



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
ACIDÓFILAS DE LAS ZONAS MINERAS PORTOVELO –
BELLA RICA - SAN GERARDO”**

Tesis previa a la obtención del título de:

Bioquímico-Farmacéutico

Autor:

Alexandra Guadalupe Benítez Guarnizo

Director:

Dr. Juan Pablo Suárez Chacón

Codirector:

Ing. Francisco Patricio Gordillo Espinosa

Loja – Ecuador

2009

CERTIFICACIÓN

Dr.
Juan Pablo Suárez Chacón.
DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que una vez revisado el trabajo de investigación realizado por Alexandra Guadalupe Benítez Guarnizo, previo a la obtención del título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO, se autoriza su presentación final para la evaluación correspondiente.

Loja, enero del 2009.

.....
Dr. Juan Pablo Suárez Chacón.
DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodologías, recursos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de absoluta responsabilidad de su autor.

Alexandra Guadalupe Benítez Guarnizo

DEDICATORIA

Con gran amor y cariño le dedico:

A mis padres Flora y Carlos; quienes con sus sacrificios y esfuerzos me han brindado una preparación personal y profesional con sabios consejos y valores inculcados, dándome su apoyo constante y la confianza depositada en mí en cada momento de mi vida.

A mis hermanos Mónica, Juan Carlos y Gustavo; los cuales me han brindado su compañía y comprensión a lo largo de mi carrera profesional.

Alexandra Guadalupe Benítez Guarnizo

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero agradecimiento a:

Dios por la vida y la sabiduría que me ha brindado en cada momento de alegría y tristeza, por permitirme llegar a culminar con uno de mis sueños que forma parte de mi formación profesional.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, por permitirme vivir una gran experiencia profesional y humana, brindándome la oportunidad de realizar esta investigación en el Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM), adquiriendo conocimientos, destrezas y experiencias que ayudarán al avance de mi carrera profesional.

Agradezco a quienes forman parte del Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) por la colaboración desinteresada durante el desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Juan Pablo Suárez Chacón por la predisposición, sugerencias y apoyo como director de tesis; al Ing. Francisco Gordillo por sus sabios conocimientos que han contribuido al desarrollo de esta labor y de manera muy especial al Bq. Paulo Herrera por su ayuda y apoyo incondicional durante todo el trascurso de mi trabajo, por su asesoramiento y valiosos consejos en todo el proceso de esta investigación.

Finalmente agradezco a mis amigos, compañeros y a todas las personas que de distintas maneras hicieron posible la realización de esta labor y han contribuido a que culminase con mi carrera profesional.

Alexandra Guadalupe Benítez Guarnizo

CONTRATO DE CESIÓN DE DERECHO DE TESIS

Yo, Alexandra Guadalupe Benítez Guarnizo declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

.....
Alexandra Guadalupe
Benítez Guarnizo

TESISTA

.....
Dr. Juan Pablo
Suárez Chacón

DIRECTOR DE TESIS

INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
• Descripción del género <i>Acidithiobacillus</i>	7
• Descripción de <i>Acidithiobacillus</i> <i>ferrooxidans</i>	8
• Mecanismos de Acción Bacteriana.....	9
• Oxidación de Hierro (II)...	10
• Técnicas Moleculares.....	11
• PCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa	12
• Secuenciación del Material Genético.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
• Procedencia de las cepas Bacterianas.....	17
• Medio de Cultivo.....	17
• Determinación de la Concentración Celular: Conteo de Células en cámara de Neubauer.....	18
• Determinación de Fe^{+2} y del Hierro Total.....	19

• Técnicas Moleculares de Identificación: Extracción de ADN, PCR, Purificación, Secuenciación de ADN y Análisis Filogenético.....	20
5. RESULTADOS.....	23
• Determinación de la Concentración Celular..... • Determinación de Fe^{+2} y del Hierro Total..... • Técnicas Moleculares de Identificación: Extracción de ADN, PCR, Purificación, Secuenciación de ADN y Análisis Filogenético.....	23 25 27
6. DISCUSIÓN.....	31
• Determinación de la Concentración Celular..... • Determinación de Fe^{+2} y del Hierro Total..... • Técnicas Moleculares de Identificación: Extracción de ADN, PCR, Purificación, Secuenciación de ADN y Análisis Filogenético..... • Conclusiones.....	31 32 33 36
7. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	37

RESUMEN:

La biotecnología aplicada a la actividad minero metalúrgica se ha convertido en una alternativa viable para la extracción de los valores presentes en las minas, así como para la recuperación de metales presentes en soluciones acuosas contaminantes disminuyendo el impacto negativo causado por los subproductos de las operaciones mineras, pero las interacciones de los organismos involucrados son poco conocidas. La identificación de bacterias en soluciones de bio-lixiviación, ha sido realizada mediante la técnica de cultivo la cual nos permite obtener un crecimiento entre las más importantes especies de bacterias hierro-oxidantes como *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El objetivo de este proyecto es caracterizar las especies bacterianas aisladas de drenajes ácidos de tres zonas mineras de la Provincia El Oro, (Portovelo), de la Provincia del Azuay (Bella Rica y San Gerardo) al sur del Ecuador.

El muestreo se realizó en agua y rocas, hábitat principal de las bacterias que participan en el proceso de biolixiviación. El aislamiento se realizó previa preparación de cada una de las muestras, las cuales se sembraron en el medio de cultivo líquido Norris, se incubaron por 7 siete días a 30° C, pH 1.8, 220 rpm. Se realizó el conteo de células en cámara de Neubauer a fin de determinar la concentración celular, y de analizar la cinética de crecimiento. También se efectuó las mediciones de oxidación de ión ferroso a ión férrico en donde las tres cepas bacterianas tienen una capacidad de oxidación

del Hierro (II) muy semejante y agotan el sustrato aproximadamente a las 21 horas. La amplificación del ADN bacteriano se realizó mediante PCR, utilizando la combinación de primers universales bacterianos 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3).

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron concluir que en estas tres zonas mineras está presente *Acidithiobacillus*. La comparación de las secuencias de 16S rRNA nos permitieron establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos aislados con las secuencias más cercanas obtenidas en BLAST. El análisis mediante BIONJ muestra que las cepas aisladas están agrupadas en un solo clado de la especie de *Acidithiobacillus ferrooxidans* respaldado con una alta confiabilidad de acuerdo al análisis bootstrap.

Palabras Claves: Biotecnología, biominería, biolixiviación, bacterias acidófilas, 16S rRNA.

ABSTRACT:

The biotechnology applied to the mining metallurgic activity has become available alternative for the extraction of values in mines, as well as for recovery of metal presented in aqueous contaminants, reducing the negative impact caused by the subproducts of mining of operations, but the interactions of the related organisms are not well known. The identified bacteria in bioleaching solutions have been accomplished using the culture technique which allows to obtain a growth among the most important species of iron – oxidant bacteria as *Acidithiobacillus ferrooxidans*. The objective of this project is to characterize the bacterial species isolated in waste water of 3 mining areas in the province El Oro (Portovelo), in the province of Azuay (Bella Rica and San Gerardo) south of Ecuador.

The sampling was realized in water and rocks the main habitat of the bacteria, which participate in the bioleaching process. The isolation was realized after a previous preparation of each one of the samples which were cultivated in the liquid culture medium Norris, incubated by seven days at 30°C, pH 1.8, 220 rpm. The direct cell counting was made in the Neubauer camera to determine the cell concentration and to analyze the kinetic growth. Also was realized the measurements of oxidation of ferrous ions to ferric – ions in which 3 bacterial stocks have a very similar oxidations capacity of Iron II, and they emptied the substrate at 21 hours

approximately. The amplification of bacterial DNA was performed through PCR using a combination of universal bacterial primers 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') and 1492R (5'- GGTTACCTGTTACGACTT – 3').

The results obtain in these study, allow us to conclude in these three mining areas is the *Acidithiobacillus*. The comparison of the sequences of 16S and rRNA allowed to stablish the phylogenetics relationships among the isolated organisms with the closest sequences obtained in BLAST. The analysis through BIONJ shows the isolated stocks are grouped into a single clade in the *Acidithiobacillus ferrooxidans* species, based on a high reliability: according to the bootstrap analysis.

Key Words: Biotechnology, biomining, Biolixiviation, *Acidithiobacillus* bacteria, 16S rRNA.

INTRODUCCIÓN

La bio-oxidación es una técnica que se puede utilizar como un tratamiento viable antes de la cianuración para mejorar la recuperación de oro (Canales *et al.* 2002) y la extracción de otros metales (Solisio *et al.* 2002). Esta oxidación es catalizada principalmente por microorganismos acidófilos autótrofos que crecen bajo condiciones drásticas de pH y concentración de metales disueltos (Rossi 1990) característicos de puntos de oxidación de sulfuros en minas; y además, son los principales responsables de la generación de drenajes ácidos (Johnson y Hallberg 2003).

Este proceso es una alternativa para disminuir la contaminación ambiental generada por el empleo de sustancias químicas cuando se extraen metales pesados en la industria minera; así como, para reducir los costos en materiales químicos, empleando microorganismos biolixiviadores. Uno de los problemas ambientales mayormente asociado con las explotaciones mineras es la generación de drenajes líquidos de alta acidez; como consecuencia de este pH algunos metales pesados (hierro, cobre, zinc, aluminio, manganeso) se solubilizan en el agua (Corrales *et al.* 2006).

La Lixiviación Bacteriana, también conocida como Biolixiviación, Biohidro-metalurgia o Biooxidación de Sulfuros, puede ser definida como un proceso natural de disolución que

resulta de la acción de un grupo de bacterias (principalmente del género *Acidithiobacillus*) con habilidad de oxidar minerales sulfurados, permitiendo la liberación de los valores metálicos contenidos en ellos (Guerrero 2004).

Dentro de los minerales que pueden ser tratados por lixiviación bacteriana tenemos: calcopirita, pirita, covelita, sulfuros de Zn, Pb, etc. (Alpaca 1998). Por mucho tiempo, se pensó que la disolución o lixiviación de metales era un proceso netamente químico, mediado por agua y oxígeno atmosférico. El descubrimiento de bacterias acidófilas ferro y sulfo-oxidantes ha sido primordial en la definición de la lixiviación como un proceso catalizado biológicamente (Guerrero 2004). Gran parte de los minerales refractarios de oro no son utilizados, debido al alto costo que implican los pretratamientos convencionales para extraer el metal desde ellos. Surge entonces, como una alternativa válida, de bajo costo y no contaminante el pretratamiento con bacterias biooxidantes como *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Los microorganismos que actúan en estos procesos son fundamentalmente bacterias de diversos géneros y especies. Las especies más comúnmente aisladas de medioambientes inorgánicos, con un alto contenido de metales y bajos pH, son *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, y más recientemente *Acidithiobacillus caldus*. Por otro lado, en ambientes similares se encuentran una variedad de acidófilos heterótrofos tales como los

pertenecientes al género *Acidiphilium*, *Acidocella* y "*Ferromicrobium*". Además de aquellos microorganismos esencialmente mesófilos (*A. ferrooxidans*; *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*) o moderadamente termófilos (*A. caldus*), con temperaturas óptimas de crecimiento de 20-40 °C y 40-60 °C respectivamente, se han aislado en ambientes geotermales termófilos extremos, cuyas temperaturas óptimas superan los 60 °C, microorganismos tales como *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus metallicus* y *Acidianus brierleyi* (Chiacchiarini 2003).

El objetivo de este proyecto fue caracterizar las especies bacterianas acidófilas y mesófilas *Acidithiobacillus* aisladas de drenajes ácidos de tres zonas mineras de la Provincia El Oro, (Portovelo), de la Provincia del Azuay (Bella Rica y San Gerardo) al sur del Ecuador, mediante secuenciación del RNAr 16S por amplificación por PCR, comparándolas con las cepas obtenidas de la American Type Cell Culture (ATCC).

Descripción del Género *Acidithiobacillus*

Acidófilo obligado (pH óptimo <4) y aerobio, Gram-negativo con forma de bastón, móvil con uno o más flagelos, utiliza compuestos reducidos de azufre para soportar su crecimiento autotrófico. Algunas especies oxidan el hierro ferroso o utilizan sulfuros metálicos sintéticos para la generación de energía; algunas especies oxidan el hidrógeno. La temperatura óptima de crecimiento para las especies mesófilas es de 28-35°C, y para las moderadas termófilas es de

45°C. El contenido de G+C del DNA es de 52-64%. Son miembros de la subclase γ de la Proteobacteria (Chiacchiarini 2003).

Descripción de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Esta bacteria fue aislada por primera vez en 1947 por Colmer y Hinkle de un drenaje ácido de minas (Cabrera 2005). Es un microorganismo aerobio, mesófilo, acidófilo, quimioautótrofo, Gram (-) y flagelado (Frias 2000). Es el microorganismo más estudiado dentro de la biohidrometalurgia ya que fue considerado por muchos años como el principal responsable de la biolixiviación. Su tamaño es de 0,3-0,5 x 1,0-1,8 μm . Es quimiolitótrofo obligado, puede utilizar la oxidación de hierro ferroso como fuente de energía y los siguientes sustratos oxidables: S^0 , S^{-2} , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$, UO_2^{+2} , $\text{S}_4\text{O}_6^{-2}$, Cu^+ , Se^{-2} , Mo^{+5} . Utiliza oxígeno como aceptor final de electrones, aunque también puede utilizar hierro (III) como aceptor final de electrones y a partir de su reducción tomar la energía suficiente para desarrollarse en condiciones anaeróbicas. Estas bacterias se presentan sueltas o en pares, rara vez en cadenas. Cepas aisladas de distintos hábitats pueden presentar flagelo polar y/o varios pili por célula (Chiacchiarini 2003). Morfológicamente es muy similar a *A. thiooxidans* pero la principal característica que las diferencia es su capacidad para derivar la energía también de compuestos del ión ferroso, por lo que es una bacteria hierro-oxidante y esta capacidad la hace partícipe en los distintos mecanismos implicados en la lixiviación de minerales ya que regenera el férrico, que es un importante agente lixivante.

A. ferrooxidans además no es aerobio estricto, y es capaz de crecer anaerobiamente en sustratos de azufre bajo ciertas condiciones empleando Fe (III) como aceptor de electrones (Cabrera 2005).

Mecanismos de Acción Bacteriana

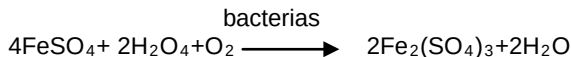
Desde el comienzo de los estudios sobre el proceso de disolución de sulfuros metálicos se han distinguido dos mecanismos de acción bacteriana: el directo y el indirecto, propuestos por primera vez por Silverman y Ehrlich en 1964. El mecanismo directo involucra la acción oxidante de bacterias adheridas a la superficie del sulfuro metálico por un sistema enzimático específico donde los electrones son transferidos desde los átomos de azufre del sulfuro o también como en el caso de Cu_2S desde el cobre (I) hasta el oxígeno para formar agua (Sand *et al.* 1999). En contraste el mecanismo indirecto implica la acción oxidante del hierro (II) sobre el sulfuro metálico. Durante esta reacción química se producen iones hierro (II) y, además, podría producirse azufre elemental u otro compuesto de azufre. Entonces estos compuestos son oxidados por acción biológica a iones hierro (III) y a sulfato. Este último mecanismo no requiere la adherencia bacteriana a la superficie del sulfuro (Chiacchiarini 2003).

Recientemente Sand y colaboradores (1999) han propuesto los mecanismos de Thiosulfato en donde el ión férrico ataca al mineral sulfuro mediante la extracción de un electrón reduciéndose a ferroso y obteniéndose

del mineral el catión metálico y compuestos de azufre intermedios solubles en agua. Las bacterias hierro-oxidantes *A. ferrooxidans* y *L. ferroxidans* catalizan el reciclado del ión férrico en condiciones ácidas, mientras que el mecanismo de Polisulfuros: en el caso de los sulfuros solubles en ácido la disolución se realiza por la acción combinada de la extracción de electrones por iones férricos y el ataque del protón. La unión metal sulfuro en el mineral puede ser rota por el ataque del protón, después de que dos protones se hayan unido se libera sulfuro de hidrógeno. A su vez el férrico puede oxidar el azufre del mineral liberando catión sulfuro que dimeriza espontáneamente a disulfuro (H_2S_2) y se oxida posteriormente, vía polisulfuro y radicales polisulfuro a azufre elemental (Cabrera 2005).

Oxidación de Hierro (II)

El *Acidithiobacillus* y el *Leptospirillum* son los únicos géneros capaces de oxidar el ión ferroso en una solución con ácido sulfúrico, por lo que juegan un rol importante en el tratamiento de las aguas de drenaje de las minas. El hierro (II) es el sustrato más fácilmente oxidable por *A. ferrooxidans*, por lo cual la oxidación de hierro (II) ha sido muy estudiada (Chiacchiarini 2003).



La oxidación biológica de Fe^{2+} a Fe^{3+} (que ocurre en la superficie externa de la pared celular) usando O_2 como aceptor externo de electrones (en el citoplasma), requiere de una

cadena de transporte de electrones. La primera proteína de la cadena de transporte se supone que es la Fe^{2+} - citocromo c oxidoreductasa codificada por el gen *ir*, que cataliza rápidamente la reducción del complejo proteico cyt c552 compuesto por tres citocromos (c552(s), c552 (m) y c550 (m)). Los electrones son transferidos a la rusticianina, una pequeña proteína soluble, sintetizada durante el crecimiento (16,5 kDa) que contiene un átomo de Cu por molécula. Es la única proteína soluble, sintetizada durante el crecimiento sobre hierro, presente en abundancia (5% del total de proteínas celulares) por lo cual es la más estudiada (Chiacchiarini 2003).

Técnicas Moleculares

Las técnicas moleculares basadas en la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos, han permitido por una parte, incrementar notoriamente la capacidad de detección de microorganismos, evitando generalmente los pasos de aislamiento y cultivo. Mientras que por otra, han refinado las posibilidades de identificación y tipificación para bacterias cultivadas (Ramírez 2000).

Dentro de la caracterización molecular de bacterias, la secuenciación y el análisis del gen 16S que codifica el ARN ribosómico (ARNr) es la técnica de identificación más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Lane *et al.* 1985). El ARNr 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 bp, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a

partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Rodicio y Mendoza 1999).

Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970. Los estudios de Woese originaron la división de los procariotas en dos grupos o reinos: Eubacteria y Archaeobacteria, cuya divergencia es tan profunda como la encontrada entre ellos y los eucariotas. Además, permitieron establecer las divisiones mayoritarias y subdivisiones dentro de ambos reinos. Posteriormente, Woese introdujo el término dominio para sustituir al reino como categoría taxonómica de rango superior, y distribuyó a los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea, Eukarya, el último de los cuales engloba a todos los seres eucariotas. Desde entonces, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio y Mendoza 1999).

PCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, es sin duda la técnica de amplificación más comúnmente utilizada. Originalmente descrita por Mullis & Faloona (1987), varias adaptaciones posteriores han permitido establecerla como una técnica de rutina en laboratorios clínicos,

forenses y de investigación. Con la utilización de PCR se puede generar una gran cantidad de copias (>107) de un fragmento diana de ADN, que está flanqueado por secuencias conocidas en cadenas opuestas (Ramírez 2000).

La técnica amplifica fragmentos específicos de DNA desde diminutas cantidades de material de una fuente de DNA, incluso cuando esa fuente de DNA es relativamente de baja calidad. La PCR amplifica una secuencia de DNA en grandes cantidades, usando una polimerasa estable al calentamiento y primers apropiados para dirigir la amplificación de la región de DNA deseada. Además involucra la preparación de la muestra de DNA y un master mix con primers (Herrera 2007). Básicamente se trata de una reacción enzimática que ocurre en un proceso cíclico de 3 pasos modulado por cambios de temperatura, requiriendo por lo tanto de un termociclador, aparato especializado que permite calentar o enfriar de manera rápida y precisa los tubos de reacción puestos en la placa térmica del aparato, que posee orificios con el tamaño y forma de los tubos de reacción. De los reactivos necesarios para PCR, un elemento central de la reacción es una ADN polimerasa termoestable, la más utilizada es la Taq polimerasa, obtenida originalmente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (Ramírez 2000).

Los pasos de PCR son todos llevados a cabo, uno después del otro, en períodos de ciclos. El primer paso denominado desnaturalización, ocurre a 94–96°C, a esta temperatura el ADN pierde su estructura de doble

cadena, desnaturalizándose a cadenas sencillas. En el segundo paso ocurre un acoplamiento (annealing) de los oligonucleótidos sintéticos denominados cebadores (primers), con los segmentos específicos de ADN que presentan la secuencia complementaria, la temperatura a la que ocurre dicho acoplamiento estará determinada por la longitud y constitución nucleotídica de los cebadores. En el tercer paso o de polimerización, la ADN polimerasa efectúa su labor utilizando los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y el ADN como molde, para generar una nueva cadena de ADN complementario a la secuencia diana. Dado que la polimerización ocurre a partir de los cebadores, a este paso también se le denomina como de extensión de cebadores. La temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima Taq polimerasa es de 72°C. Un ciclo típico tiene una duración de 2 a 5 min, mientras que una reacción completa requiere de 25 a 35 ciclos. Cabe señalar que en la mayoría de las reacciones hay dos pasos únicos, es decir, no forman parte de los ciclos, un paso inicial de desnaturalización procura asegurarse que todo el ADN que se utilice como molde esté efectivamente desnaturalizado, y uno final de polimerización que busca completar todas aquellas copias de ADN que no se hallan extendido completamente (Ramírez 2000).

Los ciclos se repiten típicamente de 25 a 45 veces. La estandarización del funcionamiento del termociclador es esencial para la reproducibilidad de resultados. Los productos de la reacción se separan por tamaño (peso) en un

gel de electroforesis. Dependiendo de la cantidad del producto y el tamaño del fragmento amplificado, los productos de la reacción pueden visualizarse directamente tiñendo con bromuro de etidio o por un protocolo de tinción de plata, o por medio de radioisótopos y autoradiografía (Herrera 2007).

Secuenciación del Material Genético

Existen diferentes técnicas de secuenciación, pero sin ninguna duda la desarrollada en la década de 1970 por Frederick Sanger, forma la base del “ciclo” automatizado de la reacción de secuenciación de hoy. Para la secuenciación se agregan sustancias de tinción fluorescentes a las reacciones, y un láser dentro de una máquina secuenciadora de ADN automatizada se usa para analizar los fragmentos de ADN producidos (Herrera 2007). El propósito de la secuenciación es determinar el orden de los nucleótidos de un gen, para lo cual se parte desde fragmentos de PCR o genes clonados. Hay tres pasos en la reacción de secuenciación (como en la PCR), que son repetidos por 30 a 40 ciclos (Herrera 2007).

Desnaturalización a 94°C: Durante la desnaturalización, la doble cadena se funde abriéndose para dejar DNA de cadena simple.

Anillamiento a 50° C: Se usa sólo un primer, así se copia una sola cadena (en PCR: se usan dos primers, y dos cadenas son copiadas). Se forman enlaces iónicos entre la cadena simple del primer y la cadena plantilla simple. La polimerasa copia la plantilla generando una nueva cadena de DNA.

Extensión a 60° C: Normalmente es a 72° C, por que la polimerasa tiene que incorporar ddNTP's (dideoxinucleótidos trifosfato) que están químicamente modificados con un marcador fluorescente) (Herrera 2007).

Después de la reacción de secuenciación, la mezcla de cadenas, todas de diferente longitud y todas terminadas en una marca fluorescente ddNTP tienen que ser separadas. Esto se hace en un gel de acrilamida, que es capaz de separar una molécula de 30 bases de una de 31 bases, y también una molécula de 750 bases de una de 751 bases (Herrera 2007).

Los fragmentos marcados fluorescentemente migran a través del gel y se pasan por un haz de láser. El láser excita la molécula fluorescente, que despidе luces de distinto color. Esta luz es captada y enfocada por lentes en un espectrógrafo. Basado en la longitud de onda, el espectrógrafo separa las luces a través de una cámara CCD (charge coupled device). Cada base tiene su propio color, así el secuenciador puede detectar el orden de las bases en el gen secuenciado. Cuando todos los fragmentos son secuenciados, un programa de computadora ajusta apropiadamente las diferentes partes y reúne la secuencia del gen total (Herrera 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de las Cepas Bacterianas

Las bacterias utilizadas en esta investigación fueron obtenidas del cepario del Centro de Biología Celular y Molecular de la U.T.P.L las cuales provienen del aislamiento efectuado en muestras (líquidas y sólidas) de drenajes ácidos de tres zonas mineras (Portovelo, Bella Rica y San Gerardo) ubicadas entre los límites provinciales de El Oro, Azuay y Guayas en el sector austral ecuatoriano.

Medio de Cultivo:

Las cepas bacterianas fueron sembradas en Erlenmeyers de 250 ml estériles, con medio de cultivo líquido Norris por cuanto la literatura lo describe como el adecuado para el crecimiento de este tipo de bacterias con pH=1.8 - 2.0 ajustado con H_2SO_4 concentrado (Norris 1983) para la preparación del medio se utilizaron: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.4 g/l), KCl (0,1 g/l), K_2HPO_4 (0,2 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l), estos se disolvieron en agua desionizada para su posterior esterilización, seguidamente se añadió $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (44.2g/l) como fuente de energía y la inoculación con 10 ml de la muestra líquida en 90 ml de medio Norris, finalmente las condiciones de cultivo comunes fueron incubar a 30° C con agitación constante a 220 rpm en un shaker (Lavalle *et al.* 2004) de 3 a 5 cinco días como inicio por cuanto no había una activación inmediata de las bacterias para lo cual se realizó

varios repiques bacterianos sucesivos, en el momento de cambio en la intensidad de color del medio de cultivo inoculando así a un nuevo medio Norris a fin de conseguir un crecimiento óptimo.

Determinación de la Concentración Celular

Conteo de células en cámara

El conteo directo de número de células totales, se realizó por medio de la cámara Neubauer ($0.1\text{mm} \cdot 0.0025\text{mm}^2$). Se tomaron alícuotas de las muestras a intervalos de tiempo similares y se realizaron diluciones (1:1; 1:2), se colocó una alícuota de $10\ \mu\text{l}$, en la cámara Neubauer. Se utilizó un lente de 100x para el conteo bacteriano.

Para la realización de los cálculos se promedió el número de células contadas en el microscopio de contraste de Fases en 5 campos de manera diagonal.

El número de células por ml, se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Bac/ml} = (\text{N}^\circ \text{bacterias contadas} \times K \times \text{F.D}) / \text{N}^\circ \text{cuadrados}$$

Donde:

F.D = factor de dilución

N° de cuadrados utilizados = 20 cuadrados

K = 4×10^6

Medición de Fe⁺²

Se tomó 100 µL de muestra de los diferentes distritos y se diluyó con agua acidulada (pH 2.0), a un factor de dilución 100; posteriormente se tomó una alícuota de 0.1 ml de la muestra diluida y se colocó en un tubo de 10 ml; se agregó 1.0 ml de reactivo fluoruro complejante y se agitó durante 2 minutos; se añadió 0.4 ml de reactivo o-fenantrolina y se agitó vigorosamente por 2 minutos; se añadió 1 ml de agua destilada acidulada para llevar a un aforo de 2.5ml y se agitó (Juárez 2004); se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro de UV visible con una longitud de onda de 510 nm. El blanco contiene todos los reactivos con excepción de la muestra la cual es reemplazada por agua destilada ácida (pH 2.0).

Medición de Fe total

Se tomó muestra de 0.1 ml (factor de dilución 100) y se colocó en un tubo de 10 ml; se agregó 0.1 ml de agente reductor (clorhidrato de hidroxilamina al 10%) y se agitó fuertemente durante 3 minutos; se añadió 0.4 ml de reactivo de o-fenantrolina y se agitó vigorosamente por 2 minutos; se añadió 1.9 ml de agua destilada acidulada para llevar a un aforo de 2.5 ml y se agitó; (Juárez 2004) se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro de UV visible con una longitud de onda de 510 nm. El blanco contiene todos los reactivos con excepción de la

muestra la cual es reemplazada por agua destilada ácida (pH 2.0).

Los cálculos para la concentración de Fe total y Ion Ferroso en las muestras se dieron en gramos por litro de acuerdo a la curva de calibración dada. Para la determinación de Fe (III) se obtuvo de la diferencia del Fe (total) menos Fe (II).

Técnicas Moleculares de Identificación: Extracción de ADN, PCR, Purificación, Secuenciación de ADN y Análisis Filogenético.

El ADN fue extraído usando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acuerdo al protocolo establecido por la marca.

Cuando el cultivo bacteriano estuvo en un crecimiento máximo (μ_m) se tomó 1ml de cultivo en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Luego se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos, descartando el sobrenadante y repitiendo esta operación por lo menos unas ocho veces. Se utilizó siempre el mismo micro tubo a fin de aumentar la masa celular, y obtener un pellet de células. Posteriormente el pellet fue lavado dos veces con agua destilada ácida (pH=1.8).

La amplificación del ADN bacteriano se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando una combinación de primers universales bacterianos 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3) (Macalady *et al.*

2006; Miyoshi *et al.* 2005). Este par de primers amplifica un fragmento del gen 16S rRNA de aproximadamente 1,5 kb.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s; 30 ciclos, cada ciclo consiste de un paso de desnaturalización a 98 °C, anillamiento a 60 °C por 20 s y una extensión a 72 °C por 30 s; y una extensión final a 72 °C por 7 min para finalizar la PCR. El volumen de reacción de PCR fue 50 µL, con concentraciones de 1x PhusionTM HF Master mix (F-531L 2x, FINNZYMES), 0,5 pmol/ µL de cada primer (Invitrogen), 0.8 µg/µL Bovine Serum Albumin (BSA, SIGMA) y 5 µL de DNA matriz por reacción.

En la PCR se incluyó un control que contiene el mix de PCR sin DNA. Los productos de PCR (3 µl de producto de PCR + 2 µl de azul bromofenol - 6x loading solution) fueron analizados en una electroforesis con geles de agarosa 0.7% (UltraPureTM Agarose, Invitrogen) a 128 V, 300 mA por 20 min teñidos en una solución de Bromuro de etidio 0.5 µg ml⁻¹ durante 25 min y un lavado final con agua destilada por 15 min. Los productos de PCR fueron purificados y luego secuenciados en la Empresa MacroGen (Seoul, Korea), usando los primers universales 27F y 1492R.

La edición de secuencias fue realizada con el programa Sequencher 4.6 (Gene Codes, Ann Arbor, MI) para la generación de consensos necesarios para el análisis filogenético.

Se utilizó BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para detectar secuencias publicadas con una alta similaridad a la región 16S rRNA bacteriana.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa MAFFT v.6 (<http://align.bmr.kyushou-u.ac.jp/mafft/online/server/>) mediante la estrategia interactiva G-INS-i. Los cálculos filogenéticos fueron realizados en PAUP usando una variante del método Neighbour-Joining llamada Bio-Neighbour-Joining (Gascuel 1997). La confiabilidad fue estimada usando el método de bootstrap con 1000 repeticiones. El árbol fue enraizado con dos secuencias de las bacterias *Leptospirillum ferriphilum* (genbank AF356830) y *Leptospirillum ferrooxidans* (genbank AF356834).

RESULTADOS

Las características fisicoquímicas de las zonas mineras Portovelo, Bella Rica, y San Gerardo; sumado a la presencia de aguas ácidas con alto contenido de metales pesados, hacen que sea posible considerar a estas zonas como una fuente potencial de microorganismos de notable y creciente aplicación industrial en la biohidrometalurgia.

Determinación de la Concentración Celular

En la Figura 1 se indican los resultados del crecimiento bacteriano mediante la utilización de la técnica de conteo celular mediante cámara de Neubauer.

El tiempo de crecimiento de las cepas bacterianas fue de 27 horas, siendo el tiempo óptimo 21 horas con un crecimiento de 6.90×10^7 bacterias/ml para la cepa de Portovelo; 7.14×10^7 bacterias/ml para Bella Rica y 7.08×10^7 bacterias/ml para San Gerardo.

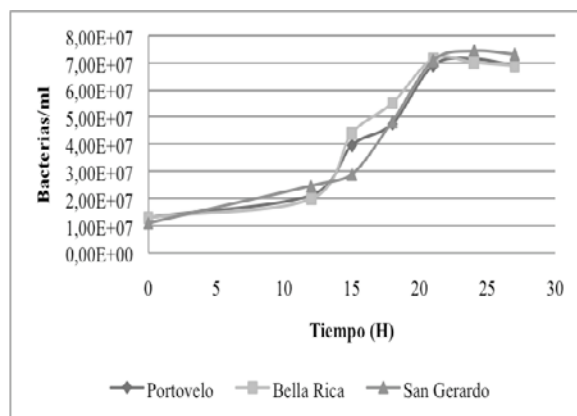


Figura 1. Curva de crecimiento de las cepas bacterianas de tres distritos mineros Portovelo, Bella Rica, y San Gerardo mantenidas en medio Norris, con temperatura a 30°C a una agitación de 220 rpm.

Tabla 1. Velocidad específica de crecimiento de la cepa bacteriana de los tres distritos mineros.

Categoría	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
Portovelo	0,124
Bella Rica	0,134
San Gerardo	0,123

En la Tabla 1 podemos observar la velocidad específica de crecimiento de las cepas bacterianas de los tres distritos mineros, en la cual vemos que el distrito Bella Rica tiene una mayor velocidad de crecimiento de $0,134 \text{ h}^{-1}$ con

respecto a Portovelo y San Gerardo que tienen 0,124 y 0,123 h⁻¹ respectivamente.

Determinación de Fe⁺² y del Hierro Total

Las Figuras 2,3 y 4 correspondientes a las zonas mineras Portovelo, Bella Rica y San Gerardo respectivamente muestran la oxidación de Ion ferroso, al mismo tiempo que se va incrementando el Ion férrico. Las tres cepas bacterianas tienen una capacidad de oxidación del Fe²⁺ muy semejante y agotan el sustrato aproximadamente a las 21 horas.

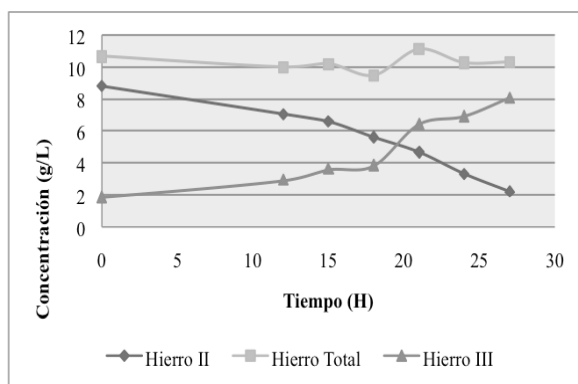


Figura 2. Oxidación de Fe²⁺ en medio (Norris) de la cepa bacteriana de Portovelo medido por espectrofotometría UV a una longitud de 510nm.

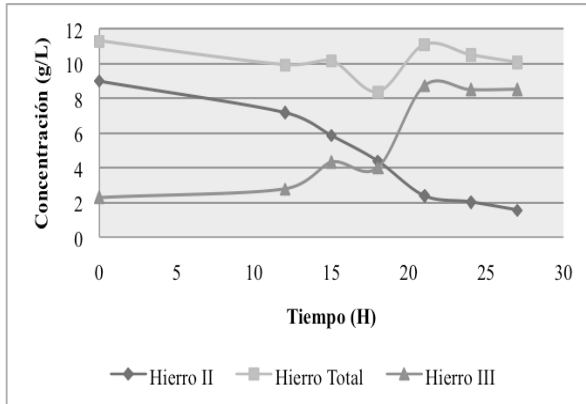


Figura 3. Oxidación de Fe^{2+} en medio (Norris) de la cepa bacteriana de Bella Rica medido por espectrofotometría UV a una longitud de 510 nm.

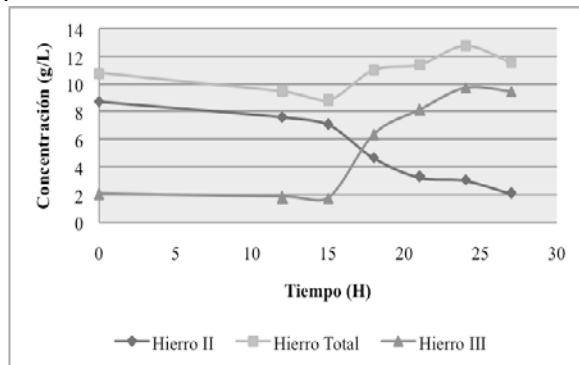


Figura 4. Oxidación de Fe^{2+} en medio (Norris) de la cepa bacteriana de San Gerardo medido por espectrofotometría UV a una longitud de 510nm.

*Técnicas Moleculares de Identificación:
Extracción de ADN, PCR, Purificación
Secuenciación de ADN y Análisis Filogenético.*

Se evaluaron 3 cepas bacterianas aisladas de tres regiones mineras diferentes. Todas fueron amplificadas usando los primers universales para procariotas 27F y 1492R para generar un fragmento de aproximadamente 1500 pb de la región 16S rRNA que fue posteriormente secuenciado (Figura 5).

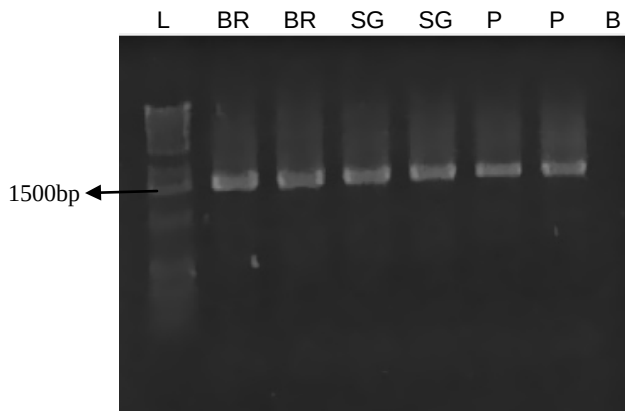


Figura 5. Productos de PCR de 1500bp en Gel de Agarosa al 0.7%. Resultados de la amplificación de la región 16S rDNA bacteriano. (L) 1 Kb DNA Ladder; (BR) Bella Rica; (SG) San Gerardo; (P) Portovelo; (B) Blanco.

Las secuencias de la región 16S rDNA de las tres cepas analizadas es idéntica. Al hacer

una comparación con la secuencias disponibles en el GenBank utilizando BLAST se encontró una alta similaridad con secuencias de *Acidithiobacillus* provenientes de varios países distintos (datos no indicados).

Por otro lado, en el árbol filogenético generado mediante un análisis de Bio-Neighbour-Joining (Figura 6), las tres cepas se agrupan dentro de un clado (89% de confiabilidad en el análisis Bootstrap) con cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

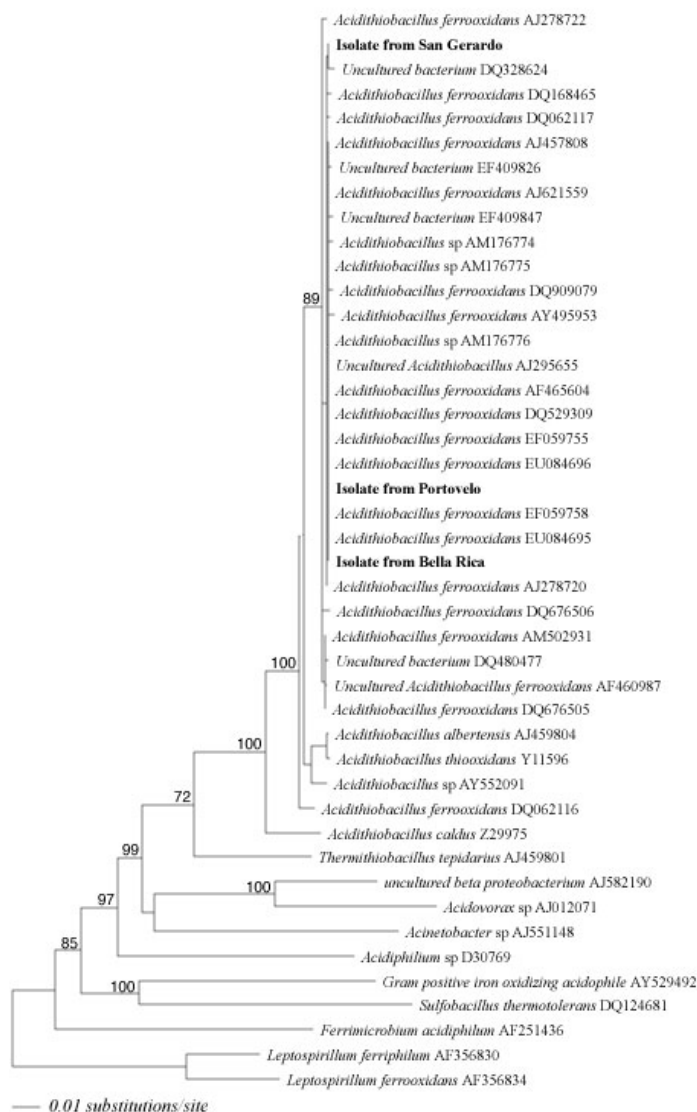


Figura 6. Árbol filogenético construido mediante un análisis Bio-Neighbour-Joining de las secuencias 16S rDNA obtenidas desde las tres cepas aisladas y sus secuencias cercanas. Los números son los valores de respaldo del Bootstrap con 1000 repeticiones. El árbol fue enraizado con *Leptospirillum ferriphilum* (genbank AF356830) y *Leptospirillum ferrooxidans* (genbank AF356834). Las secuencias obtenidas en este estudio se indican en negrilla.

DISCUSIÓN

Determinación de la Concentración Celular

La capacidad de la población bacteriana para oxidar el sulfuro de los minerales de interés están influidas por las condiciones que componen su medio ambiente como la temperatura, nutrientes, acidez, sustrato o fuente de energía, metales disueltos y especies. La investigación realizada por Nemat *et al.* (1998) abarca el efecto de muchos de estos parámetros sobre la oxidación bacteriana por *Thiobacillus ferrooxidans* (sinónimo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*) (Spencer 2000).

Las tres cepas estudiadas crecieron satisfactoriamente en el medio Norris bajo las condiciones adecuadas de temperatura a 30° C, pH 1.8 y agitación 220 rpm. En estudios anteriores se lograron establecer las condiciones propicias para el óptimo crecimiento de estos microorganismos, entre las que se destaca la siembra en medio de cultivo Norris (1983). Sin embargo, se resalta que la Biolixiviación es un proceso lento que puede necesitar desde días hasta años dependiendo del material y método empleado (Corrales *et al.* 2006).

Se determinó que el tiempo máximo de crecimiento para las tres cepas bacterianas fue de 21 horas, siendo su etapa exponencial rápida, la cual se asocia con un consumo de sustrato de aproximadamente 90% y con una población bacteriana del orden de $7,14 \times 10^7$; $6,90 \times 10^7$ y

7,08 E+07 bact/ml para las zonas de Bella Rica, Portovelo y San Gerardo, lo cual indica que las cepas estuvieron bien adaptadas al medio de cultivo. El tiempo óptimo de crecimiento concuerda con las investigaciones realizadas con *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Frias 2000).

Las velocidades máximas de crecimiento fueron de 0,134; 0,124 y 0,123 h⁻¹ con lo cual corroboramos que la cepa bacteriana de Bella Rica tiene una mejor afinidad por la fuente de energía utilizada con relación a las cepas de los dos distritos mineros. Las velocidades de crecimiento obtenidas en esta investigación son similares a las especies bacterianas reportadas por otros investigadores como son TfAgrio8 con 0,14 h⁻¹; TfAgrio9 con 0,10 h⁻¹ y TfAgrio10 con 0,10 h⁻¹ (Lavalle *et al.* 2004). Así mismo para *T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* con velocidades máximas de 0,116 y 0,130 h⁻¹ respectivamente (Frias 2000). De igual manera existe una similaridad de 0,14, 0,10 y 0,10 h⁻¹ para tres cepas bacterianas de *T. ferrooxidans* (Chiacchiarini 2003).

Determinación de Fe⁺² y del Hierro Total

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos ver que la cepa de Bella Rica tiene una mejor capacidad oxidativa del ion ferroso con respecto a las cepas de Portovelo y San Gerardo, esto se puede observar en el cambio de color de amarillo a rojo vino ocasionado por la presencia del ion férrico (Fe⁺³), el cual es un indicador de la buena adaptación y proliferación celular. La coloración rojiza, debe ser

consecuencia de la hidrólisis del ión férrico, de acuerdo a las reacciones (Sand *et al.* 2001). Esta situación puede ayudar a que se liberen metales en la solución, o bien a quedarse sobre la superficie mineral, lo cual puede provocar situaciones con potencial impacto como contaminante ambiental (Juárez 2004). La bacteria más notable que oxida el hierro y azufre es *Thiobacillus ferrooxidans* (Juárez 2004).

En particular se ha reconocido a estas bacterias de la especie por su habilidad para acelerar la disolución oxidativa de minerales sulfurosos presentes en materiales residuales de minas, lo que incrementa la generación de acidez producto de la oxidación de algunos minerales sulfurosos. Este hallazgo ha sido importante no solo para la economía industrial (con la aplicación de los procesos de biolixiviación), sino también para aminorar los efectos del impacto ambiental controlando la actividad de estos microorganismos (Juárez 2004).

Técnicas Moleculares de Identificación: Extracción de ADN, PCR, Purificación, Secuenciación de ADN y Análisis Filogenético.

Decidimos aplicar una técnica molecular para estudiar las cepas bacterianas previamente aisladas con el objeto de confirmar la identidad de las mismas tentativamente identificadas como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, por parámetros indicativos como temperatura a 30° C, pH 1.8 y oxidación del ion ferroso siendo éstos condiciones adecuadas que favorecieron la

adaptación y crecimiento celular de las cepas bacterianas. El análisis de secuencias del ARNr 16S ha sido utilizado para la identificación molecular de una amplia variedad de especies bacterianas, incluyendo muchas que no pueden ser cultivadas (Osorio 2007).

Los análisis moleculares de las cepas bacterianas, se los realizó luego de haber obtenido una velocidad máxima de crecimiento. Así para las muestras de los distritos mineros de Portovelo, Bella Rica y San Gerardo se logró obtener secuencias de buena calidad, que al ser buscadas en BLAST y comparadas en la base de datos del GenBank, fueron confirmatorias para el género *Acidithiobacillus*.

Con los resultados obtenidos se amplía el conocimiento sobre la biodiversidad que existe en el drenaje ácido de minas, donde son depositados minerales sulfurosos y que son empleados por los microorganismos durante la oxidación como fuente de energía. También se aumenta el conocimiento sobre la ecología y sistemas extremadamente ácidos, donde ha sido demostrada la importancia de la actividad de los microorganismos, hasta ahora poco valorada en este tipo de sistemas.

La comparación de las secuencias de los 16S rRNA permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de

las bacterias. La comparación de las secuencias de 16S rRNA (o de los genes que lo codifican) nos permitieron establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos aislados con las secuencias más cercanas obtenidas en BLAST. El análisis mediante BIONJ muestra que las cepas aisladas están agrupadas en un solo clado de la especie de *Acidithiobacillus ferrooxidans* respaldado con una alta confiabilidad de acuerdo al análisis bootstrap.

Conclusiones:

- La identidad de las cepas nativas bacterianas acidófilas, esencialmente mesófilas que habían sido provisoriamente clasificadas como *Acidithiobacillus ferrooxidans* pudo ser confirmada por amplificación por PCR del fragmento DNA correspondiente al gen del RNAr 16S. Los resultados moleculares indican que se trata de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
- El medio de cultivo seleccionado Norris es satisfactoriamente adecuado para la adaptación de las cepas de los distritos mineros por cuanto se obtuvo un crecimiento bacteriano óptimo de 6.90×10^7 bacterias/ml para la cepa de Portovelo; 7.14×10^7 bacterias/ml para Bella Rica y 7.08×10^7 bacterias/ml para San Gerardo.
- Los principales parámetros para el crecimiento bacteriano son la temperatura 30°C , pH inicial 1.8, oxidación de ión ferroso y composición de nutrientes.
- Las cepas bacterianas en los tres distritos mineros presentan una capacidad de oxidación del ión ferroso (Fe^{2+}) muy semejante y agotan el sustrato aproximadamente a las 21 horas.

Bibliografía Citada:

- Alpaca M. 1998. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica.
- Amann R., Ludwig W., Heinz K. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 143–169.
- Bel U., Garcia F., Muyzer G. 1997. PCR Primers To Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 3327–3332.
- Bustos K., Salazar O., Escobar B. 2005. Identificación de Bacterias Hierrooxidantes en Procesos de Biolixiviación mediante Técnicas Moleculares. Hydrocoppe. Chile.
- Cabrera G. 2005. Estudios de Procesos para la Solubilización y Precipitación de Iones Metálicos Contaminantes Mediante Bacterias Azufre-Oxidantes y Sulfato Reductoras. Tesis Doctoral de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Puerto Real. Universidad de Cádiz.
- Corrales L. *et al.* 2006. Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del Departamento de Boyacá. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Chiacchiarini P. 2003. Aislamiento y

- caracterización del crecimiento de especies acidófilas sobre diferentes sustratos, Tesis de Maestría en Ciencias Químicas Orientación Biotecnología. Universidad Nacional de Comahue.
- Duménigo M., Bugallo F., Díaz A. 2006. Biotecnología, tecnología emergente para el tratamiento de minerales, minerales de baja ley, concentrados y colas de manera sostenible. Centro de Investigaciones para la Industria Minero Metalúrgica.
- Edwards K. *et al.* 2000. Geochemical and biological aspects of sulphide mineral dissolution: lessons from Iron Mountain, California. *Chemical Geology* 169(10): 383-397.
- Escobar B. *et al.* 2007. Uso del 16s rDNA para identificar y cuantificar bacterias en procesos de biolixiviación. Instituto de Innovación en Minería y Metalurgia. CODELCO.
- Felske A. 1999. Reviewing the DA001-files: a 16S rRNA chase on suspect #X99967, a *Bacillus* and Ducht underground activist. *Journal of Microbiological Methods* 36: 77-93.
- Frias J. 2000. Biooxidación de un mineral concentrado refractario de oro con cultivos bacterianos mixtos. Tesis de Magister en Cs. De la Ingeniería, mención Ingeniería Bioquímica. Universidad Católica de Valparaíso.
- Gascuel O. 1997. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular*

- Biology and Evolution 14: 685–695.
- Guerrero J. 2004. Biotecnología en la disolución y recuperación de metales: Lixiviación bacteriana. *Revista Ciencias*.
- He z. *et al.* 2008. Microbial diversity in acid mineral bioleaching systems of dongxiang copper mine and Yinshan lead–zinc mine, *Extremophiles* (2008) 12:225–234.
- Herrera P. 2007. Aislamiento de *Tulasnella* spp. (Basidiomycota) a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epífitas. Tesis de Bioquímico-Farmacéutico. U.T.P.L. pp. 22-24.
- Juárez A. 2004. Biolixiviación de minerales de sulfuro-ferroso en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. Tesis de Doctorado en Ciencias: Biotecnología. Universidad de Colima.
- Karavaiko G. *et al.* 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 113–119.
- Krsek M., Wellington E. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods* 39, 1–16.
- Lane D. *et al.* 1985. Phylogenetic Analysis of the Genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA Sequences. *Journal of Bacteriology*, 75-81.
- Lane D. *et al.* 1992. Evolutionary Relationships among Sulfur- and Iron-Oxidizing

- Eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 269-278.
- Lavalle L. *et al.* 2004. Isolation and caracterización of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochemistry* 40: 1095-1099.
- Macalady J. *et al.* 2006. Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy. *Applied and environmental microbiology*. Volúmen 72: 5596–5609.
- Matheus R. *et al.* 2006. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:439-447.
- Miyoshi T., Iwatsuki T., Naganuma T. 2005. Phylogenetic Characterization of 16S rRNA Gene Clones from Deep-Groundwater Microorganisms That Pass through 0.2-Micrometer-Pore-Size Filters. *Applied and environmental microbiology*. Volúmen 71: 1084–1088.
- Mullis K., Faloona F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth Enzymol.* 55: 335-350.
- Norris P. 1983. Iron and mineral oxidation with *Leptospirillum*-like bacteria. En: Rossi G., Torma A. (Eds.) *Recent Progress in Biohydrometallurgy*, 83-96. Italia.
- Osorio V., Márquez E., Márquez M. 2007. Caracterización por *Ardrea* de microorganismos acidófilos aislados en minas de oro de Marmato, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Volúmen 9. N° 1:14-21.

- Qiu M., Wang G., Zhang W., and Xiong S. 2006. Optimizing conditions for bacterial leaching of copper from discarded mines. Journal of University of Science and Technology Beijing. Volúmen 13: 7-10.
- Qiu M., Xiong S., Zhang W. 2006. Efficacy of chalcopirite bioleaching using a pure and a mixed bacterium. Journal of University of Science and Technology Beijing. Volúmen 13: 108-111.
- Ramírez H. 2000. Detección y Tipificación de Actinomicetos Patógenos Basadas en Técnicas Moleculares; Capítulo 9. p. 205.
- Rawlings D.E. 1995. Restriction Enzyme análisis of rRNA genes for the rapid identification of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* strains in leaching environments. Biohydrometallurgical Processing, Proceedings of the Internacional Biohydrometallurgical Symposium. Volúmen 2: p. 9-17. Chile.
- Rodicio M., Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España.
- Sand W. *et al.* 1999. Direct versus indirect bioleaching. In Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century. Proceedings of the Internacional Biohydrometallurgical Symposium. IBS- 99. Amils-Ballester

- Eds. Elsevier Science. Part A, 27- 50.
ISBN 0 444 50193 2.
- Sand W. *et al.* 1992 Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Environ. Microbiol*58: 85 – 92.
- Silverman M., Lundgren D. 1959. Studies on the chemoautrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology* 77: 642-647.
- Selenska S., Otto A., Kutschke S. 1998. Identification and discrimination of thiobacilli using ARDREA, RAPD and rep-APD. *Journal of Applied Microbiology* 84: 1085-1091.
- Spencer P. 2000. Influence of bacterial culture selection on the operation of a plant treating refractory gold ore. *Internanional Journal of Mineral Processing*. 62Ž2001. 217–229.
- Valencia P. 2002. Efecto del área superficial sobre la biooxidación de un concentrado pirítico de oro mediante *Sulfolobus metallicus*; Tesis de Magíster en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Bioquímica, Universidad Católica de Valparaíso. p. 7.
- Vlasceanu L. *et al.* 1997. Characterization of *Thiobacillus thioparus* LV43 and Its Distribution in a Chemoautotrophically Based Groundwater Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*. Volúmen 63: 3123–3127.
- Yates J., Colmes D. 1987 Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus*

- ferrooxidans*. J Bacteriol. 169(5): 1861-1870
- Zheng D., *et al.* 1996. Characterization of Universal Small-Subunit rRNA Hybridization Probes for Quantitative Molecular Microbial Ecology Studies. Applied and environmental microbiology. Volúmen 62. N° 12: 4504–4513.