de lixiviación, no reproducen las condiciones de lixiviación y constituyen en realidad medios selectivos, donde sólo una fracción de los microorganismos originalmente presentes son capaces de crecer. Así, al cultivar, es posible obtener una población final donde la(s) bacteria(s) prevalente(s), es decir las que se encuentran en mayor número, pueden haber representado sólo una pequeña fracción de la población original. Además, la fisiología de los microorganismos crecidos en el laboratorio, sólo es válida bajo esas condiciones, lo cual en muchos casos dista bastante de las condiciones naturales en las cuales el microorganismo crece en su ambiente natural.

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 (49, 60, 61). 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, ión Fe(II) o azufre (19, 21, 22).

El análisis directo de la población bacteriana, ha permitido sugerir que *T. ferrooxidans*, la especie considerada más importante en biolixiviación, podría no constituir la especie prevalente. Muyzer y colaboradores 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* (39). Apel y colaboradores obtuvieron resultados similares analizando muestras de soluciones que drenaban de una mina de cobre (1). Por otra parte, 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 (52). El

aislamiento de ARNr 5S no identificados también da resultados sugerentes de la presencia de especies bacterianas en estos sistemas que aun no han sido identificadas por los métodos tradicionales de cultivo (34) (ver más adelante).

#### **6. Determinación de la complejidad de la población bacteriana presente en distintos ecosistemas.**

Para estudiar la diversidad de una población bacteriana en muestras naturales, se han desarrollado estrategias que han permitido detectar aquellos microorganismos que no pueden ser cultivados en el laboratorio. Así por ejemplo, el aislamiento y análisis de las secuencias de los ARNrs 5S y 16S directamente del sistema, ha 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 (8,18,34,36,53,60). Esta metodología presenta no solo la ventaja de que el análisis no se encuentra limitado a organismos que pueden ser cultivados en el laboratorio, ya que por la comparación de las secuencias de los ARNrs ribosomales obtenidos, con aquellas de las de microorganismos de colecciones de cultivo disponibles en los bancos de datos, se puede establecer la diversidad 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 las secuencias de los ARNr a partir del ADN de los microorganismos presentes en muestras naturales, potencialmente pueden imponer una selección de las secuencias que van a ser aisladas. Esto porque cuando el secuenciamiento se hace a partir de los genes de los ARNr, se hace necesario clonar los genes y la síntesis del cADN previo a clonar potencialmente podría seleccionar aquellas secuencias que interactúan favorablemente con los partidores o polimerasas (53). Además, los distintos tipos de secuencias de los ARNr aislados de una muestra natural, lo que representan realmente es la diversidad genética de los ARNr presentes en el sistema analizado y no es tan claro que ello implique necesariamente microorganismos distintos, ya que podrían haber microheterogeneidades de los genes de los ARNr dentro de un determinado género o especie, producto de la divergencia y especiación de líneas celulares que ocurriría por la variabilidad del hábitat (adaptación microgeográfica) o por la presión selectiva que podrían provocar infecciones virales (18).

El análisis de los ARNr 5S aislados a partir de una muestra de solución lixivante, permitió aislar dos tipos de

ARNr 5S, de los cuales 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 (34). Por otra parte, en el análisis de los ARNrs 16S aislados directamente de los microorganismos que crecen en agua de mar, se ha determinado la presencia de un gran número de especies filogenéticamente relacionadas, que no pertenecen a ninguno de los microorganismos previamente cultivados (8,18,53). 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 (60). Análisis de los ARNrs 16S aislados a partir de muestras de suelo, han conducido a los mismos resultados (36).

#### **7. Propiedades de las bacterias encontradas en biolixiviación. Diversidad intraespecie.**

Las bacterias cultivadas y clasificadas como *T. ferrooxidans* presentan una gran variedad genotípica.

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 entre sí que la existente entre algunos aislados de *T. ferrooxidans* con *T. thiooxidans* (19,35,62). Esto sugiere que distintos aislados de *T. ferrooxidans* podrían presentar diferencias importantes en su comportamiento fenotípico reflejando las diferencias genotípicas encontradas.

Estudios basados en otras propiedades, como composición de ácidos grasos, componentes respiratorios y secuencia del ARNr 5S, también permiten observar la gran heterogeneidad existente entre aislados de estas especies (7,34).

La hibridación de ácidos nucleicos, como por ejemplo la hibridación entre moléculas de ADNs, también se utiliza para medir las relaciones filogenéticas entre las bacterias, aunque en este caso los estudios se ven restringidos a determinar las relaciones existentes dentro de las bacterias de un género en particular (62). 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 (20,21,22,23,24).

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 grupo no inferiores al 70% y con tan bajos porcentajes de similitud entre los aislados

pertenecientes a distintos grupos, que por criterios aplicados en la definición de la mayoría de las otras especies, podrían agruparse en varias especies diferentes (21,22,24).

Por otra parte, 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 (20,23,24). 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%. (19,21,34,35).

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 (20).

En todo caso cabe hacer ciertas consideraciones con respecto a los resultados obtenidos empleando la técnica de hibridación entre ADNs genómicos para determinar la diversidad genética entre distintos aislados de las especies más frecuentemente encontradas en biolixiviación. Si bien esta es una técnica aceptada en la determinación de relaciones filogenéticas entre bacterias pertenecientes a un género determinado (62), los resultados obtenidos son muy dependientes de las condiciones en las cuales se desarrolla

la reacción. El tamaño del ADN utilizado, la temperatura de reasociación, el tiempo de incubación, la concentración de sales, especialmente de sodio, son cruciales en la obtención de una adecuada reacción de hibridación.

En los trabajos citados anteriormente, si bien algunos de ellos dan detalles de las condiciones empleadas, como que el ADN es fraccionado hasta un tamaño de 400 nucleósidos, crucial para evitar la precipitación 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 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 puede 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.

Debido a lo anteriormente expuesto, cabe la posibilidad que los resultados obtenidos por hibridación de ADN, no den cuenta de las reales diferencias genotípicas existentes entre los aislados de las distintas especies analizadas, lo que hay que tener en cuenta al momento de analizar los resultados obtenidos por esta técnica.

Debido a que el proceso de lixiviación depende

principalmente de la oxidación llevada a cabo por los microorganismos, es que en este trabajo se estudió el crecimiento de las bacterias en el mineral biolixiviado, ya que el conocimiento del crecimiento de la bacteria sobre la superficie del mineral lixiviado, representa una etapa clave en el estudio de un sistema de lixiviación.

Este trabajo se dividió en dos partes. En primer lugar, como se suponía que *T. ferrooxidans* era la principal bacteria responsable de la lixiviación de sulfuros de cobre y el mejor conocimiento del crecimiento de la bacteria en el sistema de lixiviación permitiría definir mejor aquellos parámetros relevantes en el proceso, es que se estudió el crecimiento de *T. ferrooxidans* sobre la superficie de un sustrato. La hipótesis de trabajo propuesta es que la proliferación de *T. ferrooxidans* en superficie se ve influenciada por condiciones distintas a las que encuentra la bacteria al crecer en un cultivo en suspensión, determinando propiedades diferentes en la dinámica de la proliferación de la bacteria. Para ello el cultivo de la bacteria en mineral se estudió desde el punto de vista de los requerimientos de unión a la superficie a colonizar y del tipo de estructura de crecimiento que la bacteria es capaz de formar sobre la superficie colonizada. Para este estudio se utilizó azufre elemental como superficie y fuente de energía, por ser el sistema más adecuado para el diseño experimental utilizado.

Sin embargo, a medida que transcurría esta tesis, los

recientes trabajos sobre diversidad bacteriana, describiendo la prevalencia de bacterias no cultivables en diferentes sistemas, y observaciones realizadas en el laboratorio, nos llevaron a reconsiderar la aceptada prevalencia de *T. ferrooxidans* en biolixiviación y a reconocer la necesidad de un estudio moderno sobre la población bacteriana realmente prevalente en el sistema de biolixiviación en referencia. La hipótesis que se postula es que no necesariamente la bacteria prevalente en un sistema de biolixiviación es *T. ferrooxidans*, sino que podrían existir otras especies bacterianas, algunas conocidas y otras aún no identificadas, que podrían ser tanto o más numerosas en el sistema, dependiendo de las condiciones del medio lixivante. Por esta razón en este trabajo se estudió la diversidad poblacional bacteriana del sistema y como ésta se ve influenciada por cambios en la composición del medio lixivante.

La población bacteriana predominante en biolixiviación se determinó por análisis del ADN extraído directamente del sistema de biolixiviación. Con la finalidad de obtener una extracción eficiente del ADN de la población bacteriana presente en el sistema de lixivación, fue necesario desarrollar un protocolo de extracción adecuado a las características de nuestro sistema. Este protocolo debía cumplir al menos dos condiciones básicas: permitir la extracción del máximo de ADN presente, tanto de los microorganismos que crecen en suspensión en la solución

lixiviante como de aquellos que crecen unidos al mineral lixiviado, y obtener como producto de la extracción, un ADN representativo de las especies bacterianas presentes en el sistema. Esto último, como se verá más adelante, resulta esencial para definir la diversidad de la población bacteriana, presente en el sistema de lixiviación.

Posteriormente, se analizó la composición de la población bacteriana presente en la muestra original de mineral lixiviado que contenía sulfuros de cobre y de aquella seleccionada luego de crecerlas en condiciones de laboratorio. La composición de la población bacteriana se basó en la determinación del polimorfismo de tamaño de la región espaciadora entre los genes 16S y 23S de los ARN ribosomales del ADN extraído.

En los procariotes el *loci* genético de los ARNr contiene a los tres genes que codifican para las distintas moléculas de ARNr (5S, 16S y 23S) (29). 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, las que en parte se deberían a variaciones en el número y tipo de tARNs presentes en estas regiones. Las regiones espaciadoras presentan en sus extremos estructuras secundarias en forma de tallo, que son importantes en el procesamiento de los ARNr (55). Debido al rol funcional que cumplirían estas estructuras secundarias que harían imprescindible su presencia en la bacteria, lo que



se ha visto confirmado al detectarse en más de 300 cepas bacterianas estudiadas, e incluso también en algunos hongos (29), es que se ha postulado como un buen método, simple y directo, para la identificación de especies y géneros bacterianos (29).

Básicamente, este método consiste en amplificar por PCR la región espaciadora intergénica que se ubica entre los genes ribosomales 16S y 23S. Los productos obtenidos luego de su amplificación por PCR, 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, se compararon por electroforesis en gel con aquellos de las principales especies aisladas a partir de sistemas de biolixiviación, permitiendo la asociación presuntiva a especies bacterianas particulares.

Dos operones del ARN ribosomal (*rrnT1* y *rrnT2*) están presentes en el genoma de la cepa Torma de *T. ferrooxidans*. Ambos operones tienen una región espaciadora intergénica 16S-23S idéntica, que contiene secuencias tipo tARN-ile y tARN-ala, con un tamaño total de 530 pb. Un alto nivel de homología (97%) se ha observado entre los espaciadores de esta cepa y la encontrada en la cepa A4, aislada a partir de una mina chilena (50,59). Sin embargo, debido a que se ha reportado la existencia de polimorfismo de las regiones espaciadoras en cepas de una misma especie (29,32) y ya que las cepas de *T. ferrooxidans* presentan una alta

heterogeneidad genotípica (21,35), mayor que lo esperado en una especie normal, los productos obtenidos se compararon con las regiones espaciadoras de varias cepas de las principales especies encontradas en sistemas de biolixiviación.

La identificación presuntiva de las bacterias de acuerdo al tamaño de la región espaciadora fue posteriormente confirmada por secuenciamiento de parte del gen para el ARNr 16S. El clonamiento y secuenciamiento de los ARNr 16S fue realizado por el bioquímico Jaime Romero, en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile, con la asesoría de los Dres. Omar Orellana y Eugenia Jedlicki, a quienes se les agradece su valiosa contribución.

Finalmente se estudió la selección que ocurriría de la población bacteriana presente en el sistema de biolixiviación durante el cultivo en un medio que contiene Fe(II) como la única fuente de energía, para determinar la validez del cultivo para determinar la población bacteriana original de un sistema de biolixiviación.

## MATERIALES Y METODOS

**Cepas y aislados de referencia.** En esta tesis se ocuparon las siguientes cepas o aislados bacterianos: *T. ferrooxidans*, cepas ATCC 19859, Torma y los aislados CHI 002, Chi 085, Michilla y Teniente, obtenidos en diferentes regiones geográficas de Chile, originalmente donados 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). El aislado Lo Aguirre se obtuvo a partir de una solución de lixiviación de la planta de Lo Aguirre. Todos estos aislados han sido previamente clonados por plaqueo en un medio de agarosa. Las cepas DSM 2705, DSM 2391 y ATCC 49881 de *L. ferrooxidans* y ATCC 19377 de *T. thiooxidans* fueron facilitadas por el Dr. Carlos Jerez (Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile). Las otras cepas usadas en éste trabajo: *T. ferrooxidans*, cepas DSM 583, DSM 9464, DSM 9465, IFO 14245 e IFO 14262; *T. thiooxidans* DSM 504, DSM 622, DSM 612 y DSM 9463, fueron obtenidas directamente de las respectivas colecciones de cultivo.

**Cultivo de *T. ferrooxidans* en medios de cultivo.** Los cultivos en medio sintético, con Fe(II) como fuente de energía, se

hicieron por inoculación de 100 ml de MS9b [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,04 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,25 g/l] pH 1,6, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 3% con 1,0 x 10<sup>8</sup> bacterias de la cepa ATCC 19859 de *T. ferrooxidans*, 1 ml del efluente de la solución de lixiviación ó con 0,5 gramos de mineral lixiviado. La incubación se llevó a cabo a 28 °C en un agitador orbital (orbit Environ-shaker), cosechándose las bacterias luego de oxidar el Fe(II) presente en la solución. El crecimiento en azufre elemental se llevó a cabo por la inoculación de 1,0 x 10<sup>8</sup> bacterias en el mismo medio de cultivo, a pH 4,5, con la diferencia de que el Fe(II) se reemplazó por azufre sublimado al 0,5 %, que se esterilizó a 105 °C por 30 minutos por 2 días consecutivos.

Los cultivos en mineral en ausencia de Fe(II) se hicieron en matraces de 100 ml con mineral al 7% en MS9B pH 1,6. El mineral fue previamente esterilizado en autoclave por 30 minutos a 121 °C. El medio de cultivo se cambió cada semana. Para subcultivar, 1 gramo de mineral se transfirió cada 3 semanas. El crecimiento de las bacterias se siguió midiendo el ADN extraído de 1,0 gramo de mineral a los diferentes tiempos.

**Análisis bacteriano.** La enumeración de las bacterias totales presentes en suspensión, se llevó a cabo por microscopía de epifluorescencia luego de filtrar y teñir con naranja de acridina (25). El número de bacterias viables, medidas por Unidades Formadoras de Colonias, se determinó en un medio

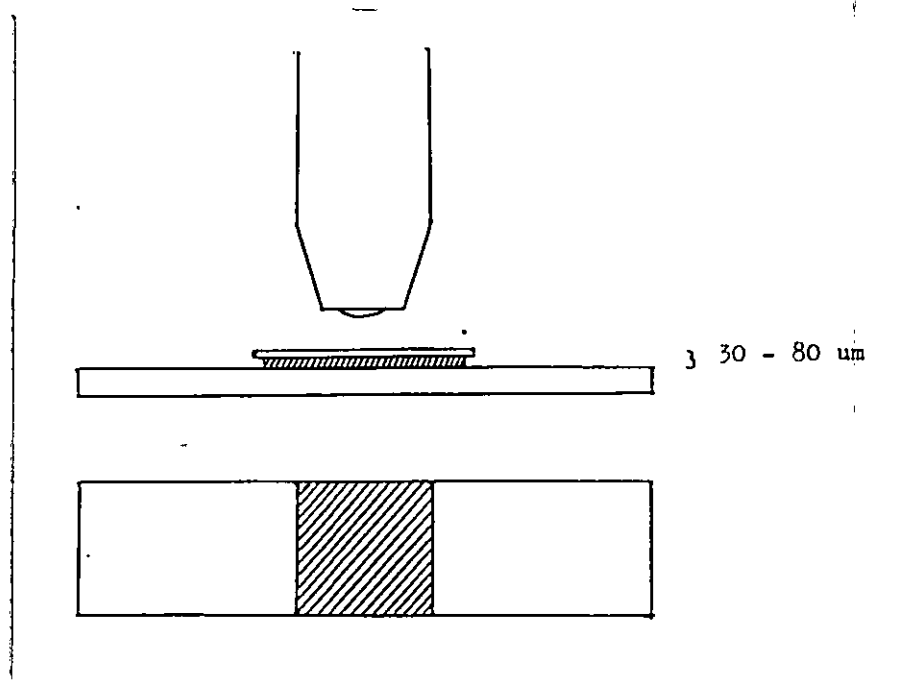
sólido de agarosa con Fe(II) como fuente de energía (22).

**Cinética de adsorción.** Láminas de azufre de 1,7 cm por lado, se ubicaron paralela o perpendicularmente a la fuerza de gravedad, según fuera el caso, en una suspensión bacteriana que contenía  $1,0 \times 10^8$  bacterias/ml en MS9b pH 1,6. Luego de incubar, sin agitar, a temperatura ambiente por distintos tiempos, las láminas de azufre se lavaron tres veces con MS9b pH 1,6 y las bacterias adsorbidas se contaron por microscopía de epifluorescencia, previa tinción con naranja de acridina.

**Sistema experimental para la determinación de la proliferación en superficie de *T. ferrooxidans*.** Para determinar la dinámica de crecimiento de *T. ferrooxidans* sobre el azufre se utilizaron dos sistemas experimentales. En uno de ellos, que llamaremos "sistema cubierto", las bacterias se hicieron crecer sobre los bordes de una delgada lámina de azufre, ubicada entre dos trozos de vidrio (figura 2).

El azufre se incubó a 30 °C en las sales del medio MS9b, con el azufre de la lámina como única fuente de energía. El crecimiento bacteriano se siguió observando los bordes colonizados del azufre por microscopía óptica. Para determinar el efecto de la fuerza de gravedad sobre el tipo de crecimiento desarrollado por las bacterias, los bordes de la superficie del azufre se colocaron ya sea paralelos o

perpendiculares a la fuerza de gravedad. Las observaciones fueron grabadas con una cámara de video. Se escogió este sistema porque asemeja la situación existente en el proceso de biolixiviación en pilas, donde el flujo líquido es mínimo. En el otro sistema, que llamaremos "sistema descubierto", se retiró uno de los vidrios, de forma tal que las bacterias pudieran crecer sobre la superficie superior del cuadrado de azufre. En este otro caso, el crecimiento bacteriano se determinó observando las bacterias presentes sobre el azufre por microscopía de epifluorescencia.



**Figura 2.** Diseño experimental para determinar la dinámica de proliferación de *T. ferrooxidans* sobre la superficie del azufre. Un portaobjetos se ubicó sobre una placa calefactora mantenida a una temperatura de 120-130 °C. Luego de que el vidrio del portaobjetos adquirió la temperatura de la placa, el azufre se colocó sobre su centro. Una vez que el azufre se fundió, sobre la gota de azufre fundido se colocó un cubreobjetos, de tal manera que por capilaridad se formó una

lámina delgada de azufre entre ambos vidrios. Posteriormente la temperatura de la placa calefactora se bajó gradualmente hasta llegar a temperatura ambiente y el azufre solidificado se dejó por 24 horas antes de ocupar. El espesor de la lámina de azufre depende de la cantidad de azufre agregado, por ello se eligió una cantidad suficiente de azufre como para obtener una lámina de no más de 30 a 80  $\mu\text{m}$  de espesor. La región achurada representa la lámina de azufre elemental.

**Biolixiviación en columnas.** La composición del mineral a lixiviar contenía un 1,36% de cobre, con un 33% como óxido, un 61% como calcocita y un 4,5% como covelita. El mineral se trituró hasta un tamaño de 1/4 de pulgada y se aglomeró según lo descrito en la literatura (45). Se cargaron 2.000 gramos de mineral aglomerado en columnas de vidrio, las cuales se lixiviaron con 600 ml de MS9b/día, suplementado con ión Fe(II) a distintas concentraciones. Antes de lixiviar, las columnas se inocularon con 100 ml de solución de lixiviación que contenía 1,0 g de Fe(II)/litro que provenía de columnas similares que contienen el mismo tipo de mineral. El cobre lixiviado presente en la solución que salía de la columna se determinó por espectrometría de absorción atómica. Por este procedimiento, más del 90% del cobre presente en el mineral como sulfuro de cobre fue recuperado.

**Toma de muestras.** Las muestras de mineral aglomerado y del efluente de la solución de lixiviación de las columnas, se obtuvieron cuando se alcanzó un 90% de recuperación de cobre. Las muestras se tomaron en esta etapa del proceso, ya que se encuentra una población bacteriana numerosa y con una alta actividad oxidativa. Las muestras obtenidas de un proceso

industrial de biolixiviación, correspondieron al efluente de la solución de lixiviación, que fluía por la parte inferior de pilas de mineral lixiviadas por 2-4 meses en la planta industrial de Lo Aguirre de la Sociedad Minera Pudahuel. Estas pilas fueron lixiviadas con la solución resultante del proceso de la planta, que incluye extracción por solvente (refino).

**Extracción de ADN.** El ADN se extrajo a partir de 10,0 gramos de mineral por lisis directa de las células adheridas con SDS al 1%, procedimiento que ha demostrado ser altamente eficiente en la lisis de distintas cepas del género *Thiobacilli* y *Leptospirilli* (cáp. 2). El procedimiento de extracción se repitió por cuatro veces, para minimizar la posible pérdida de microorganismos que eventualmente pudieran ser más resistentes a la lisis por SDS. Los cuatro sobrenadantes se mezclaron para su análisis posterior. El ADN bacteriano presente en los efluentes de las columnas se extrajo 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, como se describirá más adelante (cáp. 2) excepto que que ahora se centrifugó a 10.000 x g por 20 minutos. La lisis se llevó a cabo de la misma manera como se describió para las bacterias unidas al mineral, a excepción de que la extracción se llevó a cabo sólo una vez. La cantidad de ADN extraído se estimó visualmente comparando las bandas teñidas con



estándares apropiados luego de una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ADN de las bacterias en cultivo en matraz se extrajo por el mismo procedimiento, con la excepción de que la extracción se hizo a partir de 100 ml de cultivo.

**Amplificación por PCR.** Para amplificar la región espaciadora ubicada entre los genes de los ARNrs 16S y 23S del ADN de las bacterias, una fracción del ADN extraído y tratado enzimáticamente (cáp. 2) se usó para amplificación sin una purificación adicional luego de diluir al menos 100 veces en TE para PCR (Tris 0,01 M, EDTA 0,001 M, pH 7,5). El ADN a amplificar se denaturó por calentamiento a 100 °C por 5 minutos, seguido de un rápido enfriamiento a 0 °C, para minimizar la reasociación. 1,5 ng de este ADN denaturado se mezcló con 1 volumen de mezcla de reacción (Tris 25 mM, pH 8,3; KCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 6,5 mM; dATP, dCTP, dTTP y dGTP, 0,4 mM de cada uno; gelatina 0,04%; ; Taq polimerasa 1,5 unidades) que contenía 0,2 uM de los partidores G1 [GAAGTCGTAACAAGG] y L1 [CAAGGCATCCACCGT], correspondientes a secuencias altamente conservadas en las secuencias disponibles de ARNrs (29). Finalmente, se agregó 2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación de la solución. Las regiones espaciadoras se amplificaron inicialmente con las condiciones del programa X, el que consistía en: 2 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 ul 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; Na<sub>2</sub>EDTA 1mM) y posteriormente 5 ul de la solución se sometió a electroforesis en gel de acrilamida, con posterior tinción con nitrato de plata.

La identificación de las especies a las que correspondían los amplificadores 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. Ello se llevó a cabo usando el procedimiento de amplificación descrito por DeLong (30) con los partidores Eubac27F (30) y L1 (29).

**Electroforesis en gel.** Para la comparación de los tamaños aparentes de los productos obtenidos luego de la amplificación, éstos se sometieron a electroforesis en un gel de 17 cm de longitud con poliacrilamida al 7% en buffer Tris-Borato y el ADN se visualizó con nitrato de plata (16).

**Clonamiento y Secuenciamiento.** Para secuenciar los ARNrs 16S de las distintas especies a las que pertenecen los amplificadores predominantes obtenidos de la amplificación de

las regiones espaciadoras del ADN de las bacterias presentes en muestras de las columnas, lo que imposibilitaba su secuenciamiento directo, fue necesario clonar los productos obtenidos luego de amplificar antes de poder secuenciarlos. Para ello, el ADN amplificado conteniendo el ARNr 16S y la region espaciadora se incubó directamente con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa para convertir los potenciales extremos pegajosos a extremos de bordes romos (51). La enzima posteriormente se inactivó a 65 °C por 10 minutos y el ADN se fosforiló con la enzima polinucleótido kinasa T4. El ADN tratado se extrajo con fenol/cloroformo, se purificó por GLASSMax (Gibco) y se ligó a pUC19 (Gibco) previamente digerido con SmaI (51). Este ADN se usó para transformar E. coli DH5-a, como se ha descrito anteriormente (41).

Para confirmar que los insertos que contenían los clones aislados correspondían a los amplificados predominantes, los plasmidios de los clones se digirieron con EcoRI y luego de someterlos a elctroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE se determinó que el tamaño de los insertos correspondieran a los tamaños de los amplificados esperados.

La región espaciadora en cada plasmidio recombinante se identificó por amplificación por PCR con los partidores G1 y L1, como se describió anteriormente. Los plasmidios de doble hebra, se denaturaron y se secuenciaron por el método de terminación de cadena con Secuenasa 2.0 (United States Biochemicals) de acuerdo a las recomendaciones del

fabricante. Sólo la región que corresponde aproximadamente a los nucleótidos 400 al 700 del ARNr 16S de *E. coli* fue secuenciada utilizando el partidador 357f (30).

En aquellos casos en que se pudo obtener una población bacteriana única, como fue el caso de los experimentos de selección en medios de cultivo sintéticos, el ADN amplificado se purificó por Glassmax (GibcoBRL) y se secuenció por el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos, con el sistema de secuenciamiento en ciclo de ADN de doble hebra (GibcoBRL), siguiendo las recomendaciones del proveedor. Usando el partidador 357f, se logró secuenciar la región correspondiente a los nucleótidos 350 a 650 del ARNr 16S.

**Análisis de secuencia.** Para la identificación preliminar de género, las secuencias obtenidas se compararon inicialmente con las disponibles en el banco de datos de la EMBL. Posteriormente, las secuencias se alinearon a las secuencias de ARNr 16S de cepas de *Thiobacilli* y *Leptospirilli*, previamente determinadas.

El secuenciamiento se repitió al menos 3 veces por secuencia y aquellas posiciones que consistentemente dieron una asignación ambigua del nucleótido correspondiente o que presentaron anomalías como compresión de bandas fueron excluidas del análisis. El secuenciamiento se repitió varias veces para detectar posibles cambios de nucleótidos introducidos por las polimerasas durante la amplificación por

PCR, o durante el secuenciamiento propiamente tal.

## RESULTADOS

### 1. CARACTERIZACION DEL CRECIMIENTO DE *T. ferrooxidans* SOBRE LA SUPERFICIE DE AZUFRE ELEMENTAL.

En este capítulo de la tesis se estudió la colonización de la superficie del azufre elemental por *T. ferrooxidans*, caracterizando la adsorción y la dinámica de la proliferación de la bacteria sobre la superficie y determinando la influencia de parámetros tales como: sedimentación por gravedad y topología de la superficie colonizada. Los resultados obtenidos en este sistema, utilizado como modelo en el estudio de la colonización de la bacteria sobre la superficie de un sustrato que constituye su fuente de energía, permitirán postular la probable distribución de las bacterias en el mineral lixiviado.

#### 1.1. COLONIZACION DE LA SUPERFICIE DE AZUFRE ELEMENTAL POR *T. ferrooxidans*.

De acuerdo al modelo de adsorción de Zobell (65), la velocidad de la unión irreversible de la bacteria al sustrato, es directamente proporcional al número de bacterias que chocan con la superficie. En un medio no sometido a agitación, como el de una columna de lixiviación y asumiendo que *T. ferrooxidans* no es mótil, situación que nunca fue observada en el laboratorio, los choques de la bacteria

contra una superficie van a ocurrir principalmente por sedimentación y por difusión (6). Al calcular la distribución al equilibrio de una bacteria no mótil suspendida en una solución, considerando tanto la influencia de la difusión como de la sedimentación, pareciera que ésta depende principalmente de la sedimentación (figura 1).

Por otra parte, cuando la bacteria sedimenta sobre la parte superior de una superficie, permanece unida reversiblemente por un tiempo más largo, lo que también aumenta las probabilidades de llegar a unirse irreversiblemente.

Para determinar el efecto de la sedimentación sobre la unión irreversible de la bacteria sobre el azufre, se midió la velocidad de adsorción de *T. ferrooxidans* sobre superficies de azufre ubicadas paralelas y perpendiculares a la fuerza de gravedad. Para ello se determinó por microscopía de epifluorescencia el número de bacterias adsorbidas sobre el azufre a distintos tiempos de incubación tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Se consideraron bacterias unidas irreversiblemente a la superficie del azufre a todas aquellas bacterias que luego de lavar tres veces el azufre previo a la tinción con naranja de acridina, permanecieron unidas a él. La velocidad de adsorción de las bacterias a la superficie ubicada perpendicular a la fuerza de gravedad fue de  $827 \pm 203$  bacterias/cm<sup>2</sup>/minuto, en cambio, cuando la superficie del

azufre se ubicó paralela a la fuerza de gravedad, se adsorbieron  $242 \pm 51$  bacterias/cm<sup>2</sup>/minuto, es decir, la sedimentación aumenta en 3,4 veces la velocidad de unión irreversible de las bacterias al azufre.

**Tipo de unión de las bacterias al azufre.** Para determinar la naturaleza de la unión irreversible a tiempos tempranos de *T. ferrooxidans* al azufre, las bacterias adsorbidas por 1 hora sobre azufre se incubaron por el mismo tiempo con distintas concentraciones de SDS, un detergente iónico que es capaz de romper uniones no covalentes. Tal como se observa en la Tabla 1, la unión de las bacterias al azufre es sensible a la acción del detergente, siendo dependiente de la concentración del detergente. Esto indica que al menos durante tiempos tempranos de la colonización (1 hora), no existiría una unión covalente entre la bacteria y el azufre.

**Tabla 1.** Bacterias que permanecen unidas al azufre al tratar por 1 hora con distintas concentraciones de SDS.

SDS (% p/v)	bacterias/mm <sup>2</sup>
0	2693 $\pm$ 375
0,01	2381 $\pm$ 268
0,1	866 $\pm$ 43
1	535 $\pm$ 46
5	25 $\pm$ 16

Para determinar la naturaleza del tipo de unión no covalente que la bacteria sería capaz de formar con la superficie del azufre, bacterias adsorbidas por 1 hora se incubaron a temperatura ambiente con distintas



concentraciones de Tween 20, un detergente no-iónico. El uso de detergentes no-iónicos ha demostrado ser muy útil en la determinación de interacciones hidrofóbicas de las bacterias con los sustratos a los cuales se adhieren (44). Tal como se observa en la Tabla 2, al tratar con Tween 20 hay desorción de las bacterias adsorbidas, que también ocurre de una forma dosis-dependiente, lo que sugiere que la unión bacteria-azufre podría ser de naturaleza hidrofóbica.

**Tabla 2.** Desorción de las bacterias unidas al azufre por efecto del detergente Tween 20.

Tween 20 (%p/v)	bacterias/mm <sup>2</sup>
0	3527 ± 363
0,001	3832 ± 343
0,01	980 ± 124
0,1	369 ± 98

Estudios de Devasia y colaboradores, han determinado que la hidrofobicidad de la superficie celular de *T. ferrooxidans* cambia según si la bacteria se cultiva con una fuente de energía soluble o insoluble (12). Así por ejemplo, la hidrofobicidad es menor cuando la bacteria se cultiva en un medio con Fe(II) que cuando se cultiva en presencia de azufre, pirita o calcopirita como fuente de energía. Por lo tanto, para determinar el efecto de las interacciones hidrofóbicas en la adsorción de *T. ferrooxidans* sobre la superficie de azufre, se procedió a adsorber bacterias crecidas en Fe(II) o azufre. Tal como se puede observar en la Tabla 3, a 3 horas de adsorción las bacterias que fueron cultivadas en el medio de cultivo con azufre, se adsorbieron

9,6 veces más que las bacterias que habían sido cultivadas con Fe(II) como fuente de energía.

**Tabla 3.** Cinética de adsorción sobre azufre de *T. ferrooxidans* crecidos en Fe(II) ó azufre.

Tiempo de adsorción (minutos)	azufre (bacterias/mm <sup>2</sup> )	Fe(II)
5	726 ± 243	446 ± 112
15	2215 ± 394	1923 ± 315
60	12554 ± 1303	3641 ± 436
180	28992 ± 2414	3005 ± 412

Para determinar si la unión inicial de la bacteria al azufre es un proceso pasivo o activo, es decir si requiere energía o no, se determinó el efecto del metabolismo bacteriano sobre la adsorción. Para ello, las bacterias crecidas en azufre se incubaron a temperatura ambiente en presencia de Hg(II), a concentraciones de 5 y 50 ppm en MS9b pH 1,6. Luego de incubar por 5,5 horas se determinó una gran disminución tanto de la viabilidad celular, medida por cultivo en medio sólido en agarosa (menos de  $5,0 \times 10^{-4}$  % de viabilidad), como en la actividad respiratoria oxidativa de las bacterias (9 y 5 % de actividad con respecto al control sin Hg(II), respectivamente). Sin embargo, la adsorción al azufre de las bacterias inactivadas por Hg(II) no se vió alterada (Tabla 4).

**Tabla 4.** Adsorción sobre azufre elemental por 1 hora de las bacterias crecidas en azufre, tratadas por 5,5 horas con 0, 5 y 50 ppm de Hg(II).

Hg(II) (ppm)	bacterias/mm <sup>2</sup>
0	12962 ± 1604
5	14044 ± 1907
50	14286 ± 1815

Todo ésto indicaría que la adsorción irreversible inicial de *T. ferrooxidans* al azufre no sería un proceso activo, es decir no necesitaría de energía de la bacteria durante la interacción de ésta con la superficie a colonizar, sino que lo que determinaría una mayor o menor adsorción de *T. ferrooxidans* sobre la superficie del azufre estaría dado por factores estructurales ya presentes en la superficie externa de la pared celular bacteriana antes de entrar en contacto con la superficie a colonizar, probablemente por moléculas proteicas, lipopolisacáridos u otras (12) y colateralmente de todos aquellos factores ambientales que van a alterar las características físicas y químicas de la pared externa celular, como por ejemplo concentración de sales, pH, etc (41).

#### 1.2. CRECIMIENTO DE *T. ferrooxidans* SOBRE LA SUPERFICIE DE AZUFRE ELEMENTAL.

Estas observaciones se encuentran registradas en video que respaldan las afirmaciones aquí señaladas. Las fotografías aquí mostradas sólo dan ejemplos de las

estructuras mencionadas.

Al seguir por 6 meses la colonización bacteriana sobre los bordes laterales de las láminas de azufre, paralelas a la fuerza de gravedad, utilizando el sistema cubierto, se pudo determinar que las bacterias fueron capaces de proliferar sobre la superficie hasta formar una monocapa de células (figura 3), sin llegar a la formación de una estructura tipo biofilm, definida por una estructura polisacárida, con las bacterias inmersas en ella.

Al observar la monocapa bacteriana sobre el azufre, se pudo observar que las bacterias se encuentran adheridas al azufre en forma apical, es decir, con uno de los extremos de la bacteria haciendo contacto con la superficie, mientras que el otro extremo se encontraba libre (figura 3A y 3B). En cambio, las bacterias que crecieron sobre superficies perpendiculares a la fuerza de gravedad, enfrentándola, formaron multicapas de bacterias, pero sin constituir un biofilm. Más bien se trataría de una acumulación de bacterias libres ya que eran fácilmente desprendidas por una agitación suave (figura 4).

La figura 5 muestra una representación esquemática de la dinámica de la colonización bacteriana sobre la superficie del azufre.

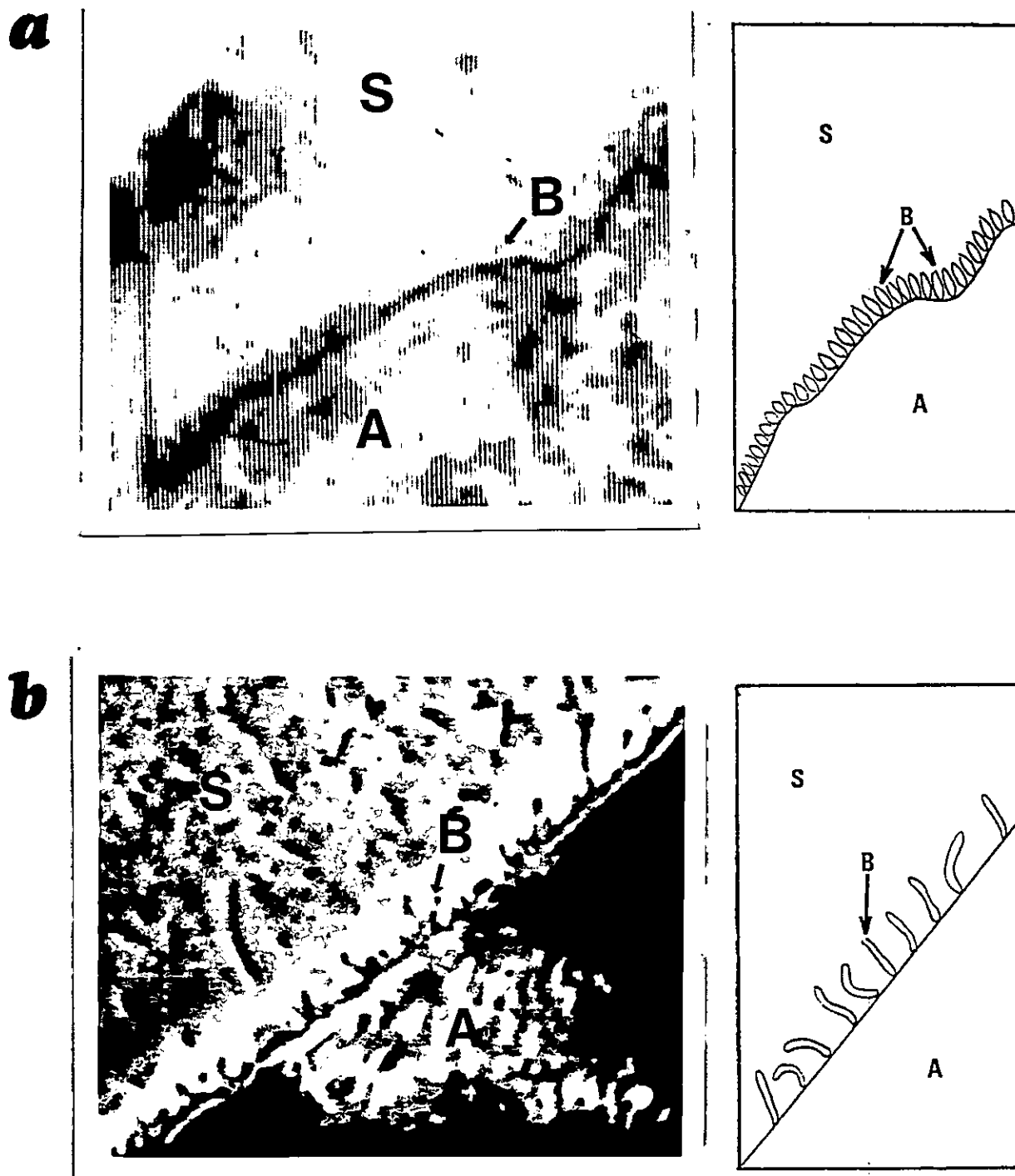


Figura 3. Fotografías a partir de la cinta de video que muestran la colonización de *T. ferrooxidans* sobre la superficie del azufre, ubicada paralela a la fuerza de gravedad. 3a: Aumento 400x; 3b: Aumento 1000x. A: Azufre, B: Bacterias, S: Solución salina.

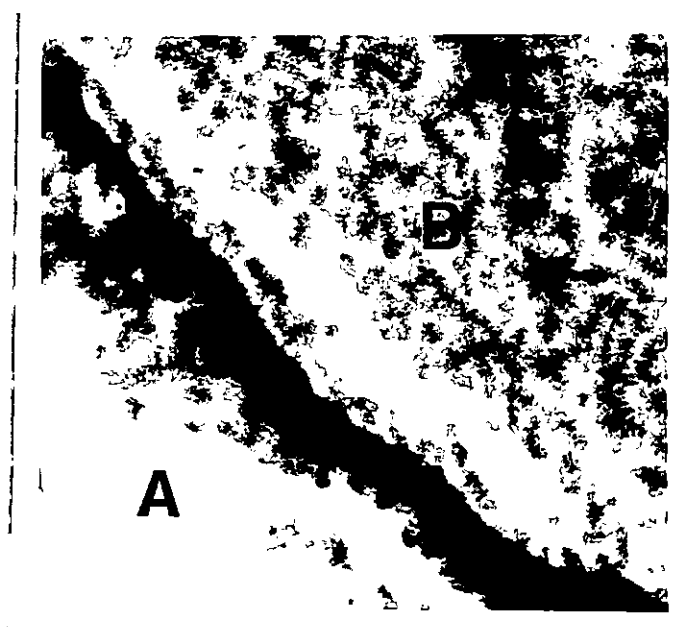


Figura 4. Fotografía a partir de la cinta de video que muestra la acumulación de bacterias sobre la superficie del azufre, ubicada perpendicular a la fuerza de gravedad. Aumento 400x. A: Azufre, B: Bacterias acumuladas.

Esquema de la dinámica de proliferación de *T. ferrooxidans* sobre la superficie del azufre

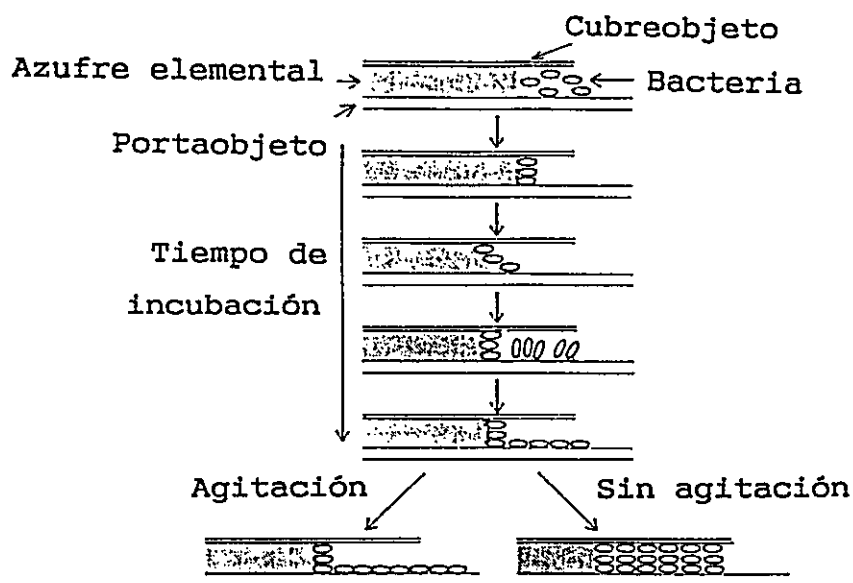


Figura 5: Esquema de la distribución bacteriana en la superficie lateral del azufre elemental, observado por microscopía óptica a diferentes tiempos de incubación.

El efecto de la fuerza de gravedad sobre la proliferación bacteriana sobre la superficie de azufre elemental también se determinó por epifluorescencia luego de teñir con naranja de acridina. Las bacterias se adsorbieron sólo sobre la superficie superior de láminas de azufre y la mitad de las superficies colonizadas fueron ubicadas hacia arriba, enfrentando la sedimentación y la otra mitad fueron ubicadas hacia abajo. Para observar el progreso de la colonización de la superficie del azufre por las bacterias inicialmente adsorbidas a él y no por la unión de bacterias de la progenie liberadas al medio de cultivo, el medio se cambió cada 12 horas.

Independientemente de la posición de la superficie colonizada, las bacterias fueron capaces de colonizar la superficie hasta saturación. Sin embargo, el progreso de la colonización de la superficie por las bacterias fue diferente, ya que con la superficie hacia arriba la colonización fue más rápida (casi el doble) y más uniforme que con la superficie colonizada hacia abajo en que la superficie se colonizó por la expansión de colonias bacterianas aisladas (figura 6).

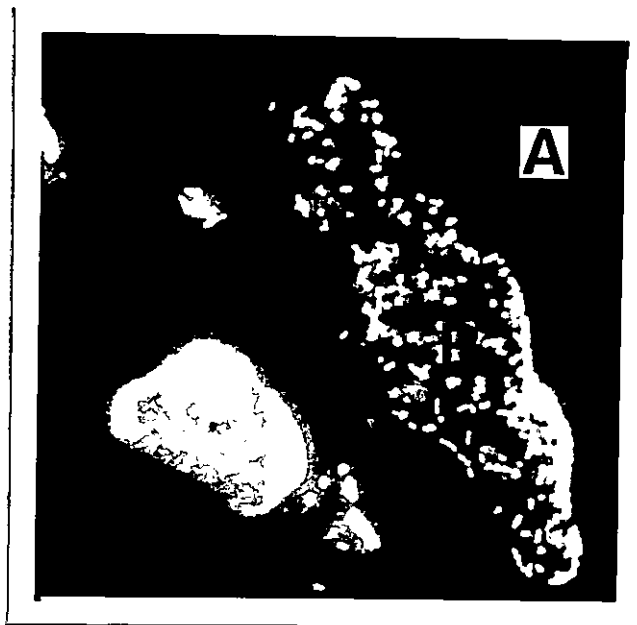
Esto indicaría que las bacterias presentan algún tipo de unión al azufre y que la progenie se uniría a la superficie antes de separarse de la bacteria que le dió origen o en un tiempo relativamente corto luego de desprenderse, ya que si no fuera así, las bacterias habrían sido alejadas de la

superficie por sedimentación y eliminadas por el cambio de medio sin llegar a saturar la superficie.

Extrapolando los resultados obtenidos en azufre a lo que ocurriría en la colonización del mineral a lixiviar, éstos sugieren que *T. ferrooxidans* sería capaz de colonizar toda la superficie del mineral expuesta a la solución lixiviante, aunque la rapidez de la adsorción de la bacteria al mineral sería diferente entre aquellas superficies del mineral que enfrentan la fuerza de gravedad con aquellas paralelas a ella, ésto debido al aumento del número de bacterias que llegan a la superficie y del tiempo mayor que permanecen sobre ella lo que favorecería la adsorción de la bacteria al mineral.

En lo que si se esperarían diferencias importantes sería en la cantidad de bacterias presentes en las distintas zonas del mineral, ya que en aquellas zonas que enfrenten a la fuerza de gravedad y que se encuentren protegidas del flujo de solución lixiviante (grietas), podría haber acumulación de bacterias, mientras que en zonas que no cumplan con estas características sólo debiera encontrarse una monocapa de bacterias. Esta diferente distribución podría afectar el grado de ataque directo de la bacteria al mineral, aunque esto necesita de estudios adicionales. La figura 7 muestra una representación esquemática de la hipotética distribución de la colonización bacteriana del mineral lixiviado.



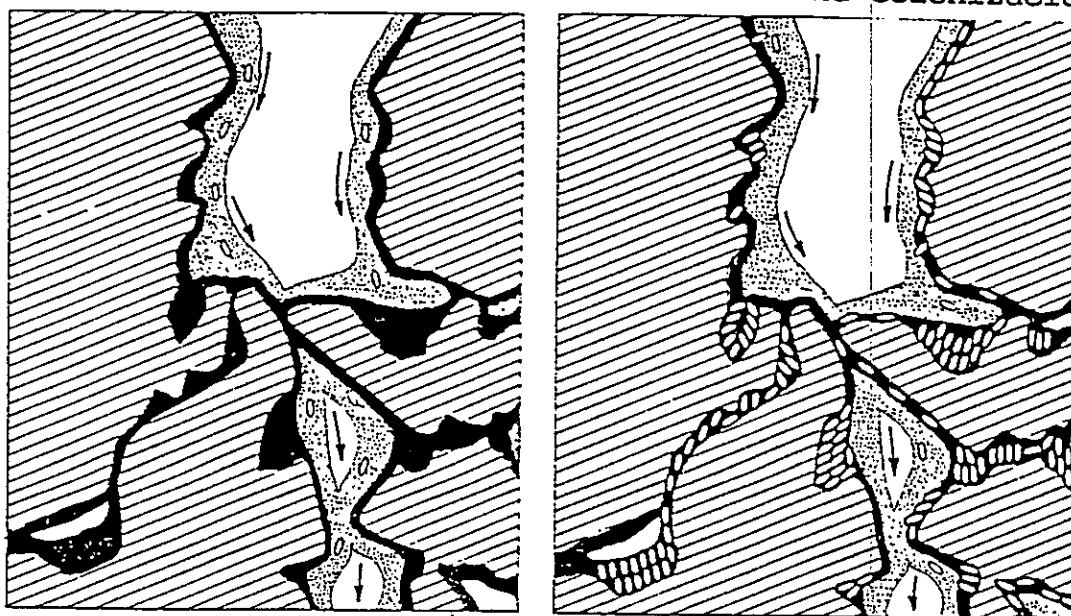


**Figura 6.** Fotografía que muestra colonias aisladas de *T. ferrooxidans* creciendo sobre la superficie del azufre elemental ubicada hacia abajo. Las bacterias fueron teñidas con naranja de acridina y observadas por microscopía de epifluorescencia. Aumento: 400x.

## SECCION TRANSVERSAL DE UNA PILA DE MINERAL

Previo a la colonización

Posterior a la colonización



▨ Mineral    □ Aire    ■ Solución estática  
 ▩ Solución percolante    ○ Bacteria

**Figura 7.** Esquema de la distribución bacteriana esperada sobre la superficie de minerales, antes y después de ser lixiviados. El esquema está basado en las observaciones de la colonización bacteriana sobre superficies de azufre elemental con diferentes orientaciones con respecto a la fuerza de gravedad.

## 2. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO BACTERIANO EN MINERAL.

Diversos ensayos iniciales demostraron que la cantidad de ADN obtenida al intentar soltar las bacterias adheridas al mineral era muy inferior a aquella obtenida cuando las bacterias se lisaban en el mismo mineral y el ADN liberado se extraía posteriormente. En función de estos resultados se presentan aquí sólo aquellos correspondientes a la extracción de ADN por lisis directa en el mineral.

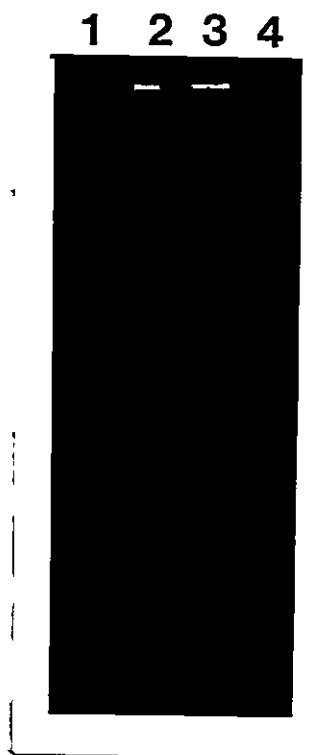
Para la extracción del ADN bacteriano, se probaron dos métodos para lisar las bacterias: por sonicación y por alta temperatura en presencia de SDS.

### 2.1. Extracción del ADN bacteriano por sonicación.

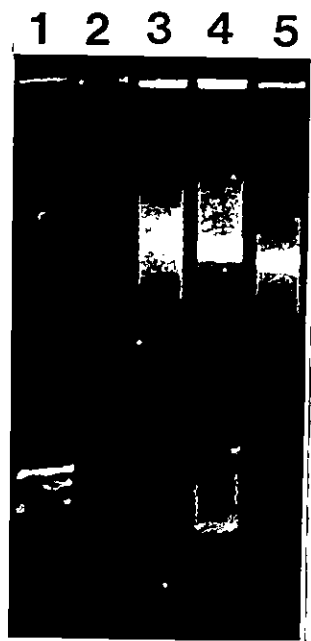
Uno de los métodos de lisis probado fue la sonicación. Aunque la extracción de ADN después de lisis por sonicación funciona eficientemente para bacterias, los rendimientos de ADN fueron mínimos cuando la sonicación se efectuó en presencia de mineral (figura 8).

Para determinar si el mineral impedía la lisis de las bacterias o si bien luego de la lisis, eliminaba el ADN de la solución por adsorción, 100 ng de ADN de *T. ferrooxidans*, obtenido de las bacterias lisadas por sonicación, se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas en presencia de mineral. Tal como se observa en las líneas 4 y 5 de la figura 9, el mineral no alteró la cantidad de ADN bacteriano en solución, lo que sugiere que las partículas de mineral

impiden la acción eficiente de las ondas ultrasónicas. Por lo tanto esta técnica se descartó para extraer el ADN de las bacterias que crecen en el mineral.



**Figura 8.** Efecto del mineral sobre la lisis por sonicación de *T. ferrooxidans*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN bacteriano, extraído a partir de  $2,0 \times 10^7$  bacterias, ya sea en ausencia (línea 3) o presencia de mineral (línea 4). Línea 1: 0,4 ug de ADN de pBR322 digerido con Ava II y Eco RI; línea 2: ADN extraído a partir de TE en presencia de mineral.



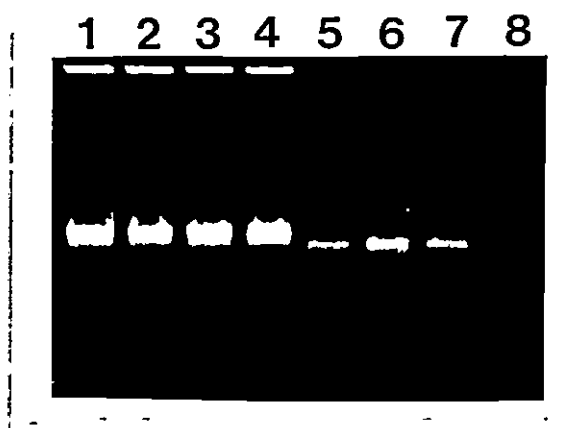
**Figura 9.** Efecto del mineral sobre el ADN bacteriano en solución. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN bacteriano incubado en ausencia (líneas 3 y 4) ó presencia de mineral (líneas 2 y 5), por 5 minutos a 100 °C (líneas 2 y 3) ó por 2 horas a 25 °C (línea 4 y 5). Línea 1: 0,4 ug de ADN de pBR322 digerido con *Ava*II y *Eco*RI.

## 2.2. Extracción del ADN bacteriano por lisis a alta temperatura en presencia de SDS.

La eficacia del SDS para lisar bacterias del género *Thiobacilli*, *Leptospirilli* y otros ha sido previamente demostrada (35). Para aplicar ésta técnica de extracción de ADN a nuestro sistema de lixiviación, se probó en primer lugar con bacterias en suspensión, tanto en presencia como en ausencia de mineral. Luego de lograr las condiciones bajo las cuales se obtenía una extracción eficiente del ADN, se optimizó para la extracción del ADN de las bacterias que crecen en el mineral.

### 2.2.1. Extracción del ADN a partir de bacterias en suspensión.

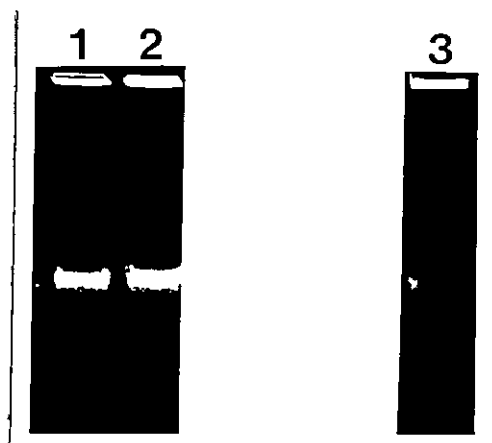
Una suspensión de  $3,0 \times 10^7$  bacterias en TE pH 8,5, se lisó en presencia de SDS al 1%, con baja o alta fuerza iónica (sin/con NaCl 0,15 M), por 10 minutos a 50 °C. Luego de someter una alícuota de los extractos de ADN, a una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE, se observó una recuperación de ADN similar en ambas condiciones de extracción (líneas 1 y 2, figura 10).



**Figura 10.** Efecto de la temperatura, fuerza iónica y presencia del mineral, sobre la extracción de ADN a partir de una suspensión de *T. ferrooxidans*. Electroforesis en agarosa al 1% en TBE teñido con bromuro de etidio del ADN bacteriano, extraído por lisis en presencia de SDS al 1%, a partir de  $3,0 \times 10^7$  bacterias, en ausencia (líneas 1, 2, 3, 4) o presencia de 0,4 g de mineral (líneas 5, 6, 7, 8), ya sea con baja (líneas 1, 3, 5, 7) o alta fuerza iónica (líneas 2, 4, 6, 8) e incubadas por 10 minutos a 50 °C (líneas 1, 2, 5 y 6) ó por 10 minutos a 70 °C (líneas 3, 4, 7 y 8).

Para optimizar la recuperación de ADN, se probaron

distintos tiempos de incubación (5 y 10 minutos a 50 °C, con SDS al 1%; líneas 1 y 2, figura 11) y distintas concentraciones de SDS (1% y 10% a 50 °C por 10 minutos; líneas 2 y 3, figura 11). La mejor recuperación de ADN se observó al incubar a 50 °C por 10 minutos, con una concentración de SDS al 1%. Cuando la lisis se llevó a cabo a temperaturas superiores, se pudo ver que a 70 °C, tanto con baja como con alta fuerza iónica, hay una recuperación similar del ADN de las bacterias en suspensión (líneas 3 y 4, figura 10). A 100 °C no se pudo medir la eficiencia por este método debido a que el ADN es denaturado (línea 3, figura 9).



**Figura 11.** Efecto de la concentración de SDS y tiempo de lisis, sobre la extracción del ADN bacteriano a partir de una suspensión de  $3,0 \times 10^7$  de *T. ferrooxidans*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del ADN extraído. Línea 1: SDS al 1%. 5 minutos a 50 °C; línea 2: SDS al 1%. 10 minutos a 50 °C; línea 3: SDS al 10%. 10 minutos a 50 °C.

Cuando se probaron estas mismas condiciones de lisis a un número igual de bacterias en suspensión, pero ahora en presencia de mineral, se observó recuperación de ADN bacteriano, tanto a 50 °C como a 70 °C (líneas 5, 6, 7 y 8, figura 10), aunque en menor cantidad que en ausencia del mineral.

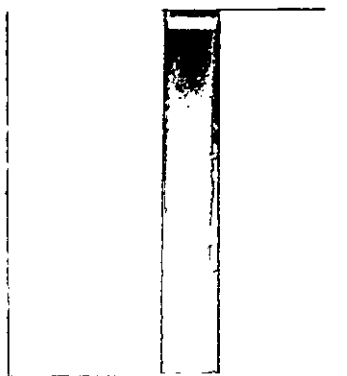
### **2.2.2. Extracción del ADN de las bacterias que crecen en el mineral.**

La presencia en el mineral lixiviado de iones metálicos que precipitan a pH superiores a 2.0, disminuyen la eficiencia de recuperación de ADN, probablemente por la formación de una capa que impediría la lisis de las bacterias unidas al mineral. Para evitar lo anterior, el mineral se lavó 2 veces con agua destilada estéril pH 1,9, agitando suavemente por 2 minutos. Luego de lavar, el mineral se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Para lisar las bacterias en un pH adecuado, que evitara la precipitación del ADN, el mineral se lavó posteriormente con tampón TE pH 8,5, agitando suavemente por 2 minutos, con posterior centrifugación a 1.000 x g por 10 minutos. Posteriormente el mineral sedimentado se volvió a lavar con 10 ml de TE pH 8,5, pero ahora se agitó fuertemente en vórtex por 15 minutos, para disgregar el mineral y que las bacterias quedaran más expuestas a la acción del SDS. Luego de centrifugar a 10.000 x g por 15 minutos, el mineral y las



bacterias sedimentadas se resuspendieron en SDS al 1% en TE pH 8,5 con NaCl 0,15 M y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Luego, se centrifugó a 1.000 x g por 10 minutos para eliminar el mineral y una alícuota del sobrenadante se sometió a una electroforesis en agarosa al 1% en TBE. Tal como se observa en la figura 12, bajo éstas condiciones de lisis se logró la extracción del ADN de las bacterias presentes en el mineral.

La lisis de las bacterias se realizó en medio TE pH 8,5, con NaCl 0,15 M, a una temperatura de 70 °C, ya que éstas son las condiciones en las cuales se obtuvo una mayor recuperación de ADN. Temperaturas mayores no condujeron a extracción de ADN, ya que el ADN denaturado probablemente es eliminado por degradación o adsorción a las partículas de mineral. Al probar tiempos de lisis mayores de 10 minutos, si bien aumentó la eficiencia de lisis de las bacterias, determinado por recuento directo de las bacterias remanentes, bajó la eficiencia de recuperación del ADN, así por ejemplo, con una hora de incubación, la recuperación de ADN es nula. Se estableció que el tiempo óptimo era de 10 minutos.



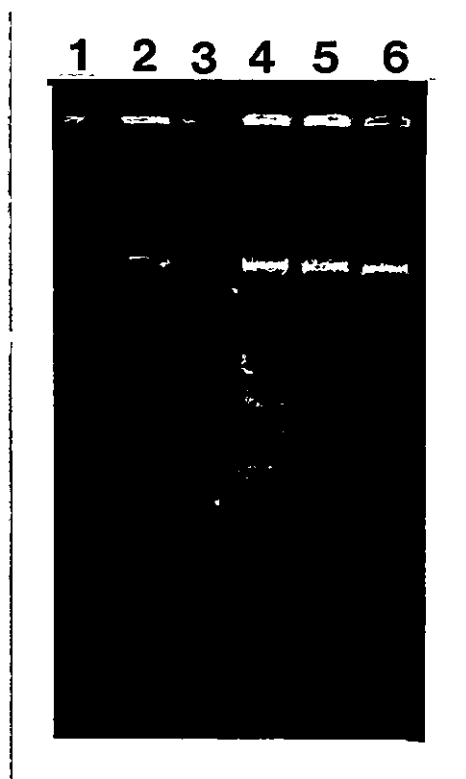
**Figura 12.** ADN bacteriano de la extracción de 1 gramo de mineral. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

La extracción del ADN de las bacterias que están en suspensión, se hizo por una adaptación del protocolo descrito para mineral aglomerado, eliminándose la etapa de lavados. El efluente de la solución de lixiviación se centrifugó a 10.000 x g por 15 minutos. Luego el precipitado obtenido se resuspendió en 5 ml de TE pH 8,5 con SDS al 1%, NaCl 0,15 M y las bacterias se lisaron por calentamiento a 70 °C por 10 minutos.

### **2.3. Determinación de la distribución bacteriana en el mineral lixiviado.**

Al estudiar la distribución bacteriana en el sistema de lixiviación por la determinación del ADN asociado al mineral, en ninguno de los sobrenadantes de los lavados, tanto con agua ácida, como con TE, llevados a cabo con agitación suave, se pudo observar la presencia de ADN bacteriano, por lo tanto se puede decir que el porcentaje de bacterias desprendidas

fue menos del 1% (no mostrado). Esto indica que las bacterias en el mineral se encuentran firmemente unidas a él y que ni los lavados con TE pH 8,5 desprenden una cantidad importante de bacterias. Por otra parte, en el sobrenadante del último lavado del mineral por agitación en vórtex se observó la presencia de ADN bacteriano (líneas 1, 2, 3, 4, 5 y 6, figura 13).



**Figura 13.** Extracción del ADN de las bacterias presentes en el sobrenadante, luego de agitar en vórtex durante el lavado del mineral aglomerado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio de los ADN de las bacterias presentes en los sobrenadantes obtenidos luego de lavar con agua ácida (líneas 1, 2, 4 y 5) y con TE pH 8,5 (líneas 3 y 6). Líneas 1, 2 y 3: centrifugación a 1.000 x g. Líneas 4, 5 y 6: centrifugación a 500 x g.

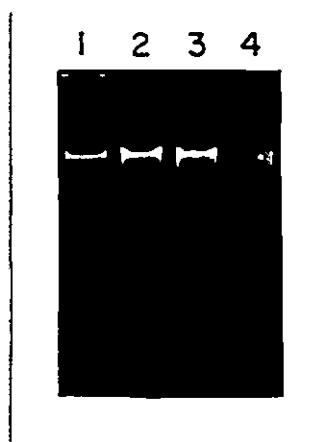
Probablemente la agitación en vórtex provoca un efecto mecánico sobre el mineral, generando partículas de pequeño

tamaño con bacterias o desprendimiento de acúmulos de bacterias, las cuales serían incapaces de sedimentar en su totalidad tanto a 500 x g (líneas 4, 5 y 6, figura 13) como a 1.000 x g (líneas 1, 2 y 3, figura 13). Se piensa que se trataría de partículas con bacterias y no de bacterias libres, ya que la mayoría de las bacterias que no sedimentan a 500 x g, lo hacen a 1.000 x g, situación que da cuenta de partículas con una velocidad de sedimentación mayor que el que poseen las bacterias libres. Por observación directa del sobrenadante por microscopía de contraste de fase, se observa gran cantidad de mineral particulado y bacterias aglomeradas, por lo que la primera posibilidad pareciera ser la más factible.

Es por ello, que luego de la agitación en vortex, se centrifugó a 10.000 x g por 15 minutos.

Para tener una estimación correcta de las bacterias presentes en el mineral aglomerado, fue necesario realizar una extracción exhaustiva del ADN asociado al mineral. Para ello, la extracción del ADN de las bacterias asociadas al mineral, descrita anteriormente, se repitió varias veces, utilizando el mineral obtenido de la extracción anterior como sustrato para la segunda extracción y así sucesivamente hasta no extraer más ADN. Tal como se ve en la figura 14, en la primera extracción de ADN sólo se recuperó alrededor del 20 % del ADN presente en el mineral, recuperándose ADN hasta la cuarta extracción, por lo que la determinación de las

bacterias asociadas al mineral lixiviado se realizó midiendo el ADN presente en la suma de las cuatro extracciones. El hecho de que en la segunda y tercera extracción se recupere más ADN que luego de la primera extracción, puede deberse a que el primer tratamiento con SDS no lisó a todas las bacterias con las cuales interactuó, pero las dejó más susceptibles a las extracciones posteriores; o quizás porque no todas las bacterias presentes en el mineral están expuestas a la acción del detergente y las sucesivas extracciones van lisando a las bacterias que van quedando progresivamente expuestas.



**Figura 14.** Extracciones sucesivas del ADN presente en el mineral aglomerado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, del ADN obtenido a partir de cuatro extracciones secuenciales (1, 2, 3 y 4), por lisis con SDS al 1% de 0,2 g de mineral aglomerado.

Para calcular la cantidad de ADN genómico bacteriano

obtenido luego de las cuatro extracciones, se compararon visualmente las bandas obtenidas en los geles de agarosa luego de ser teñidos con bromuro de etidio con la intensidad de las bandas obtenidas a partir de cantidades conocidas de un ADN comercial. De acuerdo a esto, en la muestra utilizada fue posible extraer un total de 730 ng de ADN/gramo de mineral y suponiendo una cantidad de  $7,3 \times 10^{-6}$  ng de ADN/bacteria (63), se estimó una cantidad de  $1,0 \times 10^8$  bacterias/gramo de mineral. Cabe hacer notar que no todo el ADN genómico bacteriano presente en la muestra cargada en el gel va a ingresar a el, ya que el gran tamaño y voluminosa conformación espacial de esta macromolécula, va a representar un gran obstáculo en su entrada al gel de agarosa. Por ello, la cantidad de ADN calculado por esta técnica representa una cantidad menor a la efectivamente presente en las muestras obtenidas luego de las extracciones, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente en el Laboratorio de Microbiología de SMP, en que por medición de la actividad respiratoria oxidativa de las bacterias presentes en mineral aglomerado se ha estimado una cantidad de  $1,0 \times 10^9$  bacterias/gramo de mineral.

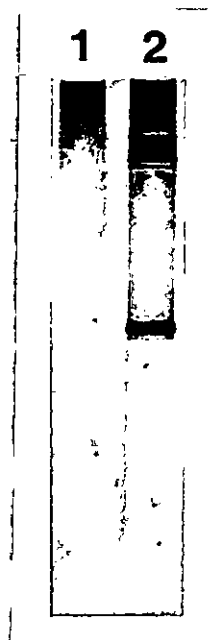
Por otra parte, la estimación del número de bacterias en el efluente de la solución de lixiviación de columnas experimentales, utilizando técnicas de plaqueo en medio sólido (22) y de conteo directo por microscopía de epifluorescencia (25), arrojan resultados de hasta  $1 \times 10^5$

unidades formadoras de colonias/ml y de  $1 \times 10^6$  bacterias totales/ml, respectivamente. Esto indica que una gran cantidad de las bacterias que se encuentran creciendo en el sistema de lixiviación, lo hacen unidas al mineral. La recuperación de ADN desde estas soluciones es concordante con la cifras encontradas por microscopía.

### 3. IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES BACTERIANAS PRESENTES EN EL ADN EXTRAIDO DEL SISTEMA DE LIXIVIACION.

#### 3.1. Amplificación de la región espaciadora intergénica de los ARNr 16S y 23S, a partir del ADN extraído directamente del sistema.

Para amplificar la región espaciadora, se siguió inicialmente el procedimiento descrito en Métodos que incluía tiempos de alineamiento a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. La línea 2 de la figura 15, muestra que bajo estas condiciones, la región espaciadora de *T. ferrooxidans*, cepa ATCC 19859, es amplificada eficientemente, obteniéndose sólo un amplificado, de un tamaño de 530 pb. Pero no hubo amplificación del ADN extraído directamente del sistema de lixiviación correspondiente a una mezcla de volúmenes iguales de las cuatro extracciones realizadas sucesivamente (línea 1, figura 15).



**Figura 15.** Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con plata de los productos obtenidos de la amplificación por PCR de 15 ng de ADN de *T. ferrooxidans* cepa ATCC 19859 (línea 2) y de 15 ng de ADN extraído a partir de mineral aglomerado (línea 1).

Esto demostró que aunque la extracción rendía una preparación con una importante cantidad de ADN, su calidad no era adecuada para llevar a cabo una amplificación exitosa de la región espaciadora intergénica de los ARNr 16S y 23S, probablemente debido a la presencia en el extracto de ADN de gran cantidad de proteínas y ARNr bacterianos (líneas 1 y 2, figura 16). Subsecuentemente, se exploraron técnicas de purificación de este ADN para lograr una amplificación eficiente.

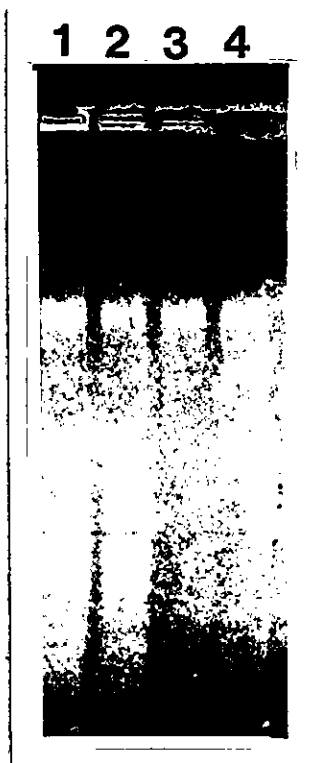
### 3.1.1. Obtención de un ADN apropiado para la reacción de amplificación de la región espaciadora intergénica de los ARNr 16S y 23S.

Para tener un ADN apto para ser amplificado, fue



necesario tratar enzimáticamente el ADN para eliminar potenciales inhibidores de la reacción, como ARNr y nucleasas. Los ARNs ribosomales, específicamente el ARNr 23S cuyo extremo 5' es complementario al partidor L1, podrían estar compitiendo por los partidores, con la consiguiente merma en el rendimiento y en la especificidad.

El ADN se trató con 100 ug/ml de ARNsa A por 2 horas a 37 °C, para eliminar los ARNrs ribosomales presentes en la muestra y posteriormente con 250 ug/ml de proteinasa K por 1 hora a 37 °C, para eliminar proteínas como nucleasas y otras que podrían interferir en la reacción de amplificación (líneas 3 y 4, figura 16).



**Figura 16.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del ADN obtenido a partir de 0,2 gramos de mineral, antes (líneas 1 y 2) y después de tratar con 100 ug/ml de ARNasa por 2 horas a 37 °C y posteriormente con 250 ug/ml de proteinasa K por 1 hora a 37 °C (líneas 3 y 4).

Considerando la posible presencia de otros inhibidores en el ADN obtenido a partir del mineral aglomerado, como por ejemplo metales pesados, el ADN se purificó por filtración en gel, usando una columna de Sefadex G-200 saturado en TE pH 8,5. Tal como se ve en la línea 2 de la figura 17, la purificación por Sefadex G-200 si bien generó un ADN más puro, se recuperó muy poco del ADN originalmente presente en la muestra (línea 1, figura 17), que impidió una

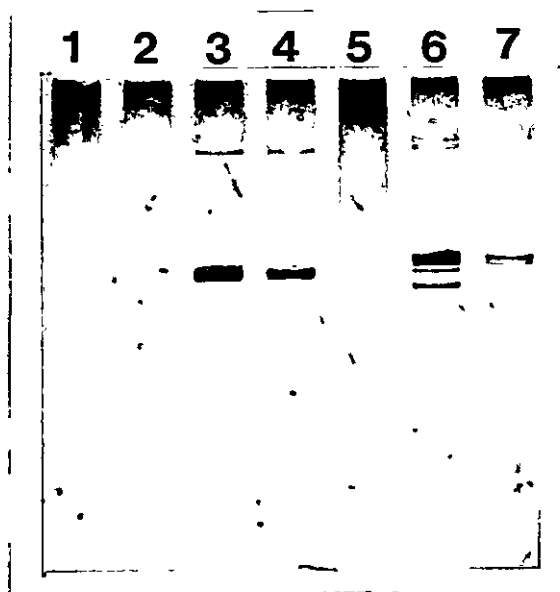
amplificación eficiente del ADN. Probablemente esta escasa recuperación del ADN se deba a que la mayoría del ADN extraído se encuentre aglomerado formando una red, por lo tanto el gel lo va a retener.

Buscando una forma alternativa para minimizar el efecto de los inhibidores presentes en el ADN, luego del tratamiento enzimático del ADN con ARNasa A y proteinasa K, se realizó amplificaciones con diluciones del ADN, para disminuir la concentración del inhibidor presente en la muestra. Además, debido a la presencia de una fuerte estructura secundaria en la región a amplificar (30,61), el tiempo de apareamiento de los partidores al templado fue aumentado de 30 segundos a 7 minutos a 55 °C, tal como lo recomienda Jensen y colaboradores (29).



Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio del ADN extraído a partir de 1 gramo de mineral, antes (línea 1) y después de purificar por una columna de Sefadex G-200 (línea 2).

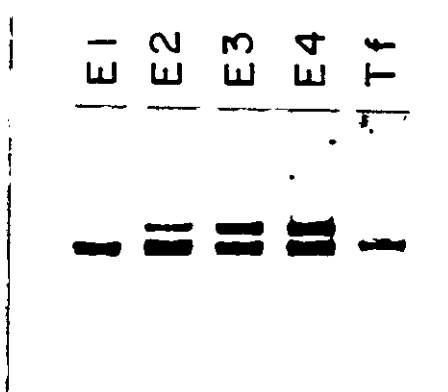
Tal como lo muestra la figura 18, bajo estas nuevas condiciones al amplificar diluciones seriadas en base 10 del ADN obtenido a partir de *T. ferrooxidans* cepa ATCC 19859 y del mineral aglomerado, una dilución 1/100 del ADN permite eliminar la inhibición manteniendo aún suficiente ADN para obtener un producto claramente observable (líneas 3 y 6).



**Figura 18.** Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con plata, de los productos obtenidos de la amplificación por PCR de las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 de 1,0  $\mu$ g del ADN extraído de *T. ferrooxidans* cepa ATCC 19859 (líneas 2, 3 y 4, respectivamente) y del mineral lixiviado (líneas 5, 6 y 7, respectivamente). Línea 1: control sin ADN bacteriano.

### 3.2. Amplificación de los ADNs obtenidos por extracciones secuenciales del mineral lixiviado.

Debido a que la extracción de ADN se basa en la lisis de las bacterias asociadas al mineral y suponiendo una población bacteriana heterogénea, era posible que las distintas extracciones obtuvieran ADN de distintos tipos de bacterias, debido a diferencias en la eficiencia de lisis de ellas. Esto puede deberse tanto a diferencias en sensibilidad al SDS, como a la ubicación de la bacteria en el mineral. Para determinar potenciales diferencias de composición entre los ADNs obtenidos en cada una de las extracciones sucesivas, los ADNs obtenidos en cada extracción se amplificaron en forma independiente. Tal como lo muestra la figura 19, el patrón de amplificados no es el mismo en cada uno de los extractos, observándose que uno de los amplificados se detecta casi en la misma cantidad en todos los extractos, en cambio hay otro que es extraído en forma creciente. Esto indica una extracción diferencial del ADN bacteriano presente en el sistema y que por lo tanto las amplificaciones se deben llevar a cabo a partir de una mezcla del ADN obtenido en las cuatro extracciones, para obtener un resultado que represente a la población bacteriana del mineral.



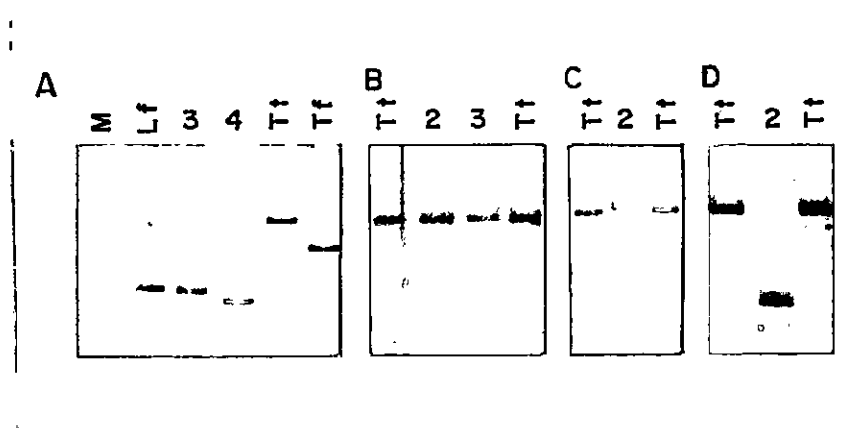
**Figura 19.** Electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con plata de los productos obtenidos de la amplificación por PCR de 10 ng de ADN de la cepa ATCC 19859 de *T. ferrooxidans* (Tf) y del ADN obtenido por extracciones secuenciales a partir de 0,01 gramo de mineral lixiviado en la columna regada con 1 g/l de Fe(II). E1: primera extracción, E2: segunda extracción, E3: tercera extracción y E4: cuarta extracción.

### 3.3. Determinación de la diversidad bacteriana presente en un sistema de biolixiviación de cobre por análisis de ADN.

#### 3.3.1. Análisis de las regiones espaciadoras entre los genes ribosomales 16S y 23S en aislados obtenidos a partir de operaciones de biolixiviación.

Inicialmente se exploró la capacidad del método descrito por Jensen y colaboradores para distinguir entre las principales especies bacterianas aisladas de procesos de biolixiviación (29). Las regiones espaciadoras se amplificaron por PCR usando partidores complementarios a

secuencias altamente conservadas en los genes de los ARNr 16S y 23S adyacentes a estas regiones. El tamaño de la región espaciadora se determinó por electroforesis en gel. El análisis inicial de las cepas de *T. ferrooxidans* (ATCC 19859), *Thiobacillus thiooxidans* (ATCC 19377) y *Leptospirillum ferrooxidans* (DSM 2705), mostró apreciables diferencias de tamaño de los productos obtenidos entre las cepas de las diferentes especies (Figura 20A).

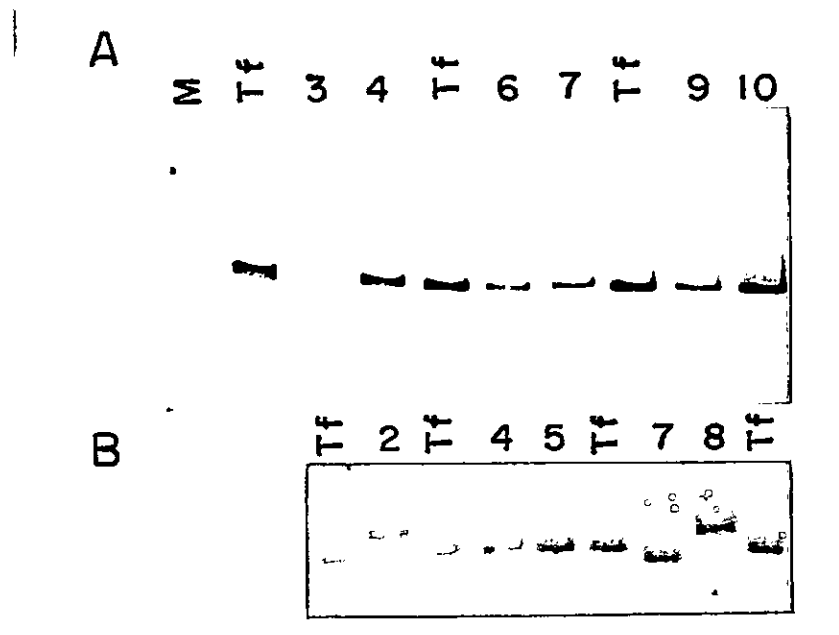


**Figura 20.** Productos obtenidos de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes de los ARNr 16S y 23S del ADN extraído de diferentes cepas. (A) Líneas: M, fragmento de 603 pb de  $\phi$ x174 digerido con HaeIII; Lf, *L. ferrooxidans* DSM 2705; 3, *L. ferrooxidans* DSM 2391; 4, *L. ferrooxidans* ATCC 49881; Tt, *T. thiooxidans* ATCC 19377; Tf, *T. ferrooxidans* ATCC 19859. (B), (C), (D): Tt: ATCC 19377. (B). Líneas: 2, DSM 594; 3, DSM 622. (C). Línea 2, DSM 9463. (D). Línea 2, *Thiobacillus* sp. DSM 612.

Las tres cepas de *L. ferrooxidans* examinadas mostraron espaciadores más pequeños con un largo similar entre ellos, aunque uno parece ser ligeramente más corto que los otros dos. El largo del espaciador parece ser muy conservado entre cepas de estas especies pese a la baja similitud de secuencia

observada entre sus ADNs (31-50 %) (20). Tres cepas de *T. thiooxidans* con alta similitud de secuencia entre sus ADNs (22), mostraron regiones espaciadoras indistinguibles en tamaño entre sí, pero de un tamaño 50 pb mayor que las observadas en las cepas de *L. ferrooxidans* (Figura 20B). La cepa BS-2 (DSM 9463), aislada por Goebel & Stackebrant (19), mostró un espaciador de un tamaño ligeramente mayor (Figura 20C). Esta cepa se agrupa con las otras cepas de *T. thiooxidans* por similitud de secuencia del ARNr 16S (19), pero no se ha clasificado por hibridación de ADN. La cepa DSM 612, originalmente clasificada en esta especie, pero con un bajo porcentaje de similitud de secuencia con el ADN de una cepa de *T. thiooxidans* de referencia (22), presentó una región espaciadora mucho más pequeña (Figura 20D). Esta cepa ha sido últimamente designada como un *Thiobacillus sp.* y es probablemente una cepa de *Thiobacillus albertis* (13,22). Seis aislados de *T. ferrooxidans*, incluyendo la cepa Torma (50) y cinco otros aislados obtenidos a partir de diferentes regiones geográficas de Chile, mostraron por electroforesis en gel un espaciador indistinguible por tamaño (Figura 21A).





**Figura 21.** Productos obtenidos de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes de los ARN ribosomales 16S y 23S del ADN extraído a partir de diferentes cepas de *T. ferrooxidans*. Líneas M y Tf corresponden al fragmento de 603 pb de  $\phi x 174$  digerido con HaeIII, y a la cepa ATCC 19859, respectivamente. (A). Líneas: 3, Chi 002; 4, Chi 085; 6, Michilla; 7, Teniente; 9, Torma; 10, Lo Aguirre. (B). Líneas: 2, IFO 14245 (Lp); 4, DSM 583; 5, DSM 9464 (N-Fe3); 7, DSM 9465 (N-Fe4); 8, IFO 14262 (Ph).

Para descartar la posibilidad de que la uniformidad de tamaño observada entre las regiones espaciadoras de los distintos aislados de *T. ferrooxidans* pudiera deberse a una selección no intencional de cepas de esta especie, se incluyeron en el estudio cepas adicionales. Estas cepas presentan entre ellas diferencias a nivel de similitud de secuencias de sus ADNs y de sus ARNrs 16S, por lo que podría darse un gran polimorfismo de tamaño entre las regiones espaciadoras de éstas cepas (19,21,35).

Un considerable polimorfismo del tamaño de la región

espaciadora se observó entre las cepas examinadas pertenecientes a los distintos grupos establecidos por hibridación de ADN (Figura 21B). Sin embargo, un espaciador con un largo particular prevalece entre los aislados examinados. Este espaciador podría ser característico de cepas clasificadas en el grupo 3a por hibridación de ADN (21,24). Algunas cepas de *T. ferrooxidans* contienen una región espaciadora casi tan grande como la observada en *T. thiooxidans*. La Tabla 5 muestra el tamaño estimado de las regiones espaciadoras de las diferentes cepas examinadas. De acuerdo a los resultados de este análisis, se puede concluir que este método nos puede dar una buena estimación de la complejidad de la población bacteriana presente en el sistema de biolixiviación, aunque permite sólo una identificación preliminar de los diferentes tipos de bacterias, especialmente para *T. ferrooxidans*, dada la heterogeneidad de tamaño de la región espaciadora.

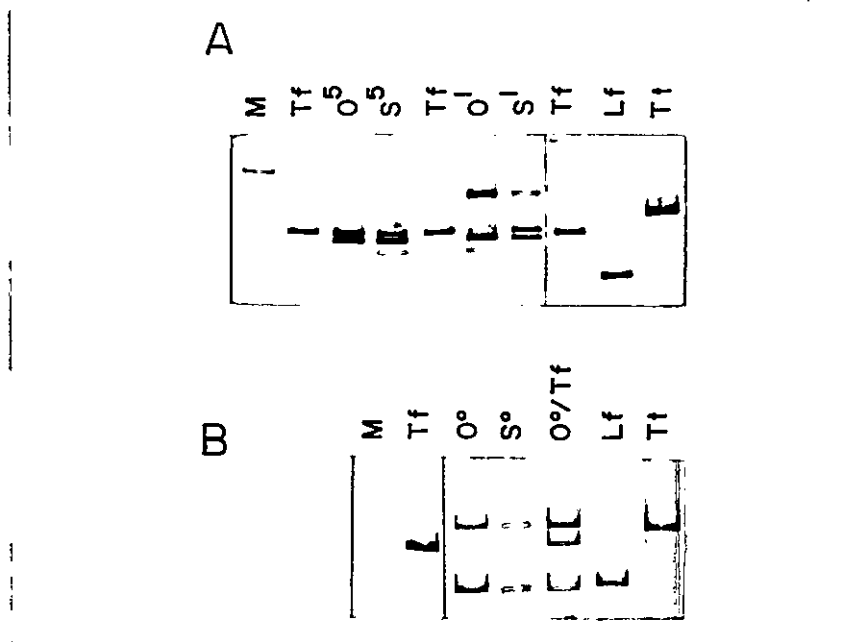
**Tabla 5.** Tamaño estimado de los productos de la amplificación de la región espaciadora intergénica de los genes ribosomales de los ARN 16S y 23S, en cepas pertenecientes a diferentes especies asociadas a la biolixiviación.

Especies y cepas	Grupo(a)	Colección	Tamaño(b)
<i>T. ferrooxidans</i>			
ATCC 19859	3a	ATCC	530
DSM 583	3a	DSM	530
DSM 9464 (NFe3)	NA	DSM	530
DSM 9465 (NFe4)	NA	DSM	520
IFO 14245 (Lp)	2	IFO	545
IFO 14262 (Ph)	4	IFO	545
Torma	NA	O.O. (c)	530
Chi 002, Chi 085, Michilla, Teniente, Lo Aguirre.	NA	O.O.	530
<i>T. thiooxidans</i>			
ATCC 19377	1	ATCC	550
DSM 504	1	DSM	550
DSM 622	1	DSM	550
DSM 9463 (BS2)	NA	DSM	555
DSM 612	2	DSM	480
<i>L. ferrooxidans</i>			
ATCC 49881 (Lfp3A)	NA	C.J. (c)	495
DSM 2705	NA	C.J.	505
DSM 2391 (BU-1)	NA	C.J.	505

( ): Nombres comunes de las cepas  
(a): Agrupación por hibridación de ADN-ADN  
(b): Tamaño estimado en nucleótidos  
(c): Ver Materiales y Métodos  
NA: No Agrupado

### 3.3.2. Análisis de las regiones espaciadoras intergénicas de los ARN ribosomales 16S y 23S, de bacterias crecidas durante un proceso de lixiviación.

La complejidad de la población bacteriana se estudió en muestras obtenidas de columnas con calcosina/covelina, irrigadas con soluciones que contenían 0, 1 ó 5 gramos de Fe(II)/litro. La concentración de Fe(II) no cambió la velocidad ni la recuperación total de cobre por más de un 5% entre estas columnas (resultados no mostrados). El ADN obtenido a partir del mineral aglomerado y del efluente de la solución lixivante de cada una de las columnas se sometió a amplificación de las regiones espaciadoras. El análisis de los productos por electroforesis en gel mostró un patrón de productos de amplificación relativamente complejos, diferente para cada concentración de Fe(II) empleada en la solución de lixiviación. El amplificado esperado luego de amplificar el ADN de las cepas de *T. ferrooxidans* comúnmente aisladas en Chile, se observó en una cantidad significativa sólo en el mineral aglomerado lixiviado con 5 gramos de ión Fe(II)/litro (Figura 22A, línea 05) y en las soluciones efluentes de las columnas lixiviadas con 5 y 1 gramo de Fe(II)/litro (líneas S5, S1).



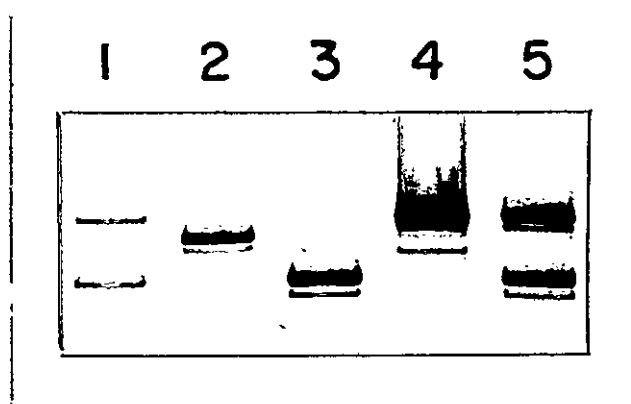
**Figura 22.** Productos obtenidos de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras entre los genes del ARNr 16S y 23S, a partir del ADN extraído de mineral lixiviado (líneas 0) y de soluciones efluentes (líneas S). (A). Muestras obtenidas a partir de columnas lixiviadas con soluciones que contenían 5 ó 1 gramo/litro de Fe(II) (indicado a continuación de la letra). Tf, Tt y Lf, corresponden a los productos de amplificación del ADN de *T. ferrooxidans* (ATCC 19859), *T. thiooxidans* (ATCC 19377) y *L. ferrooxidans* (DSM 2705), respectivamente. M, muestra el fragmento de 603 pb de  $\phi$ x174, digerido con HaeIII. (B). Muestras obtenidas a partir de columnas lixiviadas sin Fe(II). Oo/Tf, corresponde a los productos de amplificación del ADN extraído de 1 gramo de mineral, luego de agregar  $5 \times 10^7$  bacterias de *T. ferrooxidans* (determinado por microscopía de epifluorescencia). M, Tf, Tt y Lf, corresponden a lo descrito en (A).

Un amplificado adicional correspondiente a un producto aproximadamente 10 pb más pequeño, se observó en todas estas muestras que fueron lixiviadas con Fe(II), adicionado a las soluciones de lixiviación. El producto esperado para *T. ferrooxidans* fue raramente observado o no observado luego de amplificar el ADN extraído tanto del aglomerado como de la solución efluente de la columna lixiviada sin agregar Fe(II) (Figura 22B, líneas Oo, So) y a partir del mineral aglomerado lixiviado con 1 gramo/litro de ión Fe(II) (Figura 22A, línea O1). Estas observaciones iniciales sugieren que la población bacteriana presente en este sistema de lixiviación, comprende bacterias diferentes al *T. ferrooxidans* típicamente aislado en Chile en sistemas de biolixiviación y que la presencia de *T. ferrooxidans* en la población observada es dependiente de la concentración de ión Fe(II) en el sistema de biolixiviación. Los dos productos principales obtenidos luego de la amplificación del ADN obtenido de las columnas con mineral lixiviadas sin Fe(II), presentaron movilidades electroforéticas similares a los productos obtenidos a partir del ADN de las cepas de *T. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* (líneas Tt, Lf). Particularmente interesante fue la aparente ausencia de *T. ferrooxidans* en estas columnas. Para determinar si la no detección de ésta bacteria se debió a una falla en la recuperación del ADN a partir de estas bacterias, el ADN se extrajo a partir del mineral de esta columna luego de adicionar *T. ferrooxidans* al mineral lavado. La Figura

22B, línea Oo/Tf muestra que el *T. ferrooxidans* agregado fue eficientemente recuperado por el procedimiento de extracción.

### 3.3.3. Identificación de las bacterias crecidas cuando el mineral se lixivió sin Fe(II).

La identificación de las bacterias encontradas en esta condición se llevó a cabo secuenciando parte de los genes del ARNr 16S, adyacente a las regiones espaciadoras. Para obtener la región del ARNr 16S, el ADN original se amplificó usando un partidior complementario a una secuencia conservada cerca del extremo 5' del ARNr 16S y uno de los partidiores empleados para amplificar la región espaciadora, complementaria a una secuencia cercana al extremo 5' del ARNr 23S. Esta amplificación permitió obtener el ARNr 16S junto con la correspondiente región espaciadora, lo que permitió una identificación conveniente de los ámplificados. La amplificación de las regiones espaciadoras de los productos obtenidos, mostró un patrón similar o igual al observado luego de amplificar los espaciadores en el ADN original (Figura 23, líneas 1 y 5).



**Figura 23.** Productos obtenidos de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras intergénicas de los ARNr 16S y 23S. Línea 1, Amplificado conteniendo el gen del ARNr 16S y la región espaciadora; línea 2, *T. ferrooxidans* ATCC 19859; línea 3, Plasmidio recombinante pss 14; línea 4, plasmidio recombinante pls 24; línea 5, ADN extraído a partir del mineral lixiviado en ausencia de Fe(II).

Los productos de la amplificación que contenían el ARNr 16S fueron posteriormente clonados en pUC19. Se analizó nueve clones; la amplificación de las regiones espaciadoras en cada clon mostró que cinco de ellos contenían el espaciador similar al de *T. thiooxidans*, mientras que los otros tres contenían uno similar a uno de los encontrados en *L. ferrooxidans* (Figura 23). Estos ocho clones fueron secuenciados en la región correspondiente, aproximadamente, a los nucleótidos 400 a 700 del ARNr 16S de *E.coli*. El noveno clon mostró por amplificación, un producto de aproximadamente 200 pb de longitud (no mostrado). Ya que este producto se observó sólo una vez en las numerosas amplificaciones del ADN original, no fue secuenciado. Las secuencias obtenidas a partir de cada uno de los cinco clones que contenían los espaciadores de mayor tamaño (pls 23, 24, 45, 47, 53) fueron



idénticas (Tabla 6). En los clones obtenidos la secuencia fue GGAGGACGAAAAGGTGGGTGCTAATATCGCCTGCTGTT y al compararla con las secuencias informadas de los ARNr 16S de cepas aisladas en condiciones de biolixiviación, resultó ser casi idéntica a la informada para el grupo de cepas de *T. thiooxidans* BS-3 y ATCC 19377, (las posiciones nucleotídicas 443 a 480 sugeridas como potencialmente discriminatorias entre grupos de *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y otras especies bacterianas aisladas en sistemas de biolixiviación según Goebel & Stackebrandt (19) aparecen marcadas más oscuras). La única diferencia observada fue una sustitución de A por T en la posición 469.

**Tabla 6.** Similitud de secuencias entre los genes del ARNr 16S(a).

=====					
% de similitud comparada con					
Cepa o clon	BS-3	pls	pss 21,14	pss 38	BU-1
=====					
<i>T. thiooxidans</i> BS-3	---	98,5	69,6	70,3	71,1
pls 23,24,45,47,53		----	69,4	70,4	70,1
pss 21,14			----	94,6	94,6
pss 38				----	100
=====					

(a). Los números presentados, corresponden a porcentajes de similitud, basados en la comparación de 194 nucleótidos a partir de la posición 429 hasta la 630, según la numeración de *E. coli*. Algunas posiciones, que consistentemente dieron asignaciones ambiguas de nucleótidos o anomalías de compresión de bandas, fueron excluidas del análisis.

pls: plasmidios recombinantes con la región espaciadora de mayor tamaño.

pss: plasmidios recombinantes con la región espaciadora de menor tamaño.

La identificación de las cepas con las regiones espaciadoras de mayor tamaño como *T. thiooxidans* se confirmó

fenotípicamente, ya que todas ellas fueron capaces de crecer en azufre elemental, pero no en Fe(II).

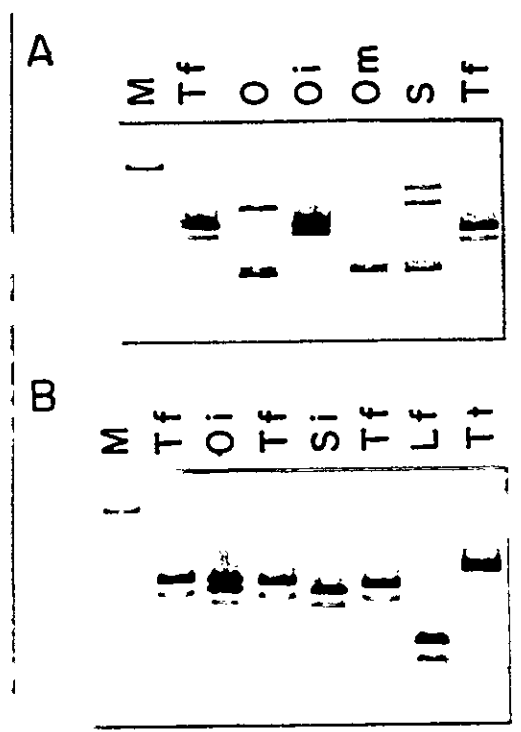
Las secuencias de los tres clones que poseen la región espaciadora más corta, similar en longitud a los espaciadores encontrados entre las cepas de *L. ferrooxidans*, mostró alguna diversidad (Tabla 6). Dos de los clones presentaron secuencias idénticas (clones 14 y 21). El tercer clon contenía una secuencia idéntica a la informada por Lane y colaboradores para *L. ferrooxidans* BU-1 (DSM 2391), una cepa aislada por Groudev de una mina de cobre en Bulgaria (35).

#### 3.3.4. Selección de la población bacteriana durante el crecimiento en medios de cultivos con diferentes fuentes de energía.

Para determinar el potencial efecto selectivo que provocaría en la población bacteriana presente en el sistema de biolixiviación el aislamiento en medios de cultivo, la composición de la población se determinó antes y después del crecimiento en diferentes medios de cultivo. La figura 24A, línea 0, muestra los productos obtenidos luego de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras presentes en el ADN de las bacterias provenientes del mineral lixiviado de las columnas regadas en ausencia de Fe(II).

Sin embargo, cuando las mismas muestras se analizaron después de cultivarlas en un medio sintético con Fe(II), se observó la prevalencia de regiones espaciadoras de tamaños

similares a las de *T. ferrooxidans* (Figura 24A, línea Oi). Dos bandas principales se observaron en el ADN obtenido a partir del cultivo inoculado con el mineral aglomerado, las cuales no se observaban en el ADN del mineral original. Una de ellas comigra con el producto obtenido tras la amplificación de la cepa ATCC 19859 de *T. ferrooxidans*; la otra banda observada migró ligeramente más rápida que la de *T. ferrooxidans*. Esta última banda fue el producto predominante durante el cultivo de la solución efluente (línea Si). Los tamaños diferentes de éstos productos se confirmaron usando como marcadores de tamaño los productos obtenidos de las especies más frecuentemente aisladas en procesos de lixiviación (Figura 24B). Por otra parte, los productos de amplificación originales, obtenidos a partir del ADN extraído directamente del mineral aglomerado (línea O), se observaron durante los tres subcultivos consecutivos en medio sintético que contenía mineral como la única fuente de energía, en vez de Fe(II) (línea Om).

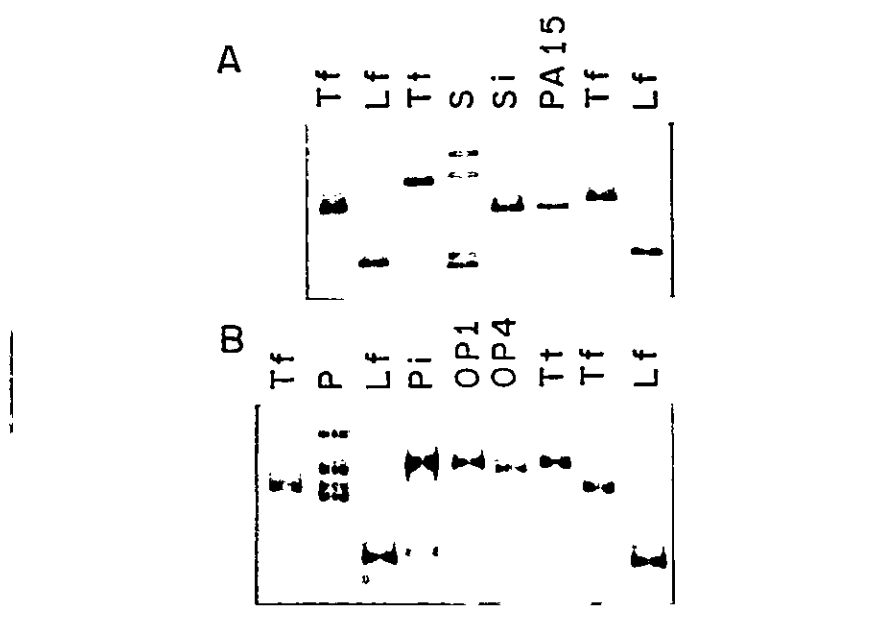


**Figura 24.** Productos obtenidos de la amplificación por PCR de las regiones espaciadoras intergénicas de los ARNr 16S y 23S, del ADN extraído de la muestra original de las columnas lixiviadas en ausencia de Fe(II) ó luego de cultivar en un medio sintético. Línea 0, mineral lixiviado; Oi, cultivo del mineral lixiviado en un medio sintético con Fe(II); Om, cultivo del mineral lixiviado en un medio sintético con minerales; S, solución efluente; Si, cultivo de la solución efluente en un medio sintético con Fe(II). M, fragmento de 603 pb de  $\phi$ x174 digerido con HaeIII; Tf, *T. ferrooxidans* ATCC 19859; Lf, *L. ferrooxidans* ATCC 49881; Tt, *T. thiooxidans* ATCC 19377.

La bacteria que creció a partir de la solución efluente y que tenía una región espaciadora más pequeña (alrededor de 520 pb) se clonó por plaqueo en un medio sólido de agarosa (22). La Figura 25A muestra las regiones espaciadoras obtenidas a partir del ADN original de la solución efluente, del ADN de la bacteria seleccionada durante el crecimiento en Fe(II) y el ADN del clon de la bacteria seleccionada. Esta cepa se designó PA15.

Un análisis similar se llevó a cabo con el ADN obtenido a partir de la solución lixivante que salía de las pilas de una planta de producción de cobre. La pila consiste de un mineral similar, lixiviado con la solución resultante del proceso empleado en la planta industrial (refino), el cual contiene una alta concentración de sulfato y fierro (alrededor de 150 g/l y 5 g/l, respectivamente). Esta solución contenía pequeñas partículas de mineral en suspensión y del procedimiento de extracción del ADN se obtuvo ADN tanto de las bacterias planctónicas como de aquellas unidas a las partículas de mineral. La amplificación de este ADN generó un patrón de regiones espaciadoras conformado por muchas bandas (Figura 25B). Pero la amplificación del ADN de estas bacterias que crecen en medio con Fe(II), generó dos regiones espaciadoras principales, ambas significativamente más grandes que las observadas en *T. ferrooxidans*, con tamaños aproximados de 550 y 555 pb, similares a los observados para las cepas de *T. thiooxidans*.

Las bacterias que contienen estas dos regiones espaciadoras, fueron posteriormente clonadas por dilución y crecimiento en medio de cultivo, ya que ellas no forman colonias en un medio sólido de agarosa. Estas cepas se designaron OP1 (región espaciadora de 555 pb) y OP4 (región espaciadora de 550 pb).

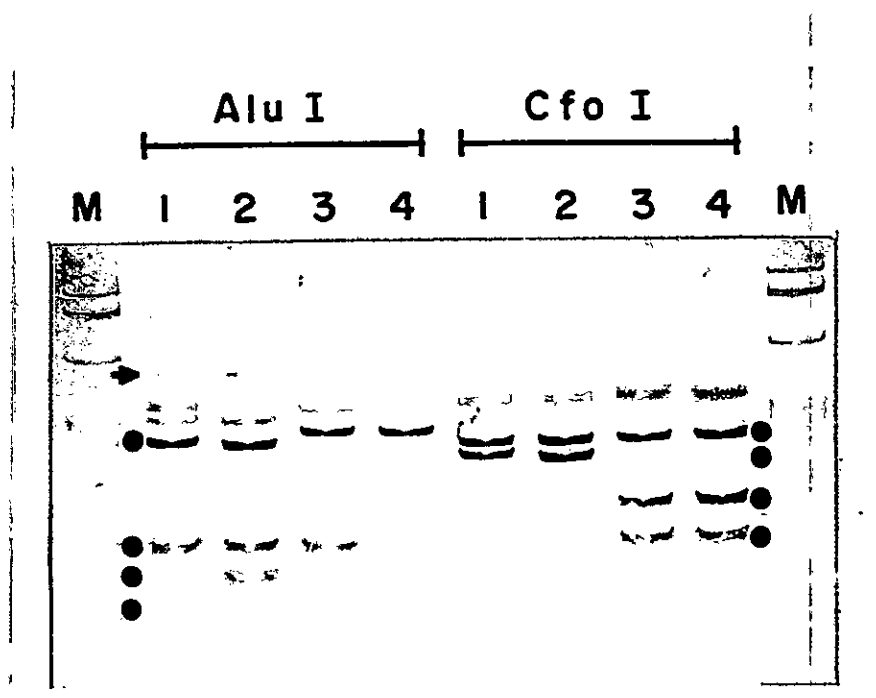


**Figura 25.** Productos de la amplificación por PCR de la región espaciadora intergénica de los ARNr 16S y 23S, a partir del ADN extraído directamente de las bacterias en las soluciones de lixiviación y luego de crecerlas en un medio sintético con Fe(II). (A). Selección a partir de las soluciones de lixiviación de las columnas experimentales. S, efluente de la solución de lixiviación; Si, cultivo del efluente de la solución de lixiviación, en un medio sintético con Fe(II); PA15, cultivo en medio sintético con Fe(II) del clon PA15, obtenido por plaqueo en agarosa a partir de Si. (B). Selección a partir de la solución de lixiviación de la planta industrial de Lo Aguirre. P, efluente de la solución de lixiviación; Pi, cultivo del efluente de la solución de lixiviación, en un medio sintético con Fe(II); OP1, cultivo en medio sintético con Fe(II) del clon OP1, obtenido por dilución a partir de Pi; OP4, cultivo en medio sintético con Fe(II) del clon OP4, obtenido por dilución a partir de Pi.

### 3.3.5. Caracterización de las bacterias seleccionadas en los medios sintéticos con Fe(II).

Como se mostró previamente, las bacterias clasificadas como *T. ferrooxidans* muestran un alto grado de polimorfismo de la región espaciadora (Tabla 5), por ello, aunque las bacterias seleccionadas, especialmente OP1 y OP4, contienen regiones espaciadoras no observadas entre las cepas previamente analizadas de esta especie, de acuerdo a los criterios convencionales estas cepas aún pueden ser llamadas como *T. ferrooxidans*, ya que son capaces de crecer en Fe(II) y azufre elemental. Para determinar el grado de semejanza que tendrían éstas cepas aisladas con las cepas conocidas de *T. ferrooxidans* se llevó a cabo una caracterización de las cepas aisladas tanto por el patrón de los fragmentos obtenidos luego de digerir con enzimas de restricción las regiones espaciadoras, como por el análisis de la secuencia nucleotídica del ARNr 16S. Los patrones de restricción de las regiones espaciadoras de las cepas analizadas fueron similares a los obtenidos para *T. ferrooxidans* cepa ATCC 19859 (Figura 26).

Los mismos sitios de restricción para AluI y CfoI presentes en ATCC 19859 se encontraron en PA15. En cambio las cepas OP1 y OP4 si bien tienen conservados los sitios de restricción para AluI contienen un sitio adicional para CfoI.



**Figura 26.** Patrón de los fragmentos de restricción obtenidos luego de digerir con AluI ó CfoI el producto de la amplificación por PCR de la región intergénica de los ARNr 16S y 23S de las cepas aisladas y de la cepa ATCC 19859 de *T. ferrooxidans*. Líneas 1, *T. ferrooxidans* ATCC 19859; 2, PA15; 3, OP1; 4, OP4. Los puntos indican los fragmentos obtenidos. La flecha indica los productos de la amplificación sin digerir. M, fragmentos de restricción de  $\phi$ x174 digerido con HaeIII.

Ya que los patrones de restricción obtenidos luego de digerir los distintos aislados con las enzimas de restricción no mostraron grandes diferencias, el significado de las diferencias observadas con respecto al grado de semejanza entre estas cepas y *T. ferrooxidans* fue difícil de interpretar. Por ello, para obtener una mejor estimación de la semejanza entre las cepas, parte del ARNr 16S, adyacente a la región espaciadora se secuenció como ya se describió anteriormente. Los productos obtenidos luego de amplificar el



ARNr 16S fueron secuenciados directamente en la región correspondiente aproximadamente a los nucleótidos 370 a 625 del ARNr 16S de *E. coli*. La similitud entre PA15 y OP4 fue de 98,4%. La comparación con las secuencias disponibles para *T. ferrooxidans* (19,42), mostró similitudes entre un 97,4 y 100%. En cada comparación, las diferencias se concentraron en la región entre los nucleótidos 443 a 480, sugerida como una zona potencialmente discriminatoria entre los grupos de las cepas de *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans* (19). La secuencia encontrada en esta región en PA15 fue GGAGGACGAAAAGGCGGGTTCTAATAACAATCTGCTGTT y mostró identidad con la secuencia reportada para el grupo de cepas N-Fe4, Ph y F221 de *T. ferrooxidans* (en oscuro las posiciones potencialmente discriminatorias). La secuencia en OP4 fue GGGGGACGAAAAGGCGGGTCCTAATACGATCTGCTGTT, idéntica a la encontrada en el grupo de cepas conformado por N-Fe2 y Lp de *T. ferrooxidans*.

El análisis morfológico de las cepas aisladas, PA15, OP1 y OP4 demostró que se trata de bacilos rectos, indistinguibles en forma y tamaño de la cepa ATCC 19859 de *T. ferrooxidans*. Fisiológicamente, los tres son capaces de oxidar azufre elemental y Fe(II). Además OP1 y OP4 fueron incapaces de formar colonias en un medio sólido de agarosa suplementado con Fe(II), pero PA15 fue capaz de formar pequeñas colonias con baja eficiencia.

## DISCUSION

### 1. Crecimiento bacteriano en azufre y extrapolación al crecimiento en mineral.

Un proceso industrial de biolixiviación de cobre a partir de sulfuros secundarios, cualquiera que sea el sistema utilizado, depende principalmente de una eficiente actividad oxidativa de los microorganismos presentes (22,27,48). A partir de la literatura, se sabe que para que haya una eficiente lixiviación, los microorganismos responsables del aumento de la oxidación deben proliferar en el mineral (3,4,22,27,47,48,64). Datos obtenidos en el laboratorio de SMP confirman lo anterior, ya que se determinó que más del 90% de la actividad oxidativa bacteriana se encuentra asociada al mineral lixiviado. Además, se pudo determinar que la mayoría de las bacterias metabólicamente activas del sistema de lixiviación, se encuentran unidas irreversiblemente al mineral, ya que más del 80% de la actividad oxidativa bacteriana permanece asociada al mineral luego de lavar extensamente con ácido sulfúrico diluido.

De lo anterior se concluye, que para mejorar la eficiencia de un proceso industrial de biolixiviación y eventualmente solucionar los problemas que pudieran presentarse en un sistema de este tipo, es imprescindible

conocer de mejor manera la proliferación de las bacterias en su forma asociada al mineral lixiviado. Esta tesis se enmarcó dentro de este objetivo general, poniendo especial énfasis en dos cosas: 1. Caracterizar la colonización del mineral lixiviado por parte de *T. ferrooxidans*. 2. Determinar la diversidad de la población bacteriana presente en el sistema de lixiviación y como ésta se ve influenciada por cambios en la composición del medio lixivante.

El estudio del tipo de unión que *T. ferrooxidans* establece con la superficie del azufre durante la adsorción irreversible inicial de *T. ferrooxidans*, llevó a determinar que es sensible a la acción tanto de detergentes iónicos (SDS) como no-iónicos (Tween 20). Esto nos indicaría que la adsorción inicial de las bacterias al azufre sería una unión de tipo no covalente e hidrofóbica. Esto se vio apoyado al adsorber sobre azufre bacterias cultivadas en medios de cultivo con distintas fuentes de energía, que van a determinar que las bacterias presenten hidrofobicidades distintas de su superficie bacteriana, dependiendo de la fuente de energía utilizada en su cultivo (12). Al determinar el número de bacterias adsorbidas, se pudo observar que las bacterias que fueron cultivadas en azufre (bacterias con mayor hidrofobicidad que aquellas crecidas en Fe(II) (12)) presentaron una adsorción 9,5 veces mayor que las bacterias cultivadas en Fe(II).

Por otra parte, al determinar la adsorción irreversible

inicial de *T. ferrooxidans* incubado en  $Hg(II)$ , un catión tóxico para el metabolismo bacteriano, medido en términos del daño que provoca en la bacteria en su capacidad de proliferar en medio sólido y de oxidar ión  $Fe(II)$ , se pudo determinar que la unión sobre el azufre elemental no sería un proceso activo que requiere gasto de energía por parte de la bacteria, ya que bajo estas condiciones la adsorción de las bacterias no se vió alterada significativamente.

Todo esto nos lleva a concluir que la adsorción irreversible inicial de las bacterias al azufre, es un proceso pasivo, que no requiere gasto de energía por parte de la bacteria y que va a depender de la composición de la superficie bacteriana al momento de interactuar con la superficie del azufre sobre el cual se va a unir. Esto concuerda con los datos disponibles en la literatura, en el sentido que la bacteria se une rápida e irreversiblemente sobre la superficie a colonizar, en un tiempo que difícilmente permitiría una síntesis *de novo* de estructuras bacterianas de superficie (2,45,46).

Desde el punto de vista evolutivo, ésto representa una estrategia adecuada, ya que la bacteria crece en un medio cuyas condiciones son bastantes extremas, en cuanto a pH y disponibilidad de un sustrato sobre el cual crecer, por lo tanto necesita estar preparada para que al entrar en contacto con el sustrato, rápidamente pueda unirse a él.

Una vez que las bacterias se unieron al azufre, fueron

capaces de proliferar sobre él hasta cubrir completamente la superficie disponible, formando una monocapa de células, unidas apicalmente, incluso en superficies mantenidas con la superficie colonizada hacia abajo, a favor de la fuerza de gravedad. Esto indicaría que la unión de las bacterias de la progenie al azufre ocurriría sino antes de desprenderse de la superficie, muy poco tiempo después de ello, ya que si no fuera así, por tener un coeficiente de sedimentación mucho mayor que el coeficiente de difusión, las bacterias serían arrastradas de la superficie y retiradas con los cambios de medio, sin llegar a cubrir la superficie colonizada. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en perlas de azufre, en el que se observó, a tiempos tempranos, que toda la progenie que se genera luego de la adsorción inicial de las bacterias a la superficie del azufre permanece unida a ella (14). La unión apical de *T. ferrooxidans* sobre la superficie del azufre, sugiere que las bacterias presentan una estructura de unión ubicada en un extremo de la superficie de la bacteria, que sería de gran importancia en la unión a un sustrato sólido, ya que aparentemente el resto de la superficie bacteriana, no tiene la capacidad de unirse al sustrato. Tal vez es en esta zona donde se ubicaría la molécula proteica que se ha visto que se expresa al cultivar las bacterias en un medio con una fuente de energía sólida (12). Con respecto a la capacidad de *T. ferrooxidans* de proliferar sobre una superficie sólida sin desprenderse de la

superficie, trabajos previos han determinado que esta bacteria es capaz de expandirse radialmente sobre una superficie, con una velocidad similar a un movimiento de "gliding", lo que podría dar una explicación a la proliferación de las bacterias sobre la superficie del azufre ubicada hacia abajo, que cursó por la expansión de colonias, probablemente producto de las bacterias inicialmente adsorbidas al azufre (55,63).

Al estudiar el efecto de la sedimentación sobre el crecimiento de *T. ferrooxidans* en la superficie del azufre, se pudo determinar que en las superficies que se mantuvieron paralelas a la fuerza de gravedad, en ningún momento se observó la formación de una estructura de crecimiento del tipo "biofilm". Algo similar a esta estructura solo se observó cuando las superficies del azufre, fueron colocadas perpendiculares a la fuerza de gravedad, enfrentándola. Pero en estos casos, sólo ocurrió una acumulación de bacterias, que no se encontraban unidas físicamente entre sí, ni con el azufre. Si bien no se midió la actividad metabólica en estos depósitos, es probable que las bacterias que los conforman se encuentren metabólicamente activas, ya que se sabe que como producto de la degradación del azufre, se liberan al medio una serie de metabolitos intermediarios de degradación, que permiten el crecimiento en suspensión de las bacterias presentes en el sistema (5).

Extrapolando estos resultados a la colonización del

mineral por *T. ferrooxidans*, sugieren que luego de colonizar el mineral, las bacterias van a crecer sobre la superficie de éste en forma de una monocapa de células. Pero la posterior distribución de la progenie en el sistema de lixiviación va a depender fuertemente de la orientación de la superficie del mineral con respecto a la fuerza de gravedad. Es esperable que en aquellos lugares del mineral que enfrentan a la fuerza de gravedad y que se hallen protegidos del flujo de líquido percolante, las bacterias se van a acumular por sedimentación, manteniéndose en el lugar debido al bajo coeficiente de difusión de la bacteria, presentando probablemente un foco de alta actividad de degradación del sustrato a lixiviar. Obviamente la situación cambia radicalmente con las bacterias móviles. En este caso, no solo van a cambiar los factores que influyen en la adsorción de la bacteria a la superficie de un sustrato, dejando de ser un proceso pasivo, sino que también va a cambiar la distribución de las bacterias en el mineral. Ahora la fuerza de gravedad no debiera ser determinante en la distribución de las bacterias, ya que el movimiento bacteriano va a ser mayor en varios órdenes de magnitud al movimiento browniano, moviéndose generalmente por quimiotaxis hacia las zonas quimioattractantes de la superficie a colonizar, por lo tanto las bacterias van a ser capaces de vencer la fuerza de gravedad, ocurriendo una colonización más rápida y específica del sustrato. En todo caso, si bien la motilidad bacteriana

es importantísima en la colonización de las bacterias sobre la superficie de un sustrato, en ningún momento las cepas de *T. ferrooxidans* analizadas en el laboratorio presentaron motilidad, por lo que este factor no sería importante, hasta lo que se conoce, en la colonización de *T. ferrooxidans* sobre un sustrato.

La figura 7 muestra un representación esquemática de la distribución hipotética del crecimiento bacteriano sobre las distintas superficies del mineral lixiviado.

## 2. Diversidad poblacional bacteriana del sistema de lixiviación.

De acuerdo a lo descrito en la literatura, la mayoría de los estudios de prevalencia bacteriana en procesos de lixiviación, llevados a cabo a temperatura ambiente, se basan en aislar las bacterias presentes en el sistema por las técnicas clásicas de cultivo (22,27,48). Estos estudios conducen a una alta selección de un pequeño porcentaje de las bacterias presentes en el sistema como se describe en la Introducción.

Para no alterar la diversidad bacteriana inicialmente presente en el mineral, fue necesario desarrollar una técnica que provocara la menor selección posible de las bacterias. Para ello se adaptó a nuestro sistema, la técnica descrita por Jensen y colaboradores, que consiste en la identificación de bacterias, por la amplificación de la región intergénica



de los genes ribosomales 16S y 23S (29).

Este tipo de estudio requiere sin embargo, la obtención de ADN directamente desde el mineral y que éste represente a la mayor parte de la población bacteriana presente en el sistema y de ser posible cada uno de sus componentes en la proporción original. Por esta razón se estudió en detalle la obtención del ADN desde el mineral y sus propiedades como molde para las reacciones de amplificación. Por constituir esta parte de la tesis aspectos principalmente metodicos la discusión fue incluida junto con Resultados. Sin embargo, cabe mencionar aquí algunas consideraciones adicionales. Esta técnica si bien presenta ventajas importantes con respecto a las técnicas tradicionales de identificación de microorganismos que emplean el cultivo en el laboratorio, también presenta desventajas que hay que tener en cuenta. La lisis bacteriana con SDS ha sido informada como exitosa para bacterias en suspensión del género Thiobacilli y Leptospirilli, pero la situación en las bacterias asociadas al mineral es distinta. En este caso, pueden darse dos situaciones: (i) Que dentro de las bacterias asociadas al mineral hayan cepas más resistentes a la lisis con SDS y/ó, (ii) Producto de la unión al mineral las bacterias se encuentren más protegidas de la acción del detergente. Para minimizar el número de bacterias no lisadas con el primer tratamiento con SDS, se hicieron 3 extracciones adicionales, extrayéndose ADN en las 4 extracciones, lo que daría cuenta

de una lisis diferencial de las bacterias asociadas al mineral, sin descartar que haya otras que aún después de estas 4 extracciones no hayan podido ser lisadas. Pese a estos inconvenientes, este procedimiento resultó ser el único de los probados que permitió una buena extracción del ADN bacteriano asociado al mineral.

Por otra parte, lo que se va a detectar por esta técnica son los amplificadores de las regiones espaciadoras del ADN extraído a partir de las bacterias asociadas al sistema de biolixiviación. A partir de esto se pueden detectar otros inconvenientes adicionales. Las regiones espaciadoras que se van a amplificar van a ser aquellas que sean capaces de ser reconocidas por los partidores empleados. Por otra parte, si bien los partidores son capaces de reconocer dos regiones espaciadoras pertenecientes a dos microorganismos distintos, no necesariamente lo van a hacer con la misma eficiencia.

Para minimizar los problemas anteriormente citados se utilizaron partidores sintetizados a partir de secuencias altamente conservadas entre las bacterias (29), los que van a reconocer regiones espaciadoras de un gran número de bacterias y probablemente con eficiencias de apareamiento similares. En todo caso, lo único que nos dice con seguridad la presencia de un patrón de amplificadores determinado, es que las cepas a las cuales pertenecen esos amplificadores se encuentran presentes en el sistema de biolixiviación, pero no necesariamente va a reflejar fielmente la diversidad y número

de bacterias originalmente presentes en la población.

Al aplicar el método originalmente propuesto por Jensen y colaboradores (29) para la identificación de bacterias, éste parece ser adecuado para determinar la complejidad de la población bacteriana en un sistema de biolixiviación. Sin embargo, debido al polimorfismo de los espaciadores entre aislados de *T. ferrooxidans*, este método no permite una clara distinción entre aislados de *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, ya que hay aislados de *T. ferrooxidans* que dan un amplificado de tamaño muy similar al obtenido con la mayoría de los aislados de *T. thiooxidans*. Una adecuada caracterización de los aislados conteniendo un espaciador en particular, puede ser hecha secuenciando parte del ARNr 16S cercano al espaciador luego de amplificar estas dos regiones juntas. Queda por definirse si el polimorfismo de las regiones espaciadoras intergénicas entre los ARNr 16S y 23S, observado en los aislados de *T. ferrooxidans*, refleja la heterogeneidad genética de la región analizada en estos aislados, o se debe a la existencia de bacterias genéticamente muy distintas dentro de esta especie, como consecuencia de una clasificación deficiente que no limita un taxón coherente.

Una adecuada clasificación es relevante en biolixiviación, ya que algunas propiedades descritas en algunas pocas cepas de laboratorio populares son extrapoladas para todo el grupo y considerado para el diseño de los

procesos. La homogeneidad de tamaño de las regiones espaciadoras entre las cepas inicialmente comparadas, podría explicarse por la selección de un grupo particular de *T. ferrooxidans* por el método comúnmente empleado, que involucra cultivo en un medio semisólido de agarosa.

Asumiendo que las regiones espaciadoras de las bacterias presentes en el sistema de biolixiviación son amplificadas con la misma eficiencia, se puede concluir que diferentes especies bacterianas llegan a ser predominantes en diferentes condiciones del sistema de biolixiviación, sin alterar la eficiencia de la extracción de cobre (90% de cobre extraído).

De acuerdo a los amplificados observados, los aislados de *T. ferrooxidans* fueron las bacterias prevalentes a altas concentraciones de Fe(II). A bajas concentraciones de Fe(II) (sin adición de Fe(II) a la solución de lixiviación, la concentración de Fe(II) en el efluente fue alrededor de 0,5 gramos/litro) *T. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* fueron las especies bacterianas prevalentes.

La identificación de las bacterias fue confirmada por las secuencias de sus ARNr 16S. Sin embargo, la alta similitud de secuencia entre los ARNr 16S de *T. thiooxidans* y *T. ferrooxidans* (19,35) y la existencia de algunos aislados de *T. ferrooxidans* con regiones espaciadoras más largas, similares a las observadas en *T. thiooxidans* (Tabla 5) no permite una discriminación concluyente entre estas dos especies. La distinción definitiva se basó en su capacidad

para crecer en medio con Fe(II) y/ó azufre elemental.

El potencial de biolixiviación de la población conformada por *T. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* se demostró por la recuperación de más del 90% del cobre en la respectiva columna.

Lixiviación a bajas concentraciones de Fe(II) sin embargo no ocurren en las plantas de biolixiviación de cobre. En estas plantas las soluciones de lixiviación contienen concentraciones de Fe(II) usualmente más altas de 2 a 3 gramos Fe(II)/litro (9,48). La población bacteriana como la observada con la lixiviación a 5 gramos Fe(II)/litro, consistente principalmente de *T. ferrooxidans* es lo más probable de encontrar en planta. Sin embargo, las condiciones tan diferentes que prevalecen en las plantas de producción con respecto a nuestras condiciones experimentales; en temperatura, sales disueltas y otros posibles compuestos tales como los que se pueden arrastrar luego del tratamiento de extracción por solvente, podría sin embargo, seleccionar una población bacteriana muy diferente. Otro factor importante que contribuye a determinar la composición final de la población bacteriana en experimentos y plantas es la colonización resultante del inóculo natural o controlado. Por estas razones no es posible llegar a conclusiones generales con respecto a la composición de la población bacteriana y nuestros resultados deberían ser considerados válidos solo para nuestras condiciones particulares. Por ello, se haría

necesario determinar la población bacteriana en cada proceso industrial en particular.

Por otra parte, al cultivar en medio sintético con Fe(II) las muestras obtenidas a partir de las columnas experimentales o de una planta industrial de lixiviación, se observó una fuerte selección de la población.

Las bacterias seleccionadas fueron caracterizadas genotípicamente, por el tamaño de las regiones espaciadoras y por secuenciamiento directo del gen del ARNr 16S obtenido a partir de la amplificación por PCR.

Nuestros resultados indicaron que bacterias que conforman una proporción minoritaria de la población, pueden llegar a ser prevalentes luego de cultivarlas en un medio suplementado con Fe(II). Por otro lado, el cultivo en un medio que contiene el mismo mineral como fuente de energía, parece permitir el crecimiento de la mayoría de las bacterias observadas en la muestra original.

El cultivo en Fe(II), seleccionó de acuerdo a varios parámetros, bacterias clasificadas como *T. ferrooxidans*, ésto incluyó el análisis de la secuencia nucleotídica del gen del ARNr 16S y varias características fenotípicas. La selección de los aislados de *T. ferrooxidans* a partir de una muestra en la cual originalmente no se detectaban, ya que las bacterias prevalentes eran *T. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*, muestra claramente el efecto altamente selectivo del cultivo. La ausencia de crecimiento de *L. ferrooxidans* en el cultivo con

Fe(II) es difícil de explicar. Sin embargo, esta observación sugiere que en condiciones de biolixiviación las bacterias de este grupo pueden ser más comunes de lo que ha sido estimado por análisis en cultivo.

Un bajo valor de  $K_s$  para el Fe(II), junto con la inhibición del crecimiento a altas concentraciones de Fe(II), como las empleadas para el cultivo, explicaría la prevalencia de *L. ferrooxidans* a bajas concentraciones de Fe(II) y su desaparición luego del cultivo. Norris y colaboradores (42) han informado un valor de  $K_s$  para Fe(II) en *Leptospirillum* spp., bastante menor que el de *T. ferrooxidans*.

La heterogeneidad genética de *T. ferrooxidans* ha sido descrita previamente (19,21,22,24,35), aunque los resultados obtenidos por hibridación de ADN merecen serios reparos por la metodología utilizada. La determinación del polimorfismo de las regiones espaciadoras intergénicas entre los ARNr 16S y 23S de distintos aislados de *T. ferrooxidans*, también ha permitido determinar la existencia de variabilidad genética dentro de esta especie, que podría traducirse en importantes diferencias fenotípicas entre las cepas y quizás también en su actividad lixivante. Estas potenciales diferencias fenotípicas pueden haber pasado desapercibidas, debido al escaso número de propiedades fisiológicas usadas para describir estas bacterias litotróficas.

El aislamiento de OP1, OP4 y PA-15, aumenta aún más la heterogeneidad genética de esta especie. Las cepas OP1 y

OP4, que contienen una región espaciadora más grande que todos los aislados de *T. ferrooxidans* analizados y que fueron incapaces de formar colonias en un medio sólido de agarosa, podrían tener propiedades fenotípicas particulares. De hecho, estos dos aislados no habrían sido detectados por plaqueo o bien, esta incapacidad para formar colonias podría haber desalentado estudios adicionales. Ambos aislados sin embargo, son aparentemente muy similares por análisis de la secuencia del ARNr 16S, a otros aislados ya descritos, encontrados en regiones muy distantes.

Particularmente interesante parecen aquellas bacterias capaces de crecer en minerales pero no en Fe(II). La metodología descrita nos permite seguir su crecimiento y posteriormente diseñar condiciones de cultivo apropiadas para su aislamiento y caracterización.

### 3. Implicancia de los resultados en la lixiviación industrial.

Los resultados obtenidos indican que en el mineral lixiviado, además de *T. ferrooxidans*, se detecta la presencia de otras bacterias creciendo en el mineral, las cuales podrían ser tan o más importantes que *T. ferrooxidans* en la biolixiviación de cobre a partir de sulfuros secundarios, ya que en condiciones de bajas concentraciones de Fe(II) en la solución lixivante, pese a mantenerse los mismos porcentajes de recuperación de cobre, las bacterias prevalentes bajo



estas condiciones fueron *T. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*.

Otra conclusión que emerge de este trabajo, utilizando las regiones espaciadoras para detectar a la bacterias presentes en el sistema, es la heterogeneidad genotípica de los aislados de *T. ferrooxidans* detectados en los sistemas de biolixiviación, confirmando los estudios llevados a cabo por hibridación de ADN y por similitud de secuencia del ARNr 16S, que ya habían dado cuenta de la existencia de heterogeneidad genotípica entre distintos aislados de los cuales se disponía en ese momento (21,22,24,35).

En las columnas de mineral regadas con la solución lixiviante, suplementada con 5 g/l de Fe(II), se encontró que una de las variedades de *T. ferrooxidans* que crecía unido al mineral, tenía una región espaciadora que daba un amplificado del mismo tamaño que las cepas del grupo 3a según la clasificación de Harrison y colaboradores (21,24). Las bacterias pertenecientes a este grupo, son las bacterias que se utilizan preferentemente en los estudios de laboratorio, ya que crecen eficientemente en medio líquido; son fácilmente aisladas en medio sólido, formando grandes colonias en agarosa, etc. Dentro de este grupo, tenemos por ejemplo, a la cepa ATCC 19859, ampliamente utilizada en los trabajos publicados en la literatura internacional.

La otra variedad de *T. ferrooxidans* que crece asociado al mineral lixiviado con 5 g/l de Fe(II) y que resulta ser el único detectado en el mineral lixiviado con 1 g/l de Fe(II),

denominado por nosotros PA-15 luego de clonarlo por 3 plaques consecutivos en un medio sólido con agarosa, presenta un amplificado de la región espaciadora 10 pb más pequeño que la que presentan algunas cepas del grupo 3a. Además, al secuenciar su ARNr 16S, se determinó que pertenecería al grupo 4 de hibridación de ADN, ya que PA-15 comparte identidad de secuencia con Ph en la región discriminadora del ARNr 16S, reportada por Goebel & Stackebrandt (19) . Esto se vió apoyado por el hecho de que este *T. ferrooxidans*, presenta ciertas características fenotípicas distintas a las compartidas por los *T. ferrooxidans* del grupo 3a, que podrían ser indicadores de diferencias fenotípicas importantes a nivel de la biolixiviación entre estas dos variedades de *T. ferrooxidans*, que podrían explicar el por qué se encuentra esta variedad de *T. ferrooxidans* y no el de la variedad 3a, bajo condiciones de menor concentración de Fe(II) en la solución lixivante. Así por ejemplo, el aislado PA-15 si bien es capaz de formar colonias en medio sólido, lo hace con menor eficiencia, las colonias formadas son más pequeñas y su cinética de formación de colonias es más lenta. Para conocer el por qué las distintas condiciones de lixivación determinan la prevalencia de distintas variedades de *T. ferrooxidans*, se hace imprescindible a futuro, conocer de mejor manera la fisiología de estas distintas variedades de *T. ferrooxidans*.

Al analizar los aislados de *T. ferrooxidans* presentes en

el efluente obtenido de la planta industrial luego de cultivarlos en un medio con Fe(II), se obtuvieron dos aislados, con los amplificadores de la región espaciadora de un tamaño mayor que los obtenidos para los aislados del grupo 3a. Al secuenciar el ARNr 16S de uno de estos aislados, el OP4, se obtuvo identidad de secuencia en la región discriminatoria (19) con el aislado Lp, un aislado de *T. ferrooxidans* clasificado por hibridación de ADN en el grupo 2. Este aislado también presenta características fenotípicas distintas a los *T. ferrooxidans* del grupo 3a, como es el hecho de no crecer en medio sólido, ni bajo altas concentraciones de Fe(II).

De acuerdo a lo observado, podría ocurrir que estas diferencias genotípicas y fenotípicas que se encuentran entre los distintos aislados de *T. ferrooxidans*, podrían traducirse en diferencias en sus capacidades lixiviantes. Si así fuera, distintas condiciones de producción, como podría ser por ejemplo, diferentes concentraciones de Fe(II) en la solución lixiviante, permitirían el crecimiento de algunas de estas variedades y no de otras, sin que necesariamente las variedades que puedan crecer sean las que lixivien más eficientemente el mineral. Ya que es posible que bajo otras condiciones del medio lixiviante, crezcan otras variedades de *T. ferrooxidans* que van a ser capaces de lixiviar más eficientemente el mineral. Todo esto implica, que no solamente es importante saber qué especie bacteriana es la

prevalente en un sistema determinado, sino que también dentro de una especie, qué variedad es la que se encuentra presente. Esto es así al menos en el caso de *T. ferrooxidans*, ya que es una especie que agrupa a cepas muy diversas, tanto desde el punto de vista genotípico como fenotípico, constituyendo un taxón muy poco coherente.

Todos estos resultados nos llevan a pensar que si bien todas las bacterias presentes en el sistema de lixiviación, están adaptadas a crecer y multiplicarse bajo condiciones generales similares, tales como acidez, temperatura, presencia de metales pesados, etc; los distintos aislados de *T. ferrooxidans* y de otras especies bacterianas deben presentar ciertas diferencias fenotípicas entre ellos, que explicarían la prevalencia de un tipo particular dependiendo de las características del sistema lixiviente. Estas diferencias eventualmente podrían ser muy importantes para el proceso de biolixiviación, ya que dependiendo de las condiciones del sistema (tipo de mineral, fuente de energía, concentración de sales, etc), va a ser la especie y la variedad intraespecie que van a ser capaz de lixiviar el mineral, lo que podría determinar condiciones de manejo del proceso muy diferentes a las establecidas tradicionalmente.

Por otra parte, si las condiciones de lixiviación se mantuvieran constantes, como lo que ocurre en las columnas experimentales, se debiera esperar la selección de una variedad particular de *T. ferrooxidans*, situación que se da

por ejemplo al lixiviar el mineral con una solución no suplementada con Fe(II), en que no se detecta el *T. ferrooxidans* del grupo 3a y sólo creció el del grupo 2, lo que además arroja interrogantes sobre el potencial lixiviante de los *T. ferrooxidans* del grupo 3a, en ausencia de Fe(II) en la solución lixiviante.

Los resultados obtenidos indican que no basta con estudiar y conocer la fisiología y el crecimiento de *T. ferrooxidans* como un microorganismo independiente, ya que el crecimiento de esta bacteria sobre el mineral lixiviado, en condiciones naturales como las probadas en este trabajo, no depende sólo de sus características individuales potenciales, sino de las condiciones particulares del ecosistema en el cual se encuentre. Así por ejemplo, no es suficiente que *T. ferrooxidans* tenga un sustrato sólido, que le sirva de fuente de energía, para que la bacteria prolifere, sino que para que ello ocurra, dependerá de las condiciones físicas y químicas del medio lixiviante, pese a tener el potencial de que así sea. Por ello es que si bien, en nuestra experiencia, hubo sulfuros presentes en el mineral en todas las situaciones probadas, sólo en presencia de Fe(II) soluble la población de *T. ferrooxidans* se hizo prevalente.

Ahora sabemos, que si bien *T. ferrooxidans* es una bacteria importante en el sistema de lixiviación, no es la única, y bajo ciertas condiciones de lixiviación, al menos en prevalencia, no es la más importante. Esto debiera cambiar el

enfoque de los estudios que se llevan cabo en la optimización de los procesos industriales que utilizan la biolixiviación para la solubilización del cobre unido a sulfuros, abriendo un campo enorme en el estudio de la microbiología de un sistema lixivante.

Esto es así, porque hasta el momento, al suponerse que *T. ferrooxidans* era si no la única, la bacteria más importante que se encontraba presente en un sistema de biolixiviación, la mayoría de los estudios microbiológicos, bioquímicos, de simulación de modelos, de optimización de condiciones en las plantas industriales, etc, se llevan cabo utilizando a *T. ferrooxidans* como el sistema a optimizar.

En esta tesis se ha demostrado que la composición de la población bacteriana presente en un mineral lixiviado, va a ser dependiente de las condiciones del sistema de biolixiviación y por lo tanto dependiendo de las condiciones de operación de una planta, podría ser la especie o la variedad intraespecie prevalente.

Esto significa que no es posible definir la existencia de una población bacteriana tipo para todos los sistemas de biolixiviación. El tipo y composición del mineral a lixiviar, la población bacteriana presente en el inóculo inicial, la concentración de sales en la solución de lixivación, entre otras variables del proceso, van a determinar una población bacteriana particular para cada proceso de biolixiviación. Por lo tanto, como un proceso de

biolixiviación eficiente pasa necesariamente por la optimización del crecimiento de la población bacteriana en el mineral, es imprescindible como paso previo, la determinación de la población bacteriana que crece en el sistema de biolixiviación y los cambios que ésta experimenta frente a nuevas condiciones del medio lixivante, lo que podría determinar nuevas condiciones del proceso de acuerdo a la nueva composición de la población.

Controlar la población presente en un sistema de biolixiviación es difícil, ya que hay variables del sistema que no pueden controlarse o que son difíciles de hacerlo, como puede ser el tipo de mineral, la temperatura ambiental, concentración de sales de la solución lixivante, etc., pero indudablemente hay variables que sí pueden ser reguladas externamente y que podrían servir para controlar a la población existente en el sistema de biolixiviación, como podría ser la presencia de una fuente de energía soluble, bacterias presentes en el inóculo, pH de la solución lixivante, etc. El punto es que controlar la población de un sistema de biolixiviación, necesita de un conocimiento profundo del sistema, tanto desde el punto de vista de las bacterias importantes para el proceso, como de las variables del medio que van a optimizar el crecimiento de estas bacterias.

La técnica de amplificación de las regiones espaciadoras entre los genes de los ARNr 16S y 23S, útil en la detección

de las bacterias presentes en el sistema de biolixiviación, es el primer paso a este respecto. Posteriormente deben venir otros, tales como: a) encontrar las condiciones que permitan cultivar in vitro a las distintas bacterias del sistema, b) caracterizar fisiológicamente las distintas bacterias aisladas, con énfasis en aquellas características importantes en biolixiviación, c) determinar la(s) bacteria(s) que lixivien eficientemente un determinado mineral y las condiciones en las cuales esto ocurre y, d) desarrollar un proceso industrial que permita controlar eficientemente los parámetros más importantes del proceso, etapa en la cual, el control de la población sería determinante en la obtención de un proceso eficiente.

Finalmente, es pertinente recordar que si bien en este trabajo se encontraron cierto tipo de bacterias, que eventualmente serían importantes en el proceso de biolixiviación de cobre, podrían existir muchas más. De acuerdo al diseño de este trabajo, los únicos microorganismos capaces de ser detectados, son las eubacterias, ya que los partidores utilizados en la detección de las regiones espaciadoras tienen esta especificidad. No podemos descartar *a priori* la presencia de otros tipos de microorganismos, como por ejemplo de arqueae, las cuales no sólo se encuentran en situaciones extremas (solfataras, geisers, etc), como se pensaba hasta no hace mucho, sino que son muy abundantes también en ambientes más tradicionales, como por ejemplo en



los océanos de nuestro planeta (11). También, por raro que ello parezca, microorganismos, como los hongos, se detectaron en gran número en las soluciones efluentes, con pHs cercanos a 1,0. Aunque es difícil de imaginar hongos creciendo en un sistema como éste, pensando en las fuentes de carbono y nitrógeno que estarían utilizando.

### CONCLUSIONES

- La adsorción irreversible inicial de *T. ferrooxidans* al azufre, en condiciones en las cuales este sustrato constituye su única fuente de energía, es de tipo no covalente, hidrofóbica y no requiere de un metabolismo bacteriano activo para establecerse.
- La posición relativa de la superficie de azufre con respecto a la fuerza de gravedad influye en la adsorción de *T. ferrooxidans*.
- Las bacterias que crecen sobre el azufre se encuentran unidas apicalmente a la superficie, formando una monocapa.
- Las bacterias que crecen en zonas de la superficie que enfrentan la fuerza de gravedad y que se hayan protegidas del flujo de líquido percolante (grietas), se van a acumular pero sin llegar a formar un biofilm.
- La mayor parte de las bacterias que se encuentran creciendo en las columnas de lixiviación están firmemente unidas al mineral lixiviado.
- La metodología descrita, basada en el método de Jensen y

colaboradores, si bien no permite una identificación definitiva de las especies bacterianas, debido a la heterogeneidad de tamaño de las regiones espaciadoras, con algunas de igual tamaño para *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*, permite seguir los cambios en la complejidad de la población bacteriana que crece en los sistemas de biolixiviación y durante el cultivo en el laboratorio.

- Las especies bacterianas prevalentes en un proceso de biolixiviación, dependen fuertemente de las condiciones físicas y químicas del sistema de lixiviación. Así por ejemplo, el crecimiento de *T. ferrooxidans* en el mineral lixiviado, no va a depender sólo de sus características como especie individual, sino de las condiciones particulares que tenga el sistema de biolixiviación en el cual se encuentre.

- A bajas concentraciones de Fe(II) (<0,5 g/l) en la solución lixivante, las especies prevalentes en el sistema de lixiviación de columnas experimentales fueron *T. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*. Estas dos especies podrían en conjunto lixiviar eficientemente.

- A altas concentraciones de Fe(II) (>0,5 g/l) en la solución lixivante, las cepas de *T. ferrooxidans* son las bacterias prevalentes en el sistema de lixiviación constituido por nuestras columnas experimentales.

- El cultivo de las bacterias del sistema de biolixiviación en medios de cultivo sintéticos, lleva a la selección de la población bacteriana originalmente presente en el inóculo, lo que indica la incapacidad del cultivo para definir la composición original de la población de un sistema de biolixiviación.

- Al crecer mineral o efluentes de las soluciones de lixiviación de las columnas experimentales o de la planta industrial de la mina de Lo Aguirre, en medios de cultivo con Fe(II), se demostró una fuerte selección, de acuerdo a varios parámetros, de bacterias clasificadas como *T. ferrooxidans* (PA15, OP1 y OP4), probablemente pertenecientes a los grupos de hibridación de ADN 2 y 4, con algunas características fenotípicas distintas a las cepas tradicionales del grupo de hibridación de ADN 3a, los más estudiados en los laboratorios, lo que da cuenta de una alta heterogeneidad intraespecie entre los aislados de *T. ferrooxidans* presentes en los sistemas de biolixiviación.

- Al crecer mineral o efluentes de las soluciones de lixiviación de las columnas experimentales, en medios de cultivo que contienen el mismo mineral como fuente de energía, se obtiene el crecimiento de la mayoría de las bacterias observadas en la muestra original, lo que no ocurre cuando la fuente de energía es Fe(II), en que los

aislados bacterianos detectados pertenecen a la especie *T. ferrooxidans*, lo que da cuenta de la importancia de la fuente de energía disponible en la composición de la población.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) 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.
- (2) Bagdigian, R.M. & Myerson, A.S. 1986. The adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on coal surfaces. *Biotech. & Bioeng.* 28: 467-479.
- (3) Bärtels, C., Chatzitheodorou, G., Rodríguez-Leiva, M., Tributtsch, H. 1989. Novel technique for investigation and quantification of bacterial leaching by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotech. & Bioeng.* 33: 1196-1204.
- (4) Bennet, J.C., Tributtsch, H. 1978. Bacterial leaching patterns on pyrite crystal surfaces. *J. Bacteriol.* 134(1): 310-317.
- (5) Bhavaraju, S., Modak, J., Kumar, R., Gandhi, K. 1993. Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. *Biotech. & Bioeng.* 41: 612-616.
- (6) Birnie, G.D., Fox, S.M., Harvey, D.R. Separation of polysomes, ribosomes and ribosomal subunits by rate-zonal centrifugation. In subcellular components, preparation and fractionation. 1969. Birnie, G.D. & Fox, S.M., ed. Plenum Press, New York.
- (7) 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.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, J.J., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 435-464.
- (11) DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine

environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5685-5689.

(12) Devasia, P., Natarajan, K.A., Sathyanarayana, D.N., Ramananda Rao, G. 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. Appl. & Environ. Microbiol. 59(12): 4051-4055.

(13) DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Catalogue of strains 1989. Fourth Edition, Braunschweig, Germany, 1989.

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

(15) 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.

(16) 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.

(17) Geesey, G.G., White, D.C. 1990. Determination of bacterial growth and activity at solid-liquid interfaces. Annu. Rev. Microbiol. 44: 579-602.

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

(19) 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.

(20) 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.

(21) 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.

(22) Harrison, A.P., Jr. 1984. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat.

Annu. Rev. Microbiol. 38: 265-292.

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

(24) 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.

(25) 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.

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

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

(28) Jang, L.K. & Yen, T.F. A theoretical model of diffusion of motile and nonmotile bacteria toward solid surfaces. In Microbes and oil recovery, vol. 1, Int. Bioresources, Zajic & Donaldson (eds.), 1985, p. 226-246. Citado en Biofilms, (Eds.) Characklis W.G. & Marshall, K.C. Chapter 9. Transport and interfacial transfer phenomena., 1990, p. 265-340.

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

(30) 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.

(31) Karamanev, D.G. & Nikolov, L.N. 1988. Influence of some physicochemical parameters on bacterial activity of biofilm: ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. & Bioeng. 31: 295-299.

(32) Kostman, J.R., Edlind, T.D., Lipuma, J.J., Stull, T.L. 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. J. Clin. Microbiol. 30: 2084-2087.

(33) Laishley, E.J., Bryant, R., Kobryn, B.W., Hyne, J.B. 1986. Microcrystalline structure and surface area of



elemental sulphur as factors influencing its oxidation by *Thiobacillus albertis*. Can. J. Microbiol. 32: 237-242.

(34) 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.

(35) 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.

(36) 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.

(37) van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B. 1989. Bacterial adhesion: A physicochemical approach. Microb. Ecol. 17: 1-15.

(38) van Loosdrecht, M.C.M. & Zehnder, A.J.B. 1990. Energetics of bacterial adhesion. Experientia. 46: 817-822.

(39) 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.

(40) Myerson, A.S. & Kline P. 1983. The adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid particles. Biotech. & Bioeng. 25: 1669-1676.

(41) Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., Sugino, Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucleic Acids Res. 18: 616.

(42) Norris P.R., Barr, D.W., Hinson, D. Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite. In *Biohydrometallurgy*, Norris, P.R. & Kelly, D.P. (ed.), Science and Technology Letters, Kew, Surrey, United Kingdom, 1988, p. 43-59. Cited in: Pronk, J.P. & Johnson, D.B. 1992. Oxidation and reduction of iron by acidophilic bacteria. Geomicrobiol. J. 10: 153-171.

(43) Ohmura, N., Kitamura, K., Saiki, H. 1993. Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. Appl. & Environ. Microbiol. 59(12): 4044-4050.

(44) Paul, J.H. & Jeffrey, W.H. 1985. Evidence for separate

adhesion mechanisms for hydrophilic and hydrophobic surfaces in *Vibrio proteolytica*. Appl. & Environ. Microbiol. 50(2): 431-437.

(45) 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.

(46) Rawlings D.E. & Kusano, T. 1994. Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. Microbiol. Rev. 58(1): 39-55.

(47) Rodríguez-Leiva, M. & Tributsch, H. 1988. Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite. Arch. Microbiol. 149: 401-405.

(48) Rossi, G. In Biohydrometallurgy, Rossi, G. (ed.) , McGraw-Hill, Hamburg, 1990.

(49) 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.

(50) Salazar, O., Takamiya, M., Orellana, O. 1989. Characterization of the two rRNA gene operons present in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEBS Lett. 242: 439-443.

(51) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

(52) Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C. 1992. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. Appl. Environ. Microbiol. 58: 85-91.

(53) 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.

(54) Schrader, J.A. & Holmes, D.S. 1988. Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 170: 4115-4123.

(55) 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.

(56) Turakhia, M.H., Characklis, W.G. 1989. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: Effect of calcium. Biotechnol. & Bioeng. 33: 406-414.

- (57) Vaituzi, Z. & Doetsch, R.N. 1969. Appl. Environ. Microbiol. 17: 584-588. Citado en Biofilms, (Eds.) Characklis W.G. & Marshall, K.C. Chapter 9. Transport and interfacial transfer phenomena., 1990, p. 265-340.
- (58) Vargas, T., Sanhueza, A., Escobar, B. Electrochemical studies on the bacterial leaching of pyrite with *Thiobacillus ferrooxidans*. EPD Congress 1992. Ed. J.P. Hager. The Minerals, Metals & Materials Society, 1991. pp. 273-284.
- (59) Venegas, A., Hevia, E., Sánchez, H. 1988. Sequence of two tRNA genes from a *Thiobacillus ferrooxidans* ribosomal operon. Nucleic Acid Res. 16: 8179-8184.
- (60) 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.
- (61) 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.
- (62) Woese, C. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221-271.
- (63) Yates, J.R., Holmes, D.S. 1987. Two families of repeated sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 169: 1861-1870.
- (64) Yeh, T.Y., Godshalk, J.R., Olson, G.J., Kelly, R.M. 1987. Use of epifluorescence microscopy for characterizing the activity of *Thiobacillus ferrooxidans* on iron pyrite. Biotech. & Bioeng. 30: 138-146.
- (65) Zobell, C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. 46: 39-43.