**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

**BIOLIXIVIACIÓN Y BIOOXIDACIÓN
DE MINERALES
UTILIZANDO CEPAS NATIVAS
CON CAPACIDAD TERMOFÍLICA**

MARÍA ALEJANDRA GIAVENO FILIPPA
TESISTA

DR. EDGARDO DONATI
DIRECTOR

AÑO 2010

A Omar por el amor,

A Manuel, Sebastián y Paula por la alegría,

A los amigos por estar siempre.

Mi reconocimiento:

A la FACULTAD DE INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE y al CINDEFI-UNLP-CONICET por facilitar los medios y financiar para desarrollar los ensayos que conformaron este Trabajo de Tesis. Al ENTE PROVINCIAL DE TERMAS DE NEUQUÉN (EPROTEN) por permitir realizar este estudio en el Parque Geotermal Copahue.

Mi agradecimiento:

A mi Director Dr. Edgardo Donati por la confianza y las oportunidades que me ha brindado en mi formación científica.

Al Dr. Wolfgang Sand por recibirme en su laboratorio en el Biofilm-Centre de FB Chemie de la Universität Duisburg-Essen, Duisburg, Alemania y poner a mi disposición los microscopios de fuerza atómica y de epifluorescencia.

A la Dra. Elena Gonzalez-Toril del Centro de Astrobiología del Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial, Madrid, España, por su inestimable cooperación en la caracterización molecular de los microorganismos aislados.

A mis colegas y amigas Patricia Chiacchiarini y Laura Lavalle por haber recorrido conmigo, desde el inicio, el camino de la biolixiviación.

A la Dra. Gisela Pettinari por su asistencia en las determinaciones de DRX y por su constante aliento.

A Ricardo Ulloa, Cintia Cordero, Laura Leiva, Irene Zajonskosky, Miria Baschini por su asistencia en la parte experimental desarrollada en Neuquén.

A Francisco Caro, Mónica Rueda y Susana Martínez Stagnaro del Asentamiento Universitario Zapala, UNCo por facilitarme las muestras de minerales y cooperar en su caracterización.

A Juliana Huergo, Nadia Yagnentkovsky, Mariana Vicente, Cecilia Bernardelli, Federico Galizia, Josefina Plaza Cazón, Sofía Urbieto, Pamela Kikot, Alfonsina Bonfranceschi, Natalia Marchevsky y a la Dra. Marisa Viera por la asistencia y afecto durante mis estancias en el Cindefi La Plata

A mi prima Alicia Locatelli Giaveno por la hospitalidad y afecto que me posibilitaron sostener largas estancias lejos de mi casa.

A mi familia: Omar, Manuel, Sebastian, Paula y Romina, que siempre acompañaron con entusiasmo y alegría mis emprendimientos.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	15
Organización de la Tesis	16
CAPÍTULO 1. SISTEMA GEOTERMAL COPAHUE	
Descripción de los sitios de muestreo	19
1.1. Volcán Copahue y laguna del cráter	22
1.2. Río Agrio y Lago Caviahue	24
1.3. Campo Geotérmico Copahue	29
1.4. Caracterización físico química de los puntos de muestreo	36
CAPÍTULO 2. CONSORCIOS TERMÓFILOS ACIDÓFILOS	
Selección y caracterización	43
2.1. Enriquecimiento de os consorcios extremófilos	46
2.2. Caracterización morfológica	49
2.3. Caracterización molecular	56
CAPÍTULO 3. MICROORGANISMOS TERMÓFILOS ACIDÓFILOS	
Aislamiento y caracterización	75
3.1. Aislamiento en medio sólido	77
3.2. Determinación de los parámetros de crecimiento	83
3.3. Uso de diferentes fuentes de energía	85
3.4. Determinación de la capacidad hierro oxidante de los cultivos	91
3.5. Ensayos en anaerobiosis	95
3.6. Ensayos de tolerancia a metales pesados y arsénico	98
3.7. Ensayos de tolerancia a cloruro sodio	101
3.8. Clonación y secuenciación del gen ADNr -16S	102
CAPÍTULO 4. BIOLIXIVIACIÓN DE UN MINERAL DE CINC	

Capacidad biolixivante de consorcios termófilos	107
CAPÍTULO 5. BIOOXIDACIÓN DE UN MINERAL DE ORO	
Capacidad biooxidante de consorcios termófilos	121
5.1. Ensayos de biooxidación a 75 °C usando consorcios termófilos	125
5.1. Ensayos de biooxidación a 30 °C usando consorcios termófilos	134
CAPÍTULO 6. BIOOXIDACIÓN DE UN MINERAL DE HIERRO	
Participación en el drenaje ácido	143
CONCLUSIONES	
Logros y publicaciones	159
REFERENCIAS	165
ANEXOS	199
Anexo I: Médios de cultivo para enriquecimiento	201
Anexo II: Métodos analíticos	205
Anexo III: Caracterización microscópica de los cultivos	212
Anexo IV: Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	215
Anexo V: Extracción, amplificación por PCR y electroforesis del ADN amplificado	219
Anexo VI: Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente de urea formamida (DGGE)	225
Anexo VII: Clonación y secuenciación de las bandas de ADN a partir de la DGGE	229
Anexo VIII: Medios sólidos para aislamiento	236
Anexo IX: Ensayos de tolerancia	238
Anexo X: Extracción, amplificación, clonación y secuenciación de ADN _r -16S	239
Anexo XI: Caracterización mineralógica de los residuos sólidos de los procesos biolixiviación	240

INTRODUCCIÓN

Objetivos y Organización

INTRODUCCION

La biolixiviación es el proceso por el cual diferentes microorganismos catalizan la solubilización de metales contenidos en una matriz mineral. Esta metodología extractiva presenta ventajas considerables respecto de las alternativas tradicionales, en particular, cuando se trata de minerales sulfurados de baja ley; en estas condiciones, la biolixiviación es claramente más rentable y con menor impacto ambiental. La biolixiviación se aplica a escala comercial (en pilas de lixiviación aprovechando los microorganismos que ya están asociados al mineral) para la recuperación principalmente de cobre (Breed y Hansford, 1999; Sand y col., 2001; Hansford y Vargas, 2001; Acevedo, 2002; Kinzler y col., 2003; Xie y col., 2005; Keeling y col., 2005; Mousavi y col., 2006; Watling, 2006; Dreisinger, 2006; Sand y Gehrke, 2006; Harneit y col., 2006; Viera y col., 2007; Donati y Sand, 2007; Brierley, 2008; Coto y col., 2008; Watling, 2008; Qin y col., 2009; Simate y col., 2010; Anjum y col., 2010; Noël y col., 2010; Florian, 2010; Gericke y col., 2010; Schippers y col., 2010).

Acidithiobacillus ferrooxidans fue el microorganismo que inicialmente se asoció al proceso de biolixiviación. Esta bacteria quimiolitotrófica y mesófila (temperatura óptima entre 30 y 35 °C), es capaz de crecer a través de la catálisis oxidativa de hierro(II) o de compuestos reducidos de azufre, utilizando oxígeno como último aceptor de electrones. La capacidad de oxidar hierro(II) y compuestos de azufre para generar, respectivamente, un oxidante como el hierro(III) y ácido sulfúrico, le permiten participar en la biolixiviación de sulfuros a través de mecanismos indirectos hoy aceptados universalmente. También se ha comprobado la participación de los exopolímeros en la adherencia de estos microorganismos a la superficie de los minerales y en los procesos de ataque de los sulfuros (Donati y col., 1996; Giaveno y Donati, 2001; Gatti y col., 2003; Falco y col., 2003; Yang y col., 2008; Bevilacqua y col., 2010; Sand y col., 2001).

Desde hace tiempo se reconoce la acción más o menos relevante de otras especies microbianas en los procesos de biolixiviación. Entre ellas se destacan otras dos bacterias mesófilas: *Acidithiobacillus thiooxidans*, capaz de catalizar la oxidación de compuestos reducidos de azufre, y *Leptospirillum ferrooxidans* que sólo cataliza la

oxidación de hierro(II). No obstante, el advenimiento de los métodos moleculares de análisis, amplió significativamente el número de especies microbianas que eran ubicuas en los ambientes donde se encontraban los microorganismos descritos y que, como aquellos, podían participar activamente en los procesos de biolixiviación (Hallberg, 1996; Rawlings y col., 1999; Harneit y col., 2006; Ozkaya, 2007; Giaveno y col., 2007; Lavalley y col., 2008; Mangold y col., 2008; Ojumu y col., 2009; Xingyu y col., 2010; Bastías y Gentina, 2010). Más aún, se comprobó que en general los consorcios compuestos por varias especies microbianas suelen ser más eficaces en los procesos de biolixiviación que los cultivos puros. Estos consorcios suelen contener, además de las indispensables especies capaces de oxidar hierro(II) y/o azufre, otras que no tienen capacidad lixivante por sí mismas pero que contribuyen al funcionamiento adecuado del consorcio microbiano (por ejemplo, algunos heterótrofos utilizan ácidos orgánicos de cadena pequeña –inhibidores de muchos microorganismos lixiviantes- como fuente de energía y, de ese modo, evitan la inhibición del proceso de lixivación).

Una variante del proceso de biolixiviación que ha catapultado la aplicación de procesos biohidrometalúrgicos, es la biooxidación. Este proceso implica la misma acción microbiana descrita previamente, pero ahora actuando sobre especies sulfuradas que cubren la especie mineralógica de interés; es decir, la biooxidación simplemente aumenta la exposición del elemento a recuperar, pero no lo solubiliza como ocurre durante los procesos de biolixiviación. La biooxidación se usa como proceso de pretratamiento de los minerales refractarios de oro para liberar a éste de los sulfuros y arsenosulfuros que suelen ocluirlo; de este modo, se lo expone para que pueda ser lixiviado más fácilmente y en mayor medida durante el proceso de cianuración (Fleming, 1992; Costa, 1999; González y col., 1999; Chiacchiarini y col., 2001; Canales y col., 2002; Chiacchiarini y col., 2003; González y col., 2004; Miller y Brown, 2005; Rawlings y Johnson, 2007; Corkhill y Vaughan, 2009; Ciftci y Akcil, 2010; Gahan y col., 2010). Estos procesos se aplican de manera masiva en el mundo y, debido a que el precio del oro en el mercado lo permite, se los realiza en enormes tanques agitados a los cuales el mineral se agrega molido.

Aunque los primeros microorganismos asociados a los procesos de biolixiviación eran esencialmente mesófilos o termófilos moderados, se empezaron a

detectar termófilos en las aplicaciones industriales y, en particular, en los tanques. Esto obedece a que los procesos de biolixiviación y biooxidación son altamente exotérmicos (más de 30 MJ/kg de sulfuro oxidado). El mantenimiento de la actividad de los microorganismos mesófilos exige enfriar el sistema, con el consecuente aumento de los costos, para mantener la temperatura en niveles adecuados para esos microorganismos (Petersen, 2010; Jain y col., 2010). Una variante reciente es utilizar microorganismos termófilos moderados, con un rango óptimo de temperatura entre 45 y 55 °C, como *Acidithiobacillus caldus*, *Acidimicrobium*, *Sulfobacillus* y *Ferroplasma* (Clark y Norris, 1996; Norris y col., 1996; Tuffin y col., 2004; Dopson y col., 2004; Karavaiko y col., 2005; Golyshina y Timmis, 2005; Mousavi y col., 2006; Hawkes y col., 2006; Johnson y col., 2008; Zhou y col., 2008; Gu y col., 2009; Aston y col., 2010; Xia y col., 2010; Pina y col., 2010; Shiers y col., 2010) e incluso termófilos extremos, con temperaturas óptimas entre 60 y 85 °C, como las arqueas de los géneros *Sulfolobus*, *Acidianus* y *Metallosphaera* (Gómez y col., 1996; Rivera-Santillán y col., 1999; Gómez y col., 1999a; Gómez y col., 1999b; Romano y col., 2001; Rodríguez y col., 2003a; Rodríguez y col., 2003b; Rodríguez y col., 2003c; Muñoz y col., 2006; Cancho y col., 2007; He y col., 2008; Córdoba y col., 2008; Astudillo y col., 2008; Astudillo y Acevedo, 2009; He y col., 2009). La incorporación de estos microorganismos provoca un incremento notable en las velocidades del proceso, reduciendo el tiempo necesario para alcanzar rendimientos aceptables.

Es ampliamente aceptado que las poblaciones microbianas nativas y asociadas a los minerales y/o a las condiciones en las que se realizarán las operaciones de biolixiviación y/o biooxidación, resultan claramente más eficientes ya que son menos afectadas por eventuales especies tóxicas presentes en el mineral y que pudieran ser liberadas a la solución durante el proceso (Díaz y Roldán, 1999; Mousavi y col., 2006; Keeling y col., 2006; Mousavi y col., 2007; Marhual y col., 2008; Lavalley y col., 2008; Salinas-Martínez y col., 2008; Watling y col., 2008; Matlakowska y Sklodowska, 2010; Guo y col., 2010). Paralelamente, se ha activado la búsqueda de microorganismos capaces de resistir condiciones extremas y que, por lo tanto, resultan más resistentes y más eficientes en los procesos industriales. Esta opción ha resultado claramente más viable que el uso de microorganismos con modificaciones genéticas (Bathe y Norris, 2007; Holmes y Bonnefoy, 2007; Allen y col., 2007; Quatrini y col., 2008; Jerez, y col.,

2008; Valdés y col., 2008; Auernik y col., 2008a; Klingl y col., 2009) que suelen tener dificultades para competir e instalarse en nichos en los cuales hay microorganismos nativos ya adaptados a esas condiciones (Norris, 2007; Rawlings, 2007; Plump y col., 2007; Du Plessis y col., 2007).

Aunque se ha demostrado que prácticamente todos los sitios de la corteza terrestre incluyendo la hidrósfera y atmósfera colindantes, se encuentran colonizados por diferentes tipos de seres vivos (Ehrlich y Newman, 2009), algunos sitios cuyas condiciones ambientales se caracterizan por la elevada temperatura del entorno con alta acidez y presencia de metales, resultan más apropiados como hábitat de microorganismos potencialmente eficientes para los procesos biohidrometalúrgicos. En este sentido, se destacan las zonas aledañas a volcanes y parques geotermales; fue precisamente en el Parque Nacional Yellowstone (USA) donde fueron aislados los primeros microorganismos termófilos (Brock, 1972) aunque luego se extendió a otros lugares y ambientes (Yun, 1986; Johnson, 2001; Sand, 2003; Mathur y col., 2007; Auernik y col., 2008a; Perevalova y col., 2008; Zhang y col., 2008; Hall y col., 2008; Boothroyd y col., 2009; Deive y col., 2010).

El aislamiento y caracterización de los primeros microorganismos termófilos, en particular, y de los extremófilos, en general, permitió ampliar las fronteras de la clasificación filogenética de los seres vivos pues se comprobó que muchos de esos podían agruparse en un nuevo dominio que fue propuesto para ello y que corresponde al de los organismos procariotas denominados Arqueas (Woese y Fox, 1977; Woese y col., 1990). Con la incorporación de este tercer dominio, el diagrama del árbol de la vida actual coincide con el que se observa en la Figura 1 (Woese, 2000). Los microorganismos termófilos se ubican en las ramas más cortas y profundas del árbol, las que corresponden a los dominios de Arqueas y Bacterias.

Figura 1. Árbol filogenético universal como fuera propuesto por Woese (2000), ampliando su propuesta original en base al conocimiento acumulado a la fecha. El orden y la longitud de las ramas fueron determinados en base a la comparación de secuencias de rRNA

Se considera que los microorganismos termófilos, por la posición que ocupan en el diagrama filogenético, son los que probablemente han estado más estrechamente relacionados con los ancestros o precursores de las poblaciones microbianas contemporáneas (Whitman, 2009). Los microorganismos extremófilos y especialmente los termófilos, debido a que han desarrollado una variedad de estrategias moleculares para sobrevivir en sus hábitats naturales, resultan una atractiva fuente de biomoléculas y de enzimas resistentes a condiciones extremas y capaces de funcionar a altas temperaturas lo cual permite mejorar y acelerar una variedad de procesos biotecnológicos (Eichler, 2001; Bertoldo y Antranikian, 2002; Egorova y Antranikian, 2005; Zhou y col., 2006; Rabot y col., 2006; Ferrer y col., 2007; Cavicchioli, 2007; Garret y Klenk, 2007).

En el caso particular de las aplicaciones en biominería, se han podido aislar y caracterizar una importante cantidad de bacterias y, fundamentalmente, de arqueas termófilas. Algunas aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Rangos óptimos de pH y temperatura de microorganismos acidófilos oxidantes del hierro y del azufre (Schippers, 2007).

Bacterias moderadamente Termófilas	pH	T (°C)	Archaeas extremadamente termófilas	pH	T (°C)
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> ¹	~ 2	45-50	<i>Acidianus brierleyi</i> ³	1,5-2	70
<i>Acidithiobacillus caldus</i> ²	2-2,5	45	<i>Acidianus infernus</i> ⁵	2	90
<i>Caldibacillus ferrivorus</i> ³	1,8	45	<i>Metallosphaera kakonensis</i> ⁵	3	70
<i>Sufobacillus acidophilus</i> ³	2	45-50	<i>Metallolsphaera prunae</i> ⁵	2-3	75
<i>Sufobacillus sibericus</i> ³	2,2-2,5	55	<i>Metallosphaera sedula</i> ⁵	2-3	75
<i>Sufobacillus thermosulfooxidans</i> ³	~ 2	45-48	<i>Sulfolobus metallicus</i> ⁵	2-3	65
<i>Sufobacillus thermotolerans</i> ³	2	40	<i>Sulfolobus yanmisgensis</i> ⁵	2-2,6	80
Archaeas moderadamente Termófilas	pH	T (°C)	<i>Sulfurococcus mirabilis</i> ⁵	2-2,6	75-80
<i>Ferroplasma acidarmanus</i> ⁴	1,2	42	<i>Sulfurococcus yellowstonensis</i> ⁵	2-2,6	60

1-Actinobacterias, 2-Proteobacteria, 3-Firmicutes, 4-Euryarchaeota, 5-Crenarchaeota.

En la República Argentina existen diversas zonas geotermales que podrían resultar nichos adecuados para la búsqueda de extremófilos con posibles aplicaciones en procesos biohidrometalúrgicos. Más específicamente, en la provincia de Neuquén, la zona geotermal del volcán Copahue incluyendo la laguna interna del Volcán Copahue y la cuenca del Río Agrio, resulta una zona ideal para el aislamiento de microorganismos biolixiviantes y, en particular, con carácter termofílico (Chiacchiarini y col., 2010). Además, los cursos de agua de la zona presentan elevadas concentraciones de aniones y cationes similares a las que habitualmente se encuentran en los procesos de biolixiviación por lo que seguramente la biodiversidad del lugar ha desarrollado mecanismos de resistencia.

Los párrafos precedentes marcan la importancia de la búsqueda de nuevos consorcios de extremófilos, específicamente acidófilos y termófilos, que presenten capacidades biolixiviantes. El Parque Provincial Copahue se presenta como un lugar potencialmente adecuado para ello.

Tal cual se indicó previamente, la recuperación de cobre a partir de minerales sulfurados de baja ley es el objetivo central de las principales aplicaciones comerciales de la biolixiviación en el mundo. No obstante, la metodología es potencialmente aplicable para la recuperación de otros metales que se encuentran asociados a sulfuros en los minerales (y de hecho, existen algunas aplicaciones a escala piloto e incluso a escala comercial); entre ellos se destacan cobalto, níquel y cinc.

El cinc, metal quebradizo a baja temperatura pero dúctil y maleable entre los 100 y 150 °C, es usado principalmente en la galvanización del acero como protección contra la corrosión. Aunque tiene también aplicaciones en la industria farmacéutica y de cosméticos, su uso especialmente en la fabricación de automóviles hace su demanda fuertemente dependiente de los ciclos económicos. El cinc se recupera a partir de varios minerales entre los que se destaca la esfalerita (ZnS); también se explotan, aunque en menor proporción, la smithsonita (ZnCO_3) y la zincita (ZnO). En la industria se aplican sólo dos procesos para la producción de este metal a partir de esfalerita: RLE que incluye tostación, lixiviación y electrowining y un método hidrometalúrgico a alta presión (Harvey y Joubert, 2003) que ha ido ganando lugar hasta ser el método por el cual se produce más del 90 % del metal (Harvey y col., 2002; Asociación Internacional de Zinc, 2007). GeoBiotics y Kumba Resources han investigado la factibilidad de aplicación del proceso patentado como GEOCOAT[®] para la biolixiviación de minerales concentrados obtenidos a partir de menas de baja ley de cinc de la mina Rosh Pinah de Kumba Namibia (Sampson y col., 2005). No obstante, aún son necesarios mayores esfuerzos para mejorar la aplicación de la biohidrometalurgia para la recuperación de cinc a partir de minerales sulfurados de baja ley (Rodríguez y col., 2003). Argentina produce una cantidad significativa de cinc a partir de mineral extraído mayoritariamente en las provincias Jujuy y Chubut. La exportación de cinc hacia los mercados internacionales se incrementó en los últimos años y se supone que crecerá en el futuro próximo.

Debido a la importancia que podría tener para el país, resulta relevante realizar estudios sobre la factibilidad técnica y viabilidad económica de utilizar la biolixiviación, en particular con consorcios extremófilos nativos, como metodología extractiva para la recuperación de cinc a partir de minerales regionales.

El enorme crecimiento de los métodos biohidrometalúrgicos en los últimos 20 años, está directamente asociado a la posibilidad de utilizar el proceso de biooxidación como pre-tratamiento de minerales refractarios de oro y al incremento del precio de éste en el mercado (<http://minerals.usgs.gov>). A pesar del espectacular incremento del precio del metal, la producción mundial no ha crecido en la misma medida (Tabla 2).

Tabla 2. Producción mundial de oro y evolución del precio en el mercado durante los últimos años.

Años	Producción Mundial (ton)	Precio (US\$/ton) x 10⁶
2004	2420	13,2
2005	2470	14,3
2006	2370	15,8
2007	2360	17,6
2008	2260	21,2

Durante el siglo XX, Sudáfrica fue el primer productor mundial de oro; en la actualidad, otros países como China, Australia, Estados Unidos, Perú, Rusia, Indonesia y Canadá se disputan los primeros lugares. En Latinoamérica, Perú encabeza la producción de oro seguido por Chile, Brasil y México. La Argentina, si bien tiene reservas calculadas que la ubican entre los primeros lugares a nivel mundial, tiene una aún muy baja producción (Prado, 2005). En la actualidad se explotan sólo nueve yacimientos, otros cinco están en proceso de construcción y unos 140 en etapa de exploración; están ubicados fundamentalmente en las regiones de Cuyo, Patagonia y zona Andina Norte (<http://www.fundamin.com.ar>).

Debido a que el oro ha sido explotado intensamente, la mayoría de los yacimientos actuales son de muy baja ley y, de ellos, buena parte corresponde a minerales refractarios. Estos últimos tienen al oro disperso en pequeñas partículas (menores a 60 micrones) en una matriz que, usualmente, está constituida por sulfuros y arsenosulfuros. Si estos minerales no son pretratados para incrementar significativamente la exposición del oro, la recuperación del metal por cianuración es muy baja (30-40 % o inferior) (Frimmel, 2008; Logsdon y col., 1999; Ding y col., 2003; Dai y col., 2003; Marsden y House, 2006; Hilson y col., 2009; Ojeda y col., 2009).

La biooxidación ha demostrado tener importantes ventajas frente a otros métodos de pretratamiento como la tostación o la oxidación en autoclave. El proceso de biooxidación, realizado a temperaturas moderadas y por acción microbiana, es esencialmente un método eficiente, con relativamente bajos costos de instalación y operación, con menores demandas de energía y con bajo impacto ambiental (Brierley y Brierley, 1999; Olson y col., 2003; Gentina y Acevedo, 2005; Lee y col., 2010; Brierley, 2010; Komnitsas y Pooley, 1989; Longhans y Lampshire, 1995; Rawlings, 1997; Groudev y otros 2001).

Las reacciones que operan durante los procesos de biooxidación son altamente exotérmicas. Por lo tanto, el uso de microorganismos termófilos permite, en primera instancia, aprovechar la generación de energía durante los procesos y, en segundo lugar, disminuir los altos costos de enfriamiento que se ocasionarían si los tratamientos se efectuasen a menor temperatura (Norris y col., 2000; Acevedo, 2002; Ly Arrascue, 2005; Astudillo y Acevedo, 2009).

Por otra parte, debido a que el proceso de oxidación de pirita que conduce finalmente a la liberación del oro, se produce por el mecanismo vía tiosulfato, la presencia de hierro(III) en el sistema es absolutamente indispensable. De este modo, persiste el interés en desarrollar consorcios microbianos que tengan alta capacidad de oxidar hierro(II) para optimizar el proceso e incrementar el rendimiento total de extracción (Lindström y col., 2003; Ly Arrascue y van Niekerk, 2006; Schippers y col., 2008).

Debido a la importancia que podría tener para el país y específicamente a la región de la Patagonia (zona con recursos minerales con contenido importante en oro), resulta relevante realizar estudios sobre la factibilidad técnica y viabilidad económica de utilizar la biooxidación, en particular con consorcios extremófilos nativos, como tratamiento previo a la lixiviación por cianuración.

Uno de los principales problemas asociados con la minería metalífera es la generación de los drenajes ácidos de minas (DAM) o de rocas (DAR). Estos drenajes de muy bajo pH, alta concentración de hierro(III) y otros metales pesados, provoca un tremendo impacto ambiental en las zonas aledañas a emprendimientos mineros, minas abandonadas y residuos del procesamiento de minerales. La generación de los DAM está vinculada con la oxidación de sulfuros y, en particular, de sulfuros de hierro. Se ha comprobado que cuando el pH de los mismos es inferior a 3-3,5, hay inequívoca participación de microorganismos en la catálisis de dicha oxidación. Estos microorganismos son los mismos o similares a los que se han descrito previamente en este texto (Shokes y Moller, 1999; Sracek y col., 2004; Johnson, 2006; Akcil y Koldas, 2006; Hallberg, 2010).

La troilita es un sulfuro de hierro estequiométrico cuya composición química se ve representada por la fórmula FeS . Su estructura cristalina hexagonal y sin vacancias, le confiere carácter no magnético en contraposición a otros sulfuros, pertenecientes al grupo de la pirrotita ($\text{Fe}_{x-1}\text{S}_x$) cuyas estructuras, hexagonales o monoclinicas pero deficientes en hierro, los hacen marcadamente paramagnéticos. La asociación internacional de mineralogía considera a la troilita un mineral precursor de la pirrotita y, en cierto modo, puede ser clasificada como un politipo de la piritita magnética. De hecho, la troilita se puede transformar en piritita magnética hexagonal a una temperatura de 122 °C (King y Prewitt, 1982, Skala y col., 2006). La troilita suele presentarse diseminada en otros minerales, formando multicapas intrusivas en rocas ultramáficas del grupo de las serpentinas. Generalmente está asociada a otros sulfuros de hierro como pirrotita, piritita, marcasita, arsenopiritita y mackinawita. La troilita es muy abundante en meteoritos y, en especial, aquellos originados en la Luna y en Marte. Además, ha sido reportada como uno de componentes mayoritarios en los sulfuros de hierro que constituyen a otros cuerpos celestes como los satélites de Júpiter, Gamínides y Callisto (Yanai, 1997; Garrick-Bethell y Weiss, 2010; Rochette y col., 2010). En la Figura 2 se muestra la distribución global de los principales lugares donde se ha reportado troilita, ya sea como parte de yacimientos mineralógicos terrestres o de meteoritos y rocas provenientes del espacio exterior. Estos datos han sido recopilados en la base de datos mindat.org (<http://www.mindat.org/min-4029.html>). En la Argentina se ha detectado troilita en los meteoritos esparcidos en Campo del Cielo (Bunch y col., 1970), en las rocas

condoríticas de la Pampa del Infierno (Boctor y col., 1982), localizadas en el Gran Chaco, de la provincia homónima y, por último, diseminada en los yacimientos Sampil III en Nueva Lubuka, provincia de Chubut.

Figura 2. Mapa con los principales sitios donde se ha reportado la presencia de troilita según los registros de la base de datos mindat.org

La troilita acompaña otros sulfuros de hierro cuya oxidación es la principal fuente de los DAM; no obstante, no existen estudios concretos realizados con este mineral que lo demuestren inequívocamente (Moller, 1999; Sracek y col., 2004; Johnson, 2006; Akcil y Koldas, 2006; Hallberg, 2010). En general, se le ha dado mayor importancia a los disulfuros de hierro como pirita y marcasita (FeS_2) que a los monosulfuros (Fe_{1-x}S) como la troilita, mackinawita y pirrotita. La troilita suele presentar un número mínimo de átomos de hierro en defecto respecto del azufre y además puede tener imperfecciones en su superficie tales como enlaces S-Fe truncados, deficiencias de hierro, especies oxidadas de hierro y/o azufre, etc. que, en conjunto, facilitan los procesos de solubilización (Pratt y col., 1994; Skinner y col. 2004). La disolución anóxica de la troilita depende de la concentración de protones, indicando de este modo su capacidad de disolverse en medio ácido (Chiriță y Descostes, 2006^a), su oxidación aeróbica también implica la oxidación de azufre en la capa superficial (Chiriță y Descostes, 2006^b). Se ha también reportado la presencia de azufre dentro de estructura

cristalina de la troilita (Thomas y col., 2003). Por lo tanto, no sólo los microorganismos hierro oxidantes, sino también los microorganismos azufre oxidantes pueden ser perfectamente capaces de disolver este mineral, ya sea a través de la generación de un oxidante como el hierro(III), de la oxidación directa del azufre presente en la estructura o por la formación de ácido sulfúrico a partir del azufre depositado una vez que el hierro(III) haya oxidado al sulfuro.

Debido a que es bastante común que la troilita esté presente en ambientes naturales en los que también se encuentran microorganismos acidófilos, se considera importante estudiar la influencia de consorcios extremófilos en su disolución y, decidir de ese modo, si dicha disolución podría contribuir a la formación de drenajes ácidos de minas.

OBJETIVOS

En base a lo discutido previamente, el **Objetivo General** de este Trabajo de Tesis cubre un aspecto que se considera relevante tanto desde el punto de vista básico como aplicado. El mismo consiste en la búsqueda de consorcios extremófilos dentro del Campo Geotermal Copahue, el análisis de sus potencialidades lixiviantes medido de acuerdo a las capacidades de oxidar hierro(II) y azufre elemental y su posterior uso en procesos de biolixiviación y biooxidación sobre minerales de interés esencialmente regional. En el caso de la biolixiviación, se apuntó a la recuperación del cinc, un metal para el cual todavía el proceso no ha llegado a escala comercial; también se decidió utilizar los consorcios en procesos de biooxidación de minerales de oro ya que éstos siguen siendo la aplicación biohidrometalúrgica de mayor relevancia a escala comercial.

Los **Objetivos Específicos** se detallan a continuación:

- 1) Relevar consorcios extremófilos en el Campo Geotermal Copahue con especial énfasis en termófilos
- 2) Seleccionar consorcios con capacidad de oxidar azufre y/o hierro(II) bajo condiciones autótrofas o heterótrofas
- 3) Realizar presión selectiva sobre estos consorcios para seleccionar aquellos altamente resistentes a condiciones fuertemente ácidas
- 4) Caracterizar fisiológica y molecularmente los consorcios seleccionados
- 5) Utilizar los consorcios seleccionados en la biolixiviación de un mineral sulfurado para incrementar la recuperación de cinc
- 6) Utilizar los consorcios seleccionados para analizar su influencia en la disolución de un sulfuro de hierro (troilita), potencialmente importante en la generación de drenajes ácidos de minas y de rocas
- 7) Utilizar los consorcios seleccionados para la biooxidación del concentrado de un mineral refractario de oro

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La organización de este Trabajo de Tesis se ha hecho en capítulos. En el Capítulo 1 se presenta una pormenorizada descripción de los sitios de muestreo, abarcando aspectos relacionados a la ubicación geográfica, características geológicas y determinación de los parámetros fisicoquímicos reinantes en esos ambientes. Las mediciones se realizaron durante las campañas de muestreo llevadas a cabo en diferentes épocas del año, lo cual ha permitido analizar la variación estacional de las principales variables (pH, T, salinidad, concentración de metales) que gobiernan el desarrollo de la biota en el entorno.

El Capítulo 2 describe las estrategias y protocolos utilizados para obtener consorcios microbianos adecuados para ser aplicados en los procesos de biolixiviación y de biooxidación. Los ensayos experimentales se focalizaron en conseguir las cepas de interés forzando las condiciones fisicoquímicas para que la presión de selección permita obtener cultivos acidófilos con potencialidad para oxidar hierro(II) y/o azufre.

El Capítulo 3 presenta las técnicas moleculares aplicadas para caracterizar a los microorganismos presentes tanto en los cultivos de enriquecimiento, preponderantemente compuestos por bacterias o archaeas termófilas moderadas o extremas con capacidades metabólicas para oxidar hierro y azufre, como así también a los cultivos puros que consiguieron ser aislados a partir de los primeros.

El Capítulo 4 se dedica al análisis de los ensayos de biolixiviación del mineral de La Resbalosa (Neuquén, Argentina) utilizando consorcios termófilos, para la recuperación de cinc. La realización de estos ensayos estuvo alentada por la creciente demanda a nivel mundial de extender la aplicación de las técnicas biohidrometalúrgicas a otros minerales de baja ley con contenido en metales diferentes al cobre para el cual la metodología se aplica comercialmente.

El Capítulo 5 incluye diferentes ensayos de biooxidación realizados sobre minerales concentrados en la planta de tratamiento de la empresa Andacollo Gold SA. La provincia de Neuquén cuenta con importantes recursos minerales, en general, y metálicos en particular; sin embargo, el único emprendimiento activo en la producción metalífera se emplaza en la localidad de Andacollo con una planta de tratamiento para la concentración de metales preciosos (oro y plata), procesando un mineral con alto contenido de pirita que encapsula a los metales. Los minerales provenientes de la mina

Sofía fueron tratados con consorcios termófilos a 70°C mientras que para la mina Buena Vista la biooxidación se efectuó con cultivos mixtos de bacterias y archaeas termófilas moderadas.

El Capítulo 6 describe la acción de los consorcios termófilos para facilitar la solubilización de un sulfuro de hierro estequiométrico denominado troilita. La troilita es un mineral presente en diferentes ambientes naturales y el estudio de la influencia microbiana en su disolución (que no ha sido estudiada explícitamente hasta el momento) podría contribuir a la comprensión de los procesos que generan los drenajes ácidos de rocas y minas que constituyen probablemente el mayor impacto ambiental provocado por las actividades mineras.

Por último, se dedica un espacio a comentar las principales conclusiones y aportes que ha producido este Trabajo de Tesis Doctoral y se describen los lineamientos futuros que se derivan de este trabajo.

CAPÍTULO 1

SISTEMA GEOTERMAL

COPAHUE

Descripción de sitios de muestreo

La región geotermal del volcán Copahue, localizada en la provincia de Neuquén-Argentina, se seleccionó como área de estudio debido a las particulares características fisicoquímicas de su ambiente. Las mismas son producto de diferentes sucesos naturales, de origen fluvial, glacial o volcánico, que modelaron el paisaje (González Díaz, 2005). Esta zona forma parte del Parque Provincial Copahue que fue declarado Área Protegida en 1963 a través del Decreto Ley Provincial 387/63, con la finalidad de proteger las condiciones naturales de la región y preservar las especies y la diversidad genética. La Figura 1.1 muestra un esquema de la zona estudiada.

Figura 1.1. Esquema simplificado del sistema geotermal Copahue-Caviahue y localización aproximada de los puntos de muestreo

El parque abarca un reducido sector de la Cordillera Norpatagónica, localizado en el departamento neuquino de Ñorquín, encuadrado entre las coordenadas 37° 47' y 37° 55' latitud S y 70° 55' y 71° 10' longitud O con una superficie total de 28.300 ha. En su extensión se destacan algunos puntos geográficos que fueron seleccionados para realizar este estudio: el volcán Copahue, el Río Agrio, el Lago Cavihue y los campos geotérmicos de Copahue, Las Maquinitas y Las Máquinas. Una breve descripción de los aspectos asociados a la génesis geológica, morfología o condiciones fisicoquímicas de

estos ambientes, contribuirá a formar una imagen de la zona e inferir las razones que motivaron la elección de los diferentes sitios de muestreo.

1.1. Volcán Copahue y laguna del cráter (LV)

El volcán Copahue ($37^{\circ} 51' S$ y $71^{\circ} 10' O$) con una altitud de 2977 m sobre el nivel del mar, forma parte del Complejo Efusivo Copahue-Caviahue. Esta estructura constituye una porción del arco volcánico activo andino con una extensión de aproximadamente 220 km y delimitada, al norte por los lineamientos de Navahue, al sur por los lineamientos de Pino Hachado, al oeste por la cuenca superior de los ríos Bio-Bio y Aluminé (en Chile) y al este por las nacientes del río Agrio y el Valle de Loncopué (Folguera y Ramos, 2000). La evolución del Complejo Efusivo Copahue-Caviahue comenzó con actividad volcánica en el Mioceno superior (Muñoz Bravo y col., 1989) y continúa hasta el presente (Mas, 1993; Delpino y Bermúdez 1993; Varekamp y col., 2001).

El complejo efusivo está formado por una espesa secuencia de rocas terciarias de edad Pliocena, sobre la que se superponen diferentes episodios volcánicos acaecidos entre el Pleistoceno Temprano y el Holoceno,

El basamento del conjunto está representado por la Formación Hualcupén constituida por basandesitas y andesitas e intercalados con rocas piroclásticas (edad 4,3 ma, Plioceno inferior), Posteriormente, se produce la formación de una extensa caldera de forma oblonga de una superficie de 300 km^2 aproximadamente; como proceso final asociado a la apertura de la caldera se depositaron tobas de la Formación Riscos Bayos (edad 2,05 ma, Plioceno tardío),

A continuación se sucedieron tres estadios efusivos: el primero de ellos de gran desarrollo areal e integrado por andesitas y dacitas (edad Pleistoceno); el segundo asignado al Pleistoceno Temprano (1,4 ma) litológicamente representado por andesitas designadas con el nombre Derrames de Fondo de Valle; el tercer estadio efusivo acaecido desde el Pleistoceno Temprano al Tardío (1 ma), es representado por el Volcán Copahue (Figura 1.2). La actividad continuó hasta el Holoceno-Reciente imprimiéndole así la geomorfología del paisaje regional que se observa en la actualidad (Pesce, 1989; Mas, 1993; Delpino y Bermúdez, 1993; Folguera y Ramos, 2000).

El volcán Copahue se encuentra en el extremo sudoeste de la caldera del Agrio (Pliocena). Esta estructura es parte de una serie de formas cuadrangulares alineadas con el arco volcánico cuaternario y que está controlada por dos juegos de fallas (N 70°O y N 30°E) que establecen una zona deprimida de 20 por 15 km. En el interior de la misma se desarrollaron grábenes (fosa tectónica) de orientación N 70°O, pliegues y fallas inversas de orientación N 60°E, Alineadas según el rumbo N 40°O y asociados a este tipo de estructuras, se observan manifestaciones termales activas tales como fumarolas, manantiales calientes, conos de barro, olletas y lagunas, agrupadas en cinco zonas principales: Centro Termal Copahue, Las Máquinas, Las Maquinitas, Anfiteatro y Chanco-Co, esta última en territorio chileno, Todas ellas se hallan sobre el horst (pilar tectónico) ubicado al noreste del Volcán Copahue y están vinculadas a las estructuras de callamiento. En este horst existe un sistema de fallas subparalelas de rumbo N55°E; en la parte central del mismo, estas estructuras habrían actuado como pasajes de fluidos en las manifestaciones termales.

Las rocas del cono del volcán Copahue son mayormente lavas andesíticas, piroclastitas y basandesitas potásicas y el rasgo más sobresaliente es su cráter activo, de forma circular y unos 450 m de diámetro. Este, a su vez, contiene la laguna del volcán (LV), de 250m de diámetro, profundidad desconocida, caracterizada por sus aguas ácidas y azufre elemental flotando en su superficie (Figura 1.2).

El nivel de la laguna no se ha mantenido estable a lo largo del tiempo: los autores Bermúdez y Delpino (2002) registraron una disminución de 50 m en el nivel después de la erupción de 1993 y describieron la desaparición del agua durante la erupción del 2000, considerada la de mayor intensidad y duración de la historia. El agua de la laguna tiene notorias diferencias en su composición con las del resto de la región (termales o no), por su elevada mineralización y altas concentraciones de cloruro y ácido clorhídrico. Su origen es esencialmente meteórico (lluvias, fusión de hielo y nieve); los gases volcánicos (sulfuro de hidrógeno, dióxido de azufre, amoníaco, cloro, etc.) de las fumarolas causan su mineralización y los metales como hierro, calcio, magnesio y aluminio, provienen de la alteración de las volcanitas del zócalo del volcán al reaccionar con los gases volcánicos y fluidos hidrotermales. La marcada acidez del agua varía en un rango de pH ~ 0,2 - 1,1; en cambio, los registros de temperatura reportados en la última centuria han abarcado un amplio rango de valores (13,8-100°C) dependiendo de la temporalidad del registro respecto a un período eruptivo y nivel de agua de la laguna

(González Díaz, 2005; Caselli y col., 2005; Varekamp y col., 2009), Masas de hielo de reducidas proporciones cubren actualmente la cima del volcán. Existe un glaciar de unos 100 m de espesor (Delpino y Bermúdez, 1993) que se desplaza hacia el oeste desde la cumbre y que alcanza el borde del cráter activo (Figura 1.2), ya que contribuye con su fusión al aporte de aguas meteóricas a la laguna.

Figura 1.2. Fotos del Volcán Copahue con vistas del glaciar que corona su cima y de la laguna que está alojada en el cráter

1.2. Río Agrio y Lago Caviahue

Otras manifestaciones en superficie del extenso sistema hidrotermal, volcánico-magmático de la región, son las dos vertientes, norte y sur (VN y VS con pH 0,3-2,3) de aguas ácidas y calientes que surgen aproximadamente a 100 m por debajo del nivel de la laguna del cráter, en la ladera este del volcán Copahue (Figura 1.3). La vertiente sur alimenta al Río Agrio y se considera su nacimiento; este punto se denomina El Vertedero (código de muestreo NA) y aguas abajo se localizó el punto de muestreo código VA1.

Figura 1.3. Vertientes hidrotermales Norte y Sur en la ladera del Volcán Copahue que aportan sus aguas al Río Agrio, Neuquén Argentina.

La temperatura, pH, contenido de sales y composición isotópica de las vertientes, son variables en el tiempo y difieren de los valores medidos en la laguna del volcán. Si bien las tres fuentes tienen un alto contenido de aguas meteóricas, reciben

pulsos de gases volcánicos, ricos en azufre, y fluidos magmáticos, con alto contenido de aniones y cationes, que varían de acuerdo a los ciclos eruptivos del volcán Copahue. Otra fuente de variación en la composición química del agua de las vertientes está asociada a los cambios en el caudal de las mismas, producto de los diferentes aportes de agua por deshielo o precipitaciones de acuerdo a las medias estacionales (Varekamp y col., 2004; Parker y col., 2008; Varekamp y col., 2009; Chiacchiarini y col., 2009).

Los cursos de agua originados en ambas vertientes se unen en un punto denominado unión de vertientes (UV) para consolidar, de esta forma, el curso superior del Río Agrio. El río completa su recorrido por la ladera Este del volcán, formando una serie de saltos y cascadas, entre las que se destacan las cascadas Gigante (CG), Culebra (CC), Cabellera de la Virgen (CCV) y Basalto (CB) (Figura 1.4). El Río Agrio Superior recibe en su recorrido tres afluentes, el Río Blanco, el Río Rojo y el arroyo Jara, antes de descargar sus aguas en el ácido Lago Caviahue (LC).

Figura 1.4. Enmarcada con araucarias, vegetación típica de la zona, se encuentra la Cascada del Gigante y parte del río Agrio con aguas turbias y de color verdoso. A la derecha, la Cascada de La Culebra (la aridez de las márgenes del río es consecuencia de la acidez del agua, con pH~2)

La laguna del cráter (LV), ambas vertientes (VS y VN) y algunos sitios en el curso del Río Agrio Superior (CG, CC, CCV), fueron seleccionados como sitios de muestreo, debido a los parámetros físico-químicos de sus aguas y a las características de los precipitados y/o depósitos sobre las márgenes y lecho.

El lago Caviahue, de origen glaciario, está situado a 1600 m.s.n.m y a 37° 53' de latitud S y 71° 02' longitud O. En su margen oeste se emplaza la localidad homónima, una pequeña villa con una población estable de aproximadamente 1200 habitantes, con gran afluencia de turistas durante las temporadas de invierno (deportes de nieve) y verano (termalismo). El lago Caviahue (LC, pH~2,1-3,7) tiene forma de herradura, sus aguas se distribuyen en dos brazos, Norte y Sur (Figura 1.5). Las dimensiones del lago son las siguientes: $L_{\max} = 9,75 \text{ Km}$, $A_{\max} = 4,72 \text{ Km}$, $h_{\max} = 100 \text{ m}$, $h_{\text{media}} = 51,4 \text{ m}$, $\text{Area} = 9,22 \text{ Km}^2$, $\text{Volumen} = 0,474 \text{ Km}^3$. El Lago Caviahue tiene dos afluentes principales, el Río Agrio Superior (RAS; pH~0,5-2,5) y el Río Dulce (pH~7) y un efluente Río Agrio Inferior (RAI; pH~2,1-6,0) (Varekamp, 2004; Pedrozo y col., 2008; Chiacchiarini y col., 2009).

Figura 1.5. Vista de Lago Caviahue desde la costa y desde la cima del volcán Copahue. En esta última imagen se puede inferir la forma de herradura característica del lago

La dinámica de las aguas del lago, como la de diferentes iones (metálicos o no) y la de compuestos orgánicos e inorgánicos de potencial toxicidad, fueron estudiadas por diferentes autores (Rapacioli, 1985; Varekamp, 2003; Parker y col., 2008). Los estudios mostraron que el lago Caviahue no presenta estratificación química pero si tiene una marcada estratificación térmica estacional: la temperatura en verano alcanza los 17 °C en superficie mientras que el fondo solo llega a 6,5 °C; por otra parte, en invierno la masa de agua se encuentra totalmente mezclada y la temperatura oscila entre 3,5 a 5,0 °C. Del análisis de los parámetros de los flujos aportados por los afluentes, aquellos autores

reportaron que este lago ácido aún no ha alcanzado el estado estacionario para los iones cloruro, sulfato y magnesio, mientras que difirieron en los cálculos de los tiempos de residencia para iones y agua, debido a que esos valores son dependientes de los caudales de ingreso, los cuales a su vez varían en el tiempo.

El Río Agrio es también el efluente del lago Caviahue; a este tramo del río se lo conoce como Río Agrio Inferior (RAI) y a pocos kilómetros de su embocadura da un salto espectacular denominado Cascada del Salto del Agrio (Figura 1.6).

Figura 1.6. A la izquierda se observa una vista del curso del Río Agrio, aguas arriba del Salto del Agrio (imagen de la derecha). Abundantes precipitados de hierro cubren el lecho y márgenes del río, especialmente hacia finales del verano donde el caudal del Río Agrio está en su cota más baja

En la zona comprendida entre el lago Caviahue y la desembocadura en el Río Neuquén (aproximadamente 400 Km), el RAI recibe aguas de arroyos de mediana importancia, destacándose los arroyos Yumu Yumu, Codihue y Huarenchenque y el Río Ñorquín. La acidez del RAI disminuye a medida que recibe el aporte de ríos, arroyos y aguas provenientes de los mallines de la región hasta alcanzar la neutralidad, La distancia desde la naciente hasta donde alcanza pH ~7, es variable (~40Km) y depende en gran parte del caudal de los tributarios y sus variaciones estacionales (Pedrozo y col., 2001; Parker y col., 2008; Pedrozo y col., 2008; Varekamp y col., 2009). Debido a que

las condiciones de pH y temperatura reinantes en el RAI no se corresponden con las de interés, no se establecieron puntos de muestreo en su recorrido.

1.3. Campo Geotérmico Copahue

El gobierno de la provincia de Neuquén propició el estudio del reservorio con la finalidad de aprovechamiento geotérmico (JICA-EPEN, 1992). Los trabajos incluyeron la perforación de pozos profundos que confirman la presencia de un tipo de reservorio de vapor dominante donde la presión está regida por un sistema bifásico (líquido-vapor). Se propone que los fluidos ascienden por sistemas de fallas activas interconectadas en el reservorio. El análisis isotópico sobre agua y vapor, los gases asociados, así como el estudio de relación gas/vapor, permitió probar la existencia de, al menos, dos capas productivas; la más superficial, ubicada entre los 800 y 100 m de profundidad y la más profunda, alrededor de los 1400 m. Las temperaturas, tanto geoquímicas como isotópicas, se encuentran entre 200 y 250 °C respectivamente y el análisis del isótopo de carbono (número másico=13), nitrógeno, argón y helio, permitió caracterizar a esos gases como de origen principalmente magmático (Panarello, 2002).

Mas (1993), Mas y col. (1993), Mas y col. (1996a; 1996b), y Mas y col. (2000) analizaron en detalle la mineralogía de alteración de las rocas en 6 áreas superficiales y establecieron en las perforaciones la zonación vertical de los minerales arcillosos que se relacionan con los gradientes de temperatura, Maiza y Mas (1980) estudiaron la síntesis de minerales de la serie alunita-natroalunita y aportaron metodologías para su identificación.

La composición química de las aguas de surgentes calientes fue determinada en el estudio de JICA en el que definen dos tipos principales, bicarbonatadas en la villa de Copahue y sulfatadas en los otros centros. En general, las aguas calientes no tienen origen profundo según se deduce de su composición química e isotópica. Son aguas de un acuífero libre superficial que aumentan su temperatura por pasaje de gases calientes provenientes del reservorio geotermal (Panarello, 2002), Vallés y col. (2004) establecieron que la mayoría de las aguas en contacto con los fangos son ácidas, presentando las mayores concentraciones de iones (altos valores de conductividad), mientras que las de los surgentes calientes son en su mayoría neutras con menores cantidades de electrolitos presentes representados por sus bajos o intermedios valores de

conductividad, Respecto de los fangos, Vallés y col. (2004) establecen su composición mineralógica. En las lagunas de la villa predomina el azufre alfa mientras que la alunita y los minerales arcillosos son más frecuentes en las otras zonas, Su origen se atribuye a la alteración ácida de las rocas hospedantes.

De las cinco zonas con actividad geotérmica mencionadas más arriba, sólo se consideraron para establecer los sitios de muestreo a Las Maquinas (LMa), Las Maquinitas (LMi) y Termas de Copahue dejando para futuros trabajos El Anfiteatro y Chanco-Co,

Las Máquinas

El sector denominado Las Máquinas, distante 2,2 Km al SSE de la villa Copahue, se seleccionó por sus condiciones fisicoquímicas pero también por ser el sitio menos afectado por obras de infraestructura y actividades antrópicas ya que hace tiempo no se usa para baños termales públicos. Las instalaciones (de uso y propiedad de Gendarmería) hoy están derruidas y abandonadas.

Las manifestaciones geotermales de Las Máquinas se encuentran en una depresión en forma de herradura circundada por elevaciones de lavas andesíticas. Corresponde a una expresión geomorfológica negativa originada por la erosión de las rocas que sufrieron intensa alteración. Supera ligeramente las 20 Ha y está surcada por un arroyo que se inicia a pocos metros al NE por el rebalse de la laguna Las Mellizas.

Dentro de esta depresión se observan numerosas fumarolas, algunas con vapor a alta presión, surgentes calientes y pequeños cursos de agua que emanan de estos surgentes. En el sector Norte, en el centro de la depresión, se destaca una laguna caliente de 480 m² originada por el endicamiento artificial de los fluidos mediante paredes de concreto. Dentro de ella, se observan el fango de color grisáceo oscuro prácticamente llegando a la superficie, pocos centímetros de agua sobrenadante y burbujes constantes de vapor y gases (Figura 1.7).

Figura 1.7. A la izquierda, laguna principal de agua caliente (34 °C; pH~3,0) en el sector denominado Las Maquinas. A la derecha, fumarolas y olletas a la orilla del arroyo que cruza por el centro de esta depresión y que proviene de las Lagunas Las Mellizas

Las rocas que circundan el área de alteración son andesitas de coloraciones oscuras, de grano muy fino y textura porfírica hialopilitica, con fenocristales de plagioclasa bitownita predominante, olivinos y escasa hornblenda. El análisis químico de elementos mayoritarios de estas rocas permite incluirlas en una asociación magmática de carácter calco-alcalino. Alrededor de la laguna principal, se encuentra un halo de máxima alteración de las rocas antes descriptas, cuya intensidad decrece alejándose de la misma. En esta zona, los materiales son de aspecto terroso, friable y sus colores varían de ocre a blanquecinos. Las tonalidades ocre generalmente siguen la fracturación de la roca. En la alteración de Las Máquinas no se ha encontrado haloisita; tampoco existen indicadores de mayor temperatura como pirofilita o politipos de la caolinita como dickita y nacrita. Al comparar con rangos de estabilidad de minerales hidrotermales deducidos de estudios geotermales y recopilados por Hedenquist y col. (1996), se estima entonces que la alteración de las rocas se produjo a temperaturas inferiores a 200 °C. Los minerales encontrados en el fango, satisfacen los requerimientos de estabilidad termal y son compatibles con las soluciones en contacto. El carbono detectado en el análisis químico es atribuible a un origen biológico, ya que no se encuentran minerales que contengan este elemento o las emanaciones de gases magmáticos. Sobre las paredes de las fumarolas se forma azufre y pirita cristalizada; también se encuentra hematita y jarosita en la superficie de las olletas (Valles y col., 2005).

Las Maquinitas

Esta es la menor de las manifestaciones termales en el campo geotérmico Copahue. Consiste en dos pequeñas depresiones localizadas a diferentes alturas a lo largo de las fallas NE-SO. Actualmente sólo una depresión está activa y los fluidos de descarga no exceden los 92°C (temperatura de ebullición del agua a la altitud a la que se encuentra el campo). Los vapores sobrecalentados, con una temperatura de 132 °C, han podido ser determinados en algunas de las fumarolas y respiraderos que se abren paso entre las rocas dejando depósitos visibles de azufre cristalizado en la superficie mas fría de las paredes de estas chimeneas. Sílice amorfa es el material más abundante en las alteraciones minerales. Está presente como tridinita parcialmente cristalizada y cristobalita. Hay también algo de cuarzo y cantidades variables de caolinita y alunita, los depósitos grises precipitados en los barroes denotan pirita (Mas y col., 1996). Panarello (2002) reportó la composición de los gases de las fumarolas, habiendo detectado los siguientes, todos de origen magmático y ordenados en forma decreciente de importancia: dióxido de carbono, nitrógeno, metano, hidrógeno, argón, helio y monóxido de carbono.

Figura 1.8. Campo geotérmico Copahue, sector Las Maquinitas. A la derecha se aprecia el área acondicionada para baños termales al aire libre; a la izquierda, zona que se reserva para vapores aprovechando las emanaciones de las fumarolas con grandes desprendimiento de gases sulfurados

Actualmente la topografía de zona de Las Maquinitas (Figura 1.8) ha sufrido modificaciones. Durante los últimos años se han realizado trabajos de movimientos de suelos y reordenamiento de rocas para permitir el acceso de bañistas que utilizan los beneficios del termalismo para sus problemas de salud y/o tratamientos cosméticos.

Termas de Copahue

Las denominadas Termas de Copahue, localizadas en la pequeña villa homónima, constituyen la mayor manifestación termal dentro de este campo geotérmico. Debido a su uso como baños públicos desde hace más de un siglo, ha sufrido constantes modificaciones con el objetivo de construir y adaptar diferentes instalaciones a los requerimientos de lugareños y turistas que llegan de todas partes del país para recibir tratamientos médicos (baños en piletas de agua caliente, aplicación de barro e inhalación de vapores).

Las zonas de alteración de los minerales en las Termas de Copahue consisten principalmente de arcillas blancas y amarillas y se distribuyen desde el centro de la depresión hasta la pared sur. La extensión, zonación y mineralogía, no ha podido ser estudiada en detalle debido a que ha quedado sepultada bajo las continuas construcciones que permitieron el desarrollo urbano de la villa Copahue. Por esta causa, se han originado algunas zonas de anegamiento que constituyen lagunas artificiales: Laguna Sulfurosa, Laguna del Chanco, Baño 9, Laguna de las Algas y Laguna Verde (Figura 1.9). Aunque las tres primeras lagunas tienen gran cantidad de azufre coloidal disperso y puede observarse emanaciones de gases en forma continua, todas presentan sus particularidades fisicoquímicas (pH, T, conductividad, tipo y concentración de iones, etc.) que le imprimen especiales atributos al agua que contienen y las hace aptas para diferentes usos medicinales (Monasterio, 2008; Monasterio y Grenovero, 2008; Armijo y col., 2008; Ubogui, 2008).

La Figura 1.9 (derecha) muestra parte de la Laguna Verde, dividida por un terraplén y puente en dos sectores. Este y Oeste; el color verde se debe a la presencia de microalgas. A la izquierda se observa la Laguna Sulfurosa y una pileta menor donde se desarrollan algas filamentosas. El agua de ambas lagunas se utiliza para baños de

inmersión en el interior del complejo sanitario cuyas instalaciones se ven en el fondo de la imagen.

Figura 1.9. Laguna Verde y Laguna Sulfurosa emplazadas en la villa Copahue

Figura 1.10. Foto panorámica del sector denominado Baño 9; la zona anegada constituye la laguna principal del área, exponiendo sus márgenes con rocas alteradas por los fluidos hidrotermales calientes y ácidos. También se aprecian desprendimientos de gases burbujeando en los barro.

El sector de baños termales denominado Baño 9 (B9) (Figura 1.10) es particularmente interesante debido a que presenta variados rangos de pH (2-7) y temperatura (15-90 °C).

La zona B9 se encuentra surcada por pequeños cursos de agua, fumarolas y pozos donde emanan gases. Los barros presentan diferente grado de alteración, y en la zona central de B9 se ha construido una pileta artificial para permitir el almacenamiento de aguas y la maduración de barros; este pequeño dique provee de material (agua y barro) para los tratamientos médicos y estéticos que se realizan en el complejo medicinal de la Villa Copahue.

El Agua del Limón (AL), Figura 1.11, es un área de fumarolas y surgentes de carácter ácido sulfático, ubicado en el extremo Este de las Termas.

Figura 1.11. Sector denominado Agua del Limón, Se observan los diferentes minerales que afloran en las zonas de alteración ácida. Además se puede observar en detalle un respiradero con emanación de vapores y gases que condensan en las rocas y sobre la superficie fría de la espátula dejando cristales de azufre fibroso de color amarillo característico

Agua del limón es la zona menos afectada por las construcciones de la villa, de modo que el terreno se presenta casi en su estado natural. Allí se observan en la parte

más externa, afloramientos de rocas volcánicas; hacia el centro, con relieve topográfico de lomas suaves y redondeadas, se encuentra una zona de intensa alteración hidrotermal argílica de colores blanco, amarillento y anaranjado. Los minerales constituyentes principales son caolinita y alunita, y en menores proporciones jarosita y azufre cristalizado en las piedras de los respiraderos. Se encuentran también venillas y costras de material silíceo, y diferentes proporciones de cuarzo, cristobalita y anastasa, entre los minerales descritos. Esta asociación de alteración de bajo pH se produce por la liberación de gases ácidos, principalmente dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno.

En general, la temperatura de las aguas es variada; hay olletas que están a temperatura ambiente y con valores de pH ácidos, mientras que en otras, donde las temperaturas son cercanas a la ebullición, se encuentran valores de pH próximos a la neutralidad. Se destaca la presencia de sales disueltas en las aguas surgentes que le confieren a los sistemas una alta conductividad (Mas y col., 1996; Valles y col., 2005).

1.4. Caracterización físico-química de los puntos de muestreo

Durante este Trabajo de Tesis, se realizaron diferentes campañas de muestreo. Se tomaron varias muestras de cada sitio para obtener puntos representativos de las diferentes condiciones ambientales que presenta el parque en su conjunto. La biodiversidad se manifiesta con cierta riqueza a pesar de las condiciones extremas del ambiente: en muchos lugares pueden observarse algas, hongos, líquenes y biofilms de aspectos diferentes, que hacen presuponer que una variedad de especies unicelulares y pluricelulares comparten el hábitat.

La caracterización físico-química de los distintos lugares de muestreo se llevó a cabo a través de mediciones a campo de algunos de los parámetros y de determinaciones analíticas en el laboratorio para establecer las concentraciones de aniones y cationes de interés. Se determinaron los valores de pH, T, y conductividad, como parámetros físico-químicos. La detección y medida de la concentración de diversos cationes metálicos se realizó por espectrofotometría de absorción atómica usando un equipo Metrolab 250^a. La cuantificación de hierro (II) se realizó por el método espectrofotométrico de la o-fenantrolina. La determinación de aniones se realizó por diferentes técnicas según el caso; se ensayaron sulfatos por nefelometría con cloruro de bario, cloruros por volumetría con nitrato de plata, carbonatos y bicarbonatos por volumetría con ácido

clorhídrico. Todas las técnicas utilizadas se encuentran descriptas en el manual de métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (APHA, AWWA, WPCF, 1992). Por otra parte, aniones como nitrato, nitrito y sulfuro fueron determinados semi cuantitativamente con kits específicos de marca Merck.

Las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3 muestran los valores de los parámetros medidos durante dos campañas de muestreo llevadas a cabo durante los meses de diciembre del 2007 y abril del 2008 y la localización de algunos de los puntos de muestreo más representativos de cada área estudiada. De este modo, se puede observar en cada medición, la variación característica asociada a la diferencia de caudal de las aguas superficiales que fluctúan según el régimen pluvial y nival en el período estival, Las principales características, que focalizan el interés para desarrollar el presente trabajo en estos ambientes extremos, son sus bajos pH, altas temperaturas y elevada concentración de metales.

En las diferentes áreas del Campo Geotérmico Copahue, ya sea el sector de Termas de la villa homónima, Las Maquinas, Las Maquinitas o la cuenca del río Agrio, se pueden encontrar una variedad de combinaciones de valores pH-T en los diferentes pozos, lagunas, cursos de agua, surgentes de aguas y con vapor, etc., que marcan la complejidad del sistema. Sin embargo, como este trabajo está focalizado en la detección de microorganismos termófilos acidófilos, se ha restringido la selección de muestras a aquellos sitios que presentaban pH ácido y, en general, se han descartado aquellos puntos de muestreo con alta temperatura y pH cercano a la neutralidad.

La Laguna del Volcán y el Río Agrio Superior son ejemplos representativos de los ambientes más extremos del parque, caracterizados por muy bajos valores de pH, elevada temperatura y alta concentración de metales pesados. Existe un gradual cambio de todos los parámetros, haciéndose más moderados, a medida que el Río Agrio fluye aguas abajo hacia el Lago Caviahue. Los aportes de caudal atribuibles a varios afluentes, como los ríos Rojo, Banco y Jara, y a la descarga gradual de aguas provenientes de mallines y deshielo, van modificando las condiciones físico-químicas del sistema amortiguando la agresividad del mismo y brindando así condiciones más moderadas que seguramente permiten albergar mayor riqueza biológica. Existe una fuerte diferencia estacional en la concentración de metales en un mismo sitio de muestreo (Tabla 1.3), Otros metales trazas, tales como plomo, cinc, cobre, níquel, cobalto y cromo, se determinaron en todos los puntos. Sin embargo, sólo alcanzaron concentraciones

detectables en el Río Agrio Superior (0,8; 2,5; 0,5; 0,6; 0,13 y 1,2 mg.L⁻¹ respectivamente para los metales antes mencionados). Por otro lado, la concentración de ión ferroso en solución fue variable a lo largo del parque. El Río Agrio superior presentó bajos porcentajes de oxidación de hierro (NA, VA1 y VA2 ~ 22 %; CV y CG ~ 32 %); fueron algo mayores en el lago Caviahue y en el Río Agrio Inferior (LC ~ 40 %; SA ~ 50 %). En el campo geotérmico Copahue se encontraron zonas de alta o moderada oxidación (AL3 ~ 90 %; LMa1 ~ 87 %; LMi2 ~ 50 %; LS3 ~ 60 %) y otras de baja concentración de hierro (III) (LVE ~ 11 %).

Los aniones predominantes fueron los cloruros y sulfatos. Los valores de pH menores a 4,5 (Tabla 1.1) condicionaron la presencia de carbonatos y bicarbonatos en las mismas. Los aniones nitrato, nitrito y sulfuro se mantuvieron por debajo del límite de detección de los métodos semi-cuantitativos utilizados para su determinación.

Los amplios rangos de los diferentes parámetros medidos a lo largo del parque provincial Copahue, revelan una variedad de ambientes que permite suponer una amplia gama de microorganismos constituyendo la biodiversidad de este particular ecosistema.

Tabla 1.1. Denominación de algunos puntos de muestreo y sus parámetros físico químicos

Sitio	pH		T(°C)		Conductividad (mS.cm ⁻¹)	
	Nov.	Abr.	Nov.	Abr.	Nov.	Abr.
LV Laguna de volcán	0,6	0,8	28	31,0	70,2	87,0
NA Naciente del Agrio	1,0	0,8	70	70,2	35,0	65,1
VA1 Vertiente Agrio Sur	1,1	0,8	68	45,2	42,0	63,1
VA2 Vertiente Agrio Norte	1,1	1,0	45	42,0	46,0	42,0
CG Cascada del Gigante 1	2,0	1,9	8,0	10,3	3,25	24,3
CC Cascada de la Culebra1	2,0	1,9	8,8	10,2	3,05	24,5
CV Cascada de la Virgen 1	2,0	2,3	9,3	12,7	3,09	23,5
LC Lago Caviahue 2	3,0	3,1	9,0	16,0	0,67	1,17
PG Puente Gendarmería 1	3,5	3,3	17,2	16,0	0,87	0,72
SA Salto del Agrio 1	4,1	3,7	18,0	15,6	0,30	0,35
LS Laguna Sulfurosa 3	3,0	2,9	50,4	55,2	3,60	1,12
LVE Laguna Verde Este	3,0	2,4	22,2	28,5	1,60	2,60
B9 Baño 9 2	4,2	2,0	42,4	50,0	1,01	3,38
AL Agua del Limón 3	2,0	2,0	42,5	55,2	2,88	5,10
LMi Las Maquinitas 2	2,5	2,5	85,0	85,0	3,70	8,60
LMa Las Máquinas 1	3,0	1,8	32,3	39,5	1,03	3,81

Tabla 1.2. Concentración de metales (ppm) en aguas acidas del área geotérmica Copahue

	Fe _{total}		K		Mg		Ca		Na		Mn	
	Nov.	Abr.	Nov.	Abr.	Nov.	Abr.	Nov.	Abr.	Nov.	Abr.	Nov.	Abr.
LV	2100	760	80	170	1430	590	680	900	700	560	48	22
NA	574	816	247	485	322	552	14	13	566	867	10,9	18,8
VA1	454	834	225	505	274	696	16	15	402	911	7,5	21,2
VA2	484	538	269	151	273	342	14	17	516	365	9,2	10,2
CG1	49	510	16	147	49	281	5	13	44	326	2,2	11,3
CC1	45	447	19	136	47	240	5	15	41	283	2,1	9,7
CV1	44	451	18	134	47	266	5	15	42	283	2,1	10,1
LC2	5	21	3	4	12	18	2	3	10	14	0,4	0,7
PG1	7	3	2	5	9	11	3	2	6	12	0,2	0,4
SA1	1	Nd	2	3	5	8	3	2	4	8	Nd	0,1
LS3	3	3	9	12	6	5	27	6	17	25	Nd	0,1
LVE	2	7	3	9	1	2	10	3	5	17	Nd	0,1
B9 2	1	8	2	5	1	2	4	1	2	13	Nd	0,1
AL3	9	31	5	11	2	1	4	2	8	23	Nd	0,1
LMi2	1	43	4	10	1	4	3	3	5	26	Nd	0,7
LMa1	2	11	1	6	1	8	1	3	2	15	Nd	0,2

- Nd: no detectado

Tabla 1.3. Localización geográfica de los sitios de muestreo y concentración de aniones

Sitio	Localización	SO ₄ ²⁻ (mg.L ⁻¹)		Cl ⁻ (mg.L ⁻¹)	
		Nov.	Abr.	Nov.	Abr.
LV	37°51'00"S, 71°10'00"O	9000,0	6700,0	34900,0	20700,0
NA	37°51'24"S, 71°09'14"O	5542,7	5851,2	8671,9	7408,5
VA1	37°51'23"S, 71°09'04"O	8578,6	13350,0	8671,9	11428,6
VA2	37°51'19"S, 71°09'09"O	8604,5	18270,7	7632,4	5053,8
CG1	37°53'11"S, 71°04'15"O	978,3	256,7	574,3	2239,8
CC1	37°53'08"S, 71°04'14"O	932,9	262,4	574,3	2182,3
CV1	37°52'59"S, 71°04'00"O	881,0	345,0	516,9	2124,9
LC2	37°53'14"S, 71°02'46"O	280,9	266,0	67,9	48,2
PG1	37°49'42"S, 70°58'06"O	326,4	71,9	73,5	49,4
SA1	37°48'43"S, 70°55'31"O	128,1	1481,6	30,4	28,7
LS3	37°49'5,36"S, 71°5'54,38"O	611,7	366,6	2,3	28,7
LVE	37°49'6,31"S, 71°5'49,01"O	410,8	855,5	1,1	3,4
B9 2	37°48'59,8"S, 71°5'48,52"O	196,6	279,3	1,1	13,8
AL3	37°49'0,13"S, 71°5'36,18"O	807,5	2897,0	1,1	3,8
LMi2	37°49'09"S, 71°05'12"O	2040,0	507,0	1,1	5,7
LMa1	37°50'2,61"S, 71°5'3,20"O	212,5	780,0	1,1	17,2

CAPÍTULO 2

CONSORCIOS TERMÓFILOS ACIDÓFILOS

Selección y Caracterización

La variedad de condiciones físico-químicas que presenta el campo geotermal Copahue en su conjunto, indican que dispone de una gran cantidad de lugares donde es posible intentar el enriquecimiento y aislamiento de cepas termófilas con capacidad de oxidar hierro y azufre. Precisamente, en este capítulo, se detallan los enriquecimientos realizados para obtener consorcios acidófilos con dichas capacidades metabólicas y que, en lo posible, mostraran adecuado crecimiento a altas temperaturas. También se detallan las caracterizaciones que se realizaron con estos consorcios a nivel microscópico (se usaron diferentes microscopías, óptica, electrónica de barrido y de transmisión, epifluorescencia y fuerza atómica) y a nivel molecular. En este último caso, dos estrategias fueron aplicadas, la hibridación con sondas específicas que no es PCR-dependiente y no requiere aislamiento de ADN, y la clonación y secuenciación de fragmentos específicos del ADN, previa separación por DGGE.

Durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral, se realizaron diferentes campañas de muestreo. El primer relevamiento se limitó a los sitios B9, AL, LS, LMi, LMa (ver capítulo 1). La selección de los puntos específicos de muestreo para cada uno de esos lugares, se realizó teniendo en cuenta la temperatura y pH de aguas y barros y la accesibilidad, estabilidad y representatividad del sitio de muestreo (pileta, pozo, olleta, baño). De este modo, se intentaba que estos estudios fueran parte integral de un estudio ecológico mayor (Chiachiarini et al., 2010). Con estas premisas se seleccionó un punto de muestreo en cada sitio; la excepción fue el sitio LMa donde, de manera adicional a la muestra LMa1, se escogió otro punto de muestreo -potencialmente muy interesante- dentro del mismo predio que se denominó LMa3. En ese lugar se obtuvieron muestras de tres pozos ubicados a corta distancia entre sí pero cuyas condiciones fisicoquímicas, así como la textura y color de aguas y barros, eran marcadamente diferentes. Estas muestras se denominaron LMa3-70, LMa3-75 y LMa3-80 en referencia a la temperatura media en centígrados de cada pozo; estas muestras fueron utilizadas en ensayos específicos tal cual se describirá oportunamente.

También se realizaron muestreos en el Río Agrio Superior, desde su nacimiento (NA, VA1, VA2 y CC) incluyendo la laguna del Volcán, hasta la desembocadura en el Lago Caviahue.

2.1. Enriquecimiento de los Consorcios Extremófilos

El presente trabajo no fue diseñado como un relevamiento ecológico; por esa razón, los medios de cultivo se seleccionaron específicamente en función de las especies microbianas de interés. Las estrategias de enriquecimiento se focalizaron en ejercer una fuerte presión selectiva que propicie la obtención de cultivos de extremófilos y, en particular, constituidos mayoritariamente por arqueas y, dentro de este dominio, por las hipertermófilas del reino Crenarchaeota, y/o por las moderadamente termófilas pertenecientes al reino Euryarchaeota. Precisamente, para el desarrollo de arqueas termófilas acidófilas, se utilizó como principal medio de cultivo una modificación del medio 88 (M88) (Brock y col., 1972) recomendado por la colección de cultivos DSMZ (<http://dsmz.de/media/media88.htm>). El medio M88 fue suplementado, de acuerdo al estudio a realizar, con azufre, tetrationato de potasio, sacarosa o glucosa o pluripectona, entre otras fuentes de energía.

La búsqueda de consorcios con capacidad de oxidar hierro, fue realizada utilizando el medio 9K modificado (Silverman y Lundgren, 1959) con contenido variable de hierro (2,0 a 9,0 g.L⁻¹). También se utilizaron otros medios de cultivo con menor contenido de sulfatos, medio MP (Plumb y col., 2007) utilizado para termófilos extremos y medio M874 (Golyshina y col., 2000) para termófilos moderados.

La preparación y composición de todos los medios de enriquecimiento utilizados se describe en el Anexo I. Las condiciones de pH y temperatura fueron ajustadas de acuerdo a los requerimientos de cada ensayo. Para las cinéticas de crecimiento, la población microbiana se cuantificó a través de recuento en cámara Petroff-Haüsser utilizando microscopio óptico con contraste de fase. La oxidación de hierro(II) y/o de compuestos de azufre, se determinó mediante técnicas analíticas convencionales, registrando Eh, pH, concentraciones de hierro(II) en solución, según se describe en el Anexo II (Skoog y West, 2001; Skoog y col., 2001; Kolthoff, 1972).

En la Tabla 2.1 se sintetizan los resultados obtenidos. Se indica con signo positivo aquellos puntos de muestreo donde se obtuvieron consorcios que demostraron capacidad de:

- a) ser cultivados en los medios de enriquecimiento usados y,
- b) mantenerse en el tiempo con cierta regularidad.

El signo negativo denota que no se obtuvo desarrollo de los cultivos o que no fue posible mantenerlos viables y con un comportamiento estable en el tiempo. Las casillas vacías indican que no se efectuaron esas pruebas sobre los consorcios correspondientes.

Tabla 2.1. Resultados obtenidos para los diferentes consorcios microbianos provenientes de los sitios de muestreo seleccionados, utilizando medios de enriquecimiento y bajo condiciones aeróbicas

Medios de cultivo utilizados	Denominación de los cultivos de acuerdo a los sitios de procedencia										
	LV	NA	VA1	VA2	CC	LC	LS	AL	B9	LMi	LMa
	Ensayos de enriquecimiento a 65°C										
M88	--	+	+	+	+	--	+	+	++	++	++
M88+S	--	+	+	+	+	--	+	+	++	++	++
M88+Tet.	--	+	+	+	+	--	+	+	+++	+++	+++
M88+Sac.	--	++	++	++	++	--	++	++	++++	++++	++++
M88+Gluc.	--	+	+	+	+	--	+	+	++	++	++
M88+Fe(II) (2g.L⁻¹)								+	++	++	++
M9K	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
M0K+T+pP	--	++	++	++	++	--	++	++	+++	+++	+++
MP+Fe(II) (2g.L⁻¹)								++	++	++	++
MP+S	--	+	+	+	+	--	+	+	+	+	+

En los puntos de muestreo correspondientes a Laguna del Volcán y al Lago Cavihue, no se detectó el desarrollo de microorganismos en los medios ensayados a 65 °C. A partir de los minuciosos estudios realizados por Varekamp y col. (2009) sobre las condiciones fisicoquímicas de la Laguna del Volcán Copahue y sus fluctuaciones durante más de diez años, se deduce que son poco propicias para el desarrollo de microorganismos. La Laguna presenta alta concentración de sulfatos, cloruros, arsénico, litio, boro, lantánidos y actínidos provenientes de la disolución de las rocas magmáticas, y un elevado porcentaje de sólidos finamente divididos en suspensión. Por otro lado, si bien el Lago Cavihue presenta condiciones más favorables en cuanto a contenido de metales, sales y sólidos disueltos, no presentó desarrollo de microorganismos de interés en los cultivos de enriquecimiento a 65 °C. La dilución producida por los afluentes que

alcanzan el río antes del lago, probablemente es la responsable de que no se logaran aislar especies microbianas que se detectaron en cambio aguas arriba.

El medio M88 resultó apropiado para el crecimiento celular en las muestras con respuesta positiva; los ensayos fueron realizados a temperatura constante de 65 °C y en atmósfera de aire (Tabla 2.1). También se obtuvieron resultados positivos cuando el medio M88 fue suplementado con azufre, tetratiónato de potasio, sacarosa y glucosa. Aún entre las muestras que arrojaron resultados positivos, se observaron diferencias en la concentración de biomasa o en los valores de pH alcanzados al final del crecimiento.

Los medios 0K+T+pP y MP+S se usaron como medios líquidos de cultivo y luego fueron utilizados como base del medio sólido con el que se intentó el aislamiento de algunas especies presentes en los consorcios. En ellos se esperaba un desarrollo de buena parte de los microorganismos presentes en el consorcio.

Se usaron dos medios diferentes para intentar poner de manifiesto la capacidad para oxidar hierro(II) de los diferentes consorcios seleccionados. En primer lugar, se utilizó el medio de cultivo 9K que es ampliamente usado en bioensayos con microorganismos acidófilos y mesófilos. No obstante, a 65 °C el medio 9K no resultó apropiado para promover el crecimiento microbiano y el nivel de oxidación detectado fue el mismo que en los controles estériles. Aunque no se determinó la causa de esta ausencia de crecimiento, el mismo pudo deberse a la alta concentración de algunos aniones en el medio y/o de la elevada fuerza iónica que han sido reportados como inhibitorios para algunos microorganismos mesófilos (Lizama y Suzuki, 1989; Harahuc y col., 2000).

Debido a las razones mencionadas, se decidió utilizar un medio de cultivo con menor contenido en hierro (2-4 g Fe(II).L⁻¹) y con un contenido más simple de sales en su base. Estas características son reunidas por el medio denominado MP. Las pruebas con este medio para los consorcios provenientes de B9, LM_i y LM_a fueron positivas, tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas. Ensayos similares llevados a cabo con medio M88 suplementado con hierro (II) fueron también positivos (Tabla 2.1).

Considerando el conjunto de resultados obtenidos se eligieron entre los cultivos de enriquecimiento, a los consorcios B9, LM_i y LM_a para el resto de los estudios que se realizaron dentro de este Trabajo de Tesis. Esta decisión se tomó en base a que estos enriquecimientos pueden oxidar azufre y/o hierro en condiciones autotróficas y

heterotróficas, como así también pueden crecer sobre fuente orgánica (sacarosa, glucosa, extracto de levadura, etc.) sin fuente de azufre y/o hierro.

Tabla 2.2. Medios de enriquecimiento y resultados obtenidos para las muestras LMa3

Medios de cultivo	Denominación de los cultivos de acuerdo a los sitios de procedencia		
	LMa3-70	LMa3-75	LMa3-80
	Ensayos de enriquecimiento a 75 °C		
M88+S	+	+++	+
	Ensayos de enriquecimiento a 75 °C		
M874	++	++	++
	Ensayos de enriquecimiento a 45 °C		
M874	++	++	++
	Ensayos de enriquecimiento a 37 °C		
M874	++	++	++
	Ensayos de enriquecimiento a 30 °C		
M874	++	++	++

La Tabla 2.2 reúne la información sobre los ensayos de enriquecimiento realizados con las muestras denominadas LMa3. Estas muestras desarrollaron consorcios microbianos a muy diferente temperatura, tanto en medios suplementados con azufre como en medios con hierro, mostrando la flexibilidad de los microorganismos presentes en esos ambientes tanto a la temperatura como a la fuente de energía utilizada.

Por lo tanto, en base a este conjunto de resultados se seleccionaron los tres consorcios de LMa3 para realizar ensayos específicos en este Trabajo de Tesis.

2.2. Caracterización Morfológica

Para caracterizar morfológicamente los consorcios obtenidos en la etapa de enriquecimiento, se utilizaron diferentes técnicas de microscopía: microscopía óptica (MO), microscopía electrónica de barrido y transmisión (SEM y TEM), microscopía de epifluorescencia (EFM) y microscopía de fuerza atómica (AFM) (Mangold y col., 2008). Los protocolos utilizados se describen en el Anexo III.

Estas observaciones permitieron comprobar que en todos los consorcios enriquecidos en M88+S se desarrollaron cultivos mixtos; estos cultivos estaban compuestos por células de variada morfología: cocos, lobulares y bacilos. En la Figura 2.1, se ejemplifica con la morfología que presentó el consorcio obtenido por enriquecimiento en M88+S de una muestra proveniente de B9. La población celular alcanzó valores del orden de 3×10^8 bacterias.mL⁻¹ y el pH de los cultivos disminuyó en más de una unidad después de 15 días de incubación a 65 °C.

Figura 2.1. Micrografías (SEM) del cultivo de B9 enriquecido en M88+S. La barra equivale a 1 µm

Las flechas fucsias de la micrografía señalan células con morfología típica de cocos o lobular con 1 µm de diámetro aproximadamente; las azules señalan bacilos de distintos tamaños y las amarillas señalan cristales de azufre (fuente de energía en estos cultivos).

Cuando el consorcio de B9 creció en M88+Sac, la biomasa alcanzó concentraciones de un orden de magnitud mayor que en los otros medios y con mayor abundancia de células con forma de cocos y menor proporción de bacilos (Figura 2.2). En la micrografía B de la misma figura, se pueden apreciar los dos tipos de microorganismos preponderantes en el cultivo. Las muestras provenientes de LMi (en la Figura 2.3 se observa una selección de varias tomas) también presentaron células semejantes a las observadas para B9.

Figura 2.2. Micrografías (SEM) correspondientes al cultivo B9 enriquecido en M88+Sac. A) La barra equivale a 2 μm ; B) La barra equivale a 300nm

Figura 2.3. Micrografías (SEM) correspondientes al consorcio proveniente de LMi enriquecido en M88+S. Las barras corresponden a 1 μm en todas las micrografías excepto para la inferior derecha, donde la barra es de 10 μm y permite apreciar la diferencia en la longitud de los bacilos

La estructura interna de los microorganismos fue observada mediante microscopía de transmisión electrónica (Figura 2.4). Las micrografías A y B corresponden al consorcio de B9 enriquecido en M88+S mientras que las imágenes C y D son del mismo consorcio pero desarrollado en M88+Sac. En algunas de las imágenes mostradas, se observa la morfología típica de cocos irregulares o lobulados y también algunos gránulos formados en el interior de las células.

Figura 2.4. Micrografías (TEM) de consorcios de B9 en medios de enriquecimiento. A y B) M88+S; C y D) M88+Sac

Figure 2.5. Imágenes de células planctónicas inmovilizadas sobre portaobjetos de vidrio cubiertos con poli-L-lisina y capturadas con un microscopio de fuerza atómica (AFM). A) B9 en M88+S; B) LMi en M88+S

La Figura 2.5 muestra las imágenes tomadas en un microscopio de fuerza atómica para B9 y LMi, ambos cultivados en M88+S. Esta técnica permite observar a los

microorganismos con su volumen celular casi intacto e incluso pueden apreciarse exopolímeros ya que no se requiere deshidratación de la muestra. En las imágenes se observan dos tipos de células diferentes; en estas muestras no se observan exopolímeros en abundancia.

Cuando se utilizó M88+T como medio de enriquecimiento, los consorcios provenientes de B9 y LMi alcanzaron una población del orden de 5×10^8 células.mL⁻¹, luego de 4 días de incubación. La morfología del cultivo estuvo mayoritariamente constituida por cocos (tamaño entre 0,3 y 1,2 μ m) tal cual se puede apreciar en la Figura 2.6. Las imágenes B, C y D, muestran agrupaciones de microorganismos (flóculos); se observó que estos agregados celulares incrementan su tamaño a medida que consumen los sustratos.

Figura 2.6. Cultivo de enriquecimiento en M88+T. A) EFM con tinción DAPI de B9. B, C y D) Micrografías (SEM) para B9, LMi y LMa, respectivamente. En las imágenes A y D la escala es de 2 μ m, mientras que en la imagen C es igual a 1 μ m

La Figura 2.7 muestra imágenes representativas de los cultivos tomadas con los microscopios de fuerza atómica y de epifluorescencia. Se ha elegido un cultivo

proveniente de LMi y enriquecido en M88+T (aunque similares imágenes se observan para los otros cultivos). Se observa que este medio de cultivo permite un enriquecimiento mucho más homogéneo (al menos desde el punto de vista morfológico); también se observan los mismos flóculos descritos más arriba.

Figura 2.7. Imágenes EFM y AFM de células planctónicas de un cultivo proveniente de LMi, enriquecido en M88+T e inmovilizadas en portaobjeto de vidrio cubierto con poli-L-lisina y teñidas con DAPI. La barra de escala en la EFM es de 5 μm

La Figura 2.8 muestra la morfología de las células que constituyen los consorcios provenientes del sitio de muestreo LMa3; estas muestras fueron enriquecidas en medio de cultivo M874. Se distinguen células largas y con características de leptospiras y otras en forma de bacilos; no se observa las células lobulares o cocos.

Figura 2.8. Micrografías (SEM) de los cultivos LMa3. A y B) LMa3-70; C) LMa3-75 y D) LMa3-80 en medios de enriquecimiento con hierro

2.3. Caracterización Molecular

Para caracterizar y/o identificar parte de los microorganismos que conforman los consorcios enriquecidos con los diferentes medios de cultivo utilizados, se realizaron ensayos utilizando técnicas de ecología molecular usualmente aplicadas en la caracterización de ambientes ácidos extremos (Edwards y col., 2000; González Toril y col., 2003; Mikkelsen y col., 2009; Chiacchiarini y col., 2010). Se realizó hibridación fluorescente *in situ* (FISH), electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) y clonado y secuenciamiento de genes. Estas técnicas se aplicaron directamente a los

cultivos; su uso combinado permite un conocimiento bastante profundo de la composición de las comunidades y su distribución filogenética.

Los protocolos para la preparación de los reactivos y la secuencia de operaciones para llevar a cabo estas técnicas están descriptos en los Anexos IV-VII.

Hibridación Fluorescente in Situ (FISH)

En primer lugar se aplicó FISH para intentar obtener información general sobre la composición de las comunidades presentes en las muestras B9, LMi, LMa y LMa3. Esta técnica no se usó en este caso (aunque es una de sus ventajas) con intenciones cuantitativas ya que no era relevante hacer un relevamiento ecológico del ambiente natural a la luz del objetivo central de este Trabajo de Tesis, sino obtener consorcios termófilos con potencial aplicación en procesos biohidrometalúrgicos.

Las muestras B9, LMi y LMa, utilizadas para los ensayos de hibridación, fueron cultivadas a 65 °C en medio M88+T y M88+Sac. Se realizó la hibridación de todas estas muestras con la sonda específica para arqueas ARCH 915 (Amann y col., 1995) y con sonda SLbus (González Toril, datos no publicados) para identificar microorganismos del orden de los Sulfolobales, debido a los indicios obtenidos en estudios preliminares.

Las muestras B9, LMi y LMa presentaron hibridación positiva con ambos tipos de sondas. Prácticamente todas las células hibridaron con ambas sondas cuando se las compara con las células teñidas con DAPI. La alta concentración de células que incorporó las sondas indica que las condiciones impuestas de temperatura y acidez actuaron selectivamente a favor de aquellas células pertenecientes al dominio Arquea y específicamente al orden Sulfolobales, en detrimento de otros microorganismos que pudieran estar inicialmente presentes compartiendo el hábitat en el Sistema Geotermal Copahue (Figura 2.9).

Figura 2.9. FISH usando sondas universales para arqueas y específicas para el orden de Sulfolobales. Todos los cultivos fueron enriquecidos a 65 °C en M88+T

La Figura 2.10 muestra que en los cultivos provenientes de B9 y de LMa, han prevalecido las arqueas luego de haberse repicado varias veces en medio de cultivo con fuente orgánica de energía a 65 °C. Este mismo resultado se obtuvo para el cultivo LMi (datos no mostrados).

Figura 2.10. Arqueas cultivadas en M88+Sac. Células azules teñidas con DAPI y rojas con sonda Arch-915 con colorante fluorescente Cy3

A continuación se presentan los resultados de FISH obtenidos para la muestra LMa3 compuesta por tres sub-muestras, denominadas de acuerdo a la temperatura del pozo donde fueron extraídas. En primer lugar esta muestra se cultivó en M88+S. Sólo LMa3-75 que fue enriquecida a 75 °C y en medio M88+S, presentó hibridación para la sonda universal de arqueas; las otras dos muestras no hibridaron para arqueas a esa temperatura (Figura 2.11).

Por otra parte, se realizaron ensayos de hibridación a los efectos de caracterizar la población microbiana presente en las submuestras de LMa3, cuando desarrollaron en el medio 874, el cual es recomendado en las colecciones de cultivo para las arqueas del género *Ferroplasma*. La Figura 2.11 muestra algunos de los resultados obtenidos cuando se utilizó la sonda Arch 915 con los consorcios de LMa3 cultivados a 30 °C. Se puede

observar que hay hibridación positiva en las tres submuestras de LMa3, sin embargo el grado de hibridación es significativamente menor que el obtenido para la muestra LMa3-75 cuando creció en M88+S a la temperatura de 75 °C.

Figura 2.11. Cultivos provenientes de los tres pozos de LMa3: 1) Cultivados a 75 °C en M88+S; 2 y 3) Cultivados a 30 °C en M874. Todas las muestras hibridadas con sonda específica para arqueas Arch-915

Es evidente que la sonda para arqueas sólo hibridó una porción pequeña de las células (de acuerdo a la imagen DAPI). En un ensayo posterior sobre los cultivos LMa3 que se incubaron a 37 °C, se realizó nuevamente hibridación con sonda general de archaeas Arch-915 y con la sonda para *Ferroplasma* Fer-656 (Edwards y col., 2000). Como se observa en la Figura 2.12, las micrografías muestran mayor hibridación de la sonda Arch 915 que lo que ocurrió a 30 °C para la muestra LMa3-75. También se obtuvo un alto porcentaje de hibridación con la sonda para *Ferroplasma* cuando el cultivo se mantuvo en agitación a 37 °C (precisamente, la temperatura óptima para *Ferroplasma*). Esta arquea ha sido frecuentemente reportada como constituyente de consorcios en biofilms en paredes de cavernas y excavaciones mineras, drenajes ácidos de rocas o ambientes hidrotermales (González Toril y col., 2003; Okibe y Johnson, 2004; Macalady, 2007).

Figura 2.12. Cultivos provenientes del pozo termal LMa3-75 hibridados con sondas para arqueas en general y específicas para *Ferroplasma*, después de haber sido incubados a 37 °C

Para complementar la caracterización de las muestras provenientes del sitio LMa3, también se realizaron hibridaciones con sondas genéricas para eubacterias EUB338 (Amann y col., 1990) y para algunos géneros y especies como lo son las sondas THIO1 del género *Acidithiobacillus* (Stoffels, datos no publicados), SUL228 para *Sulfobacillus thermosulfoxidans* (Bond y Bandfield, 2001), LEP636 para *Leptospirillum*

ferrooxidans (González Toril y col., 2003), ACM1160 para *Acidimicrobium* spp. (González Toril y col., 2003) y FER656 para *Ferroplasma* spp. (Edwards y col., 2000).

En la Figura 2.13 se puede apreciar la hibridación con la sonda genérica para eubacterias en correspondencia con la micrografía obtenida con tinción usando DAPI. Para la misma muestra hibridaron las sondas del género *Acidithiobacillus* y en menor proporción para el género *Sulfobacillus*.

Figura 2.13. Hibridación con diferentes sondas genéricas y específicas para eubacterias aplicadas al cultivo LMa3-70, enriquecida a 30 °C usando M874

En el caso de la muestra LMa3, también se logró hibridación positiva con la sonda específica para el género *Leptospirillum* mientras que con sonda para *Acidimicrobium*, la hibridación fue negativa (datos no mostrados).

Por lo tanto, los microorganismos identificados en la muestra LMa3 pertenecen a los géneros de *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Acidithiobacillus* entre las eubacterias y al género de *Ferroplasma* entre las arqueas. La composición de estos cultivos resultó ser similar a aquella usualmente reportada para consorcios que colonizan ambientes ricos en hierro (Rawlings y col., 2003; Rawlings, 2005).

Este estudio muestra que las comunidades naturales presentan singularidades que se traducen en resultados interesantes en función tanto de los medios de cultivos utilizados para el enriquecimiento como de las temperaturas de incubación. Así, diferentes comunidades, en principio no conectadas entre sí, muestran similares microorganismos al ser cultivadas a la misma temperatura y con las mismas fuentes de energía. Los cambios de temperatura modifican apreciablemente la composición de las comunidades favoreciendo la aparición de bacterias cuando se cultivan a menores temperaturas y de arqueas cuando se lo hace a mayores temperaturas (con la excepción de *Ferroplasma* que se detectó en cultivos de temperatura moderada). También la fuente de energía provoca cambios en la comunidad; algunas especies se favorecen en condiciones heterótrofas mientras que otros lo hacen en condiciones autótrofas pero estos enriquecimientos no necesariamente implican la selección de una sola especie.

Si bien los resultados mencionados parecen priorizar la temperatura y la fuente de energía al origen exacto de la muestra, debe tenerse presente que estos lugares de muestreo tienen flujos de agua subterráneos que pueden conectarlos y que puede haber incluso comunicaciones en la superficie por las modificaciones del terreno especialmente en las épocas de deshielo o por intervención humana.

Extracción y Secuenciamiento de ADN

La caracterización molecular fue realizada, inicialmente, para los cultivos de enriquecimiento B9 y LMi, para intentar identificar la población microbiana cultivable a la temperatura de 65 °C. Paralelamente, se evaluó si la adición de diferentes fuentes de

energía a los medios de cultivo utilizados, favorecía determinados componentes de la población microbiana de cada consorcio.

Para ello, se realizaron extracciones de ADN de células crecidas en M88 suplementado con diferentes fuentes de energía (sacarosa, azufre, tetratiónato de potasio). Las muestras de ADN fueron amplificadas mediante PCR utilizando cebadores específicos para arqueas y eubacterias.

En la siguiente Tabla 2.3 se detallan los resultados obtenidos, indicando con (+) o (-) si fue positiva o negativa la amplificación en cada caso. El número entre paréntesis corresponde a la calle en que fue sembrado en el gel de agarosa que se muestra en la Figura 2.14.

Tabla 2.3. Resultados de la amplificación de las muestras B9 y LMi con cebadores específicos para los dominio Arqueas y Bacterias

Cebadores Cultivos Medios	Eubacterias		Arqueas	
	B9	LMi	B9	LMi
M88	+++ (2)	+++ (8)	+++ (11)	+++ (15)
M88+Sac	+++ (3)	+++ (9)	+++ (12)	+++ (16)
M88+S	+++ (4)	---- (7)	+++ (13)	+++ (17)
M88+T	---- (5)	---- (10)	+++ (13)	+++ (18)

*calle 6 control (-) eubacterias ** calle 20 control (-) arqueas

Figura 2.14. Gel de agarosa para muestras de ADN amplificado con cebadores específicos de arqueas y eubacterias, a partir de cultivos de B9 y LMi, usando diferentes fuentes de energía según se detalla arriba

Las muestras de ADN amplificadas con cebadores para arqueas, fueron sometidas a electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente (DGGE) en una proporción 30-70 % de urea/formamida. Las muestras B9 y LMi se distribuyeron en el gel según se indica en Figura 2.15. Todas las calles presentan una misma banda muy intensa y solo en la calle 5 se observa una banda en la parte inferior del gel. Es posible detectar otras bandas más débiles que siguen prácticamente el mismo patrón en todas las muestras; a pesar de una evidente distorsión en la continuidad del gradiente, podría pensarse que se trata de la misma secuencia (o muy similar) en todas las muestras.

Calle	Banda	Cultivo
1	B1	B9 (M88+T)
2	B2	LMi (M88+T)
3	Vacía	
4	B4	B9 (M88)
5	B5	LMi (M88)
	B5[#]	LMi (M88)
6	B6	B9 (M88+S)
7	B7	LMi (M88+S)
8	B8	B9 (M88+Sac)

Figura 2.15. DGGE (gradiente 30/70) amplificados con cebador de arqueas para muestras de B9 y LMi, enriquecidas en diferentes medios de cultivo

Las bandas numeradas en el gel de DGGE (mostrado en la Figura 2.15) fueron recortadas y el ADN fue eluido (con 50µl de buffer TE después de 72 h de maceración a 4° C) para su posterior amplificación, purificación y clonación. Lamentablemente la amplificación no resultó exitosa en todos los casos. En el gel de agarosa (Figura 2.16) se observan que algunas bandas (como B5, por ejemplo) no dieron productos PCR (o, al menos, no se detectaron en este gel). Otras bandas debieron amplificarse utilizando una dilución 1/10 (necesario para evitar algún efecto inhibitorio que se observa a

concentraciones mayores). Las bandas representativas de los productos de amplificación del ADN de las muestras B9 y LMi tienen una longitud aproximada de 600pb tal como puede apreciarse en el gel comparando con el marcador de peso molecular (MW) cuya primera banda es 1434pb (Figura 2.16).

Figura 2.16. Productos PCR de las bandas cortadas y eluidas del gel DGGE de las muestras B9 y LMi.

Aquellas bandas que dieron positivas, fueron re-amplificadas con cebadores específicos sin adición del fragmento rico en bases CG, purificadas y derivadas para clonación y secuenciamiento cuyos resultados se comentan más adelante.

En relación a las muestras correspondientes al sector adicional de Las Máquinas, enriquecidas en M874 a 30°C, sólo LMa3-75 amplificó con cebadores específicos para arqueas (Figura 2.17); no fue posible lograr la amplificación en las muestras LMa3 70 y 80 a pesar de que los resultados de FISH habían mostrado, aunque escasa, cierta hibridación con la sonda específica de arqueas.

Figura 2.17. Gel de agarosa para productos PCR de las muestras LMa3. Calles 1 y 2 controles (+) para eubacterias y arqueas; calles 3 y 9 marcador de peso molecular

A los efectos de completar los estudios sobre otros puntos de muestreo y comparar con los resultados anteriores también se analizaron muestras de LMa, LMa3-75 y de los sitios NA, VA1 y VA2 ubicados en la naciente y cauce inicial del denominado Río Agrio Superior. La DGGE (Figura 2.18) sólo fue llevada a cabo con enriquecimientos sobre dos medios de cultivo, M88+S (calles 2-5) y M88+T (calles 8-12). El ADN extraído de esos cultivos de enriquecimiento se comparó con el ADN de los cultivos LMi y B9 en M88+T (calles 6 y 7). Adicionalmente, para analizar si el enriquecimiento había producido una modificación sustancial en la composición del conjunto, se sembró una muestra natural, sin enriquecimiento previo, proveniente del sitio LMa (calle 1).

Calle	Sitio	Medio de cultivo	Banda escindida
1	LMa	Muestra natural	B9 B10 B11 B12
2	LMa	M88+T	B13
3	LMa3-75		B14
4	VA1		
5	VA2		
6	LMi		
7	B9		
8	LMa3-75	M88+S	
9	LMa		
10	NA		B15
11	VA1		B16
12	VA2		B17

Figura 2.18. DGGE de muestras de Río Agrio y LMa comparadas con ADN amplificado para muestras de B9 y LMi usando cebadores para arqueas

En el gel de la Figura 2.18 se observa una banda intensa de ADN que ha sufrido el mismo desplazamiento en el gel para todos los enriquecimientos analizados y que a su vez coincide con la banda más concentrada de la muestra natural de LMa. Adicionalmente, en la muestra natural se ven otras bandas débiles que en algún caso son

coincidentes y en otros no con el resto de las muestras sembradas. A juzgar por el desplazamiento y concentración de las bandas en el gel se puede inferir que una biodiversidad similar se encuentra en los diferentes cultivos de enriquecimiento sin importar demasiado el lugar de procedencia.

Las bandas numeradas en el gel de la Figura 2.18 fueron cortadas y derivadas para su clonación y secuenciamiento.

Las bandas 9, 11 y 12 no pudieron ser amplificadas por reacción de la Taq-polimerasa. En la Figura 2.19 se muestra el gel DGGE (gradiente con un porcentaje de urea-formamida 40-70). Las bandas correspondientes al ADN utilizado en los ensayos de clonación, guardan la misma relación entre ellas que antes de ser eluidas del gel de DGGE y reamplificadas. En el cuadro ubicado el margen izquierdo del gel se detallan la procedencia de cada banda y el medio de cultivo en que fueron enriquecidos esos microorganismos.

Calle	Muestra	Medio	Banda
1	B9	M88+T	B1
2	LMi		B2
3	B9	M88+S	B6
4	LMi		B7
5	B9	M88+Sac	B8
6	LMa	M88+T	B13
7	LMa3		B14
8	VA1	M88+S	B16
9	VA2		B17

Figura 2.19. DGGE para muestras del campo geotérmico Copahue (LMi, B9, LMa, LMa3) y del Río Agrio (VA1 y VA2)

La Figura 2.20 es un ejemplo de los ensayos de clonación realizados. En este caso, corresponde a la muestra B9 y a los clones que tienen incorporada la banda 6. Las flechas blancas señalan colonias donde el inserto ha sido incorporado correctamente

mientras que las colonias azules conservan la actividad beta-galactosidasa del plásmido (indicando que no han incorporado el fragmento de arquea).

Los ensayos de clonación fueron realizados por grupos hasta obtener clones de todas las bandas que se pretendían secuenciar. La cantidad de colonias azules obtenidas en todos los casos fue menor a la esperada según las estadísticas aportadas por el fabricante del kit pGen-T easy vector de Promega. Usualmente se obtienen alrededor de 100 colonias por placa cuando se utilizan células transformadas en una concentración aproximada de 10^8 ufc. μg^{-1} de DNA y, de ellas, aproximadamente un 30 % deberían ser azules. Sin embargo, para los ensayos realizados se han obtenido, en general, pocas colonias por placa y una menor proporción de colonias azules.

Figura 2.20. Fotografía de los clones de cepas *E. Coli* H α 5 competentes conteniendo un fragmento de ADN de la muestra B9 inserto en vector plasmídico p7

Las colonias blancas han incorporado el inserto en el sitio esperado pero debe chequearse la calidad del inserto ya que el mismo pudo haberse deteriorado durante el proceso. Para ello se realizó la extracción de ADN de varias colonias blancas y se amplificó el ADN con el mismo primer de arquea. Los nuevos fragmentos procedentes de los clones fueron posteriormente comparados contra el material original en gel de agarosa y en un gel DGGE 40-70. En la Figura 2.21 se observa que los productos de PCR de los clones son de alrededor de 600 pb, tal como se esperaba, y el desplazamiento en el gel de DGGE de cada fragmento de los clones se corresponde con la distancia recorrida por la banda pura correspondiente (B9, LMi, LMa y VA1). En calidad de

controles externos, en las calles 3 y 4 del mismo gel de DGGE se sembró ADN amplificado de una colonia de clones de un cultivo de arqueas no perteneciente a Copahue y ADN del material sin clonar.

Figura 2.21. Electroforesis en: A) gel de agarosa y B) gel de poliacrilamida 40-70 % urea-formamida

Finalmente, se enviaron a secuenciar alrededor de 10 clones de bandas de las muestras de B9, LMi, LMa y NA1. A través de la secuenciación, se conoció el ordenamiento de los nucleótidos para cada uno de los clones enviados. Después de haber alineado y comparado los fragmentos mediante el programa MEGA 4, se comprobó que las secuencias de los clones de cada sitio de muestreo no presentaban alta variabilidad en la secuencia nucleotídica (las escasas diferencias en un par de nucleótidos pudieron atribuirse a errores en las etapas de amplificación y secuenciamiento). En todos los casos se seleccionaron secuencias con alto grado de coincidencia para efectuar el apareamiento en BLAST. Este análisis permite una aproximación sobre la afinidad que tiene la secuencia incógnita con secuencias presentes en las Bases de Datos. Las secuencias de aproximadamente 550 pb, consideradas representativas de cada sitio de muestreo,

presentaron cierta variabilidad pero no tan significativa como para arrojar resultados diferentes luego de realizar la comparación en BLAST. En la Tabla 2.3 se presenta un resumen de los resultados obtenidos después de procesar la secuencia nucleotídica representativa de la banda procedente de B9 frente a las secuencias depositadas en la base de datos. Análisis semejantes fueron realizados con las muestras de los otros sitios.

Tabla 2.3. Resumen de la comparación de la secuencia de un clon de Copahue, utilizando el programa BLAST

Accession	Description	Total score	Query coverage	E value	Maxidentity
D85505.1	<i>Acidianus infernus</i> 16S rRNA gene, almost full-length sequence	778	99 %	0.0	93 %
NR_028245.1	<i>Acidianus infernus</i> So4a 16S ribosomal RNA, partial sequence >emb X89852.1 <i>A.infernus</i> DNA for 16S ribosomal RNA	778	99 %	0.0	93 %
AJ888029.1	<i>Acidianus</i> sp. Acii25 partial 16S rRNA gene, isolate Acii25	774	99 %	0.0	93 %
FJ154516.1	<i>Acidianus ambivalens</i> strain 9191 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	773	99 %	0.0	93 %
AJ634763.1	<i>Acidianus convivor</i> 16S rRNA gene, strain AA9T	760	99 %	0.0	92 %
AB182498.1	<i>Acidianus manzaensis</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	717	99 %	0.0	91 %
EF522787.1	<i>Acidianus manzaensis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	712	99 %	0.0	91 %
EU563854.1	<i>Acidianus manzaensis</i> strain TA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	702	99 %	0.0	90 %
NR_028211.1	<i>Acidianus sulfidivorans</i> JP7 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AY907891.1 <i>Acidianus sulfidivorans</i> JP7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	702	99 %	0.0	90 %
AJ888027.1	<i>Acidianus</i> sp. Acii18 partial 16S rRNA gene, isolate Acii18	701	99 %	0.0	90 %
AF167083.1	<i>Metallosphaera</i> sp. J1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	689	99 %	0.0	90 %
FJ154515.1	<i>Acidianus brierleyi</i> strain 8954 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	686	99 %	0.0	90 %
AJ884675.1	<i>Acidianus pozzuoliensis</i> partial 16S rRNA gene	686	99 %	0.0	90 %
AF226987.1	<i>Acidianus tengchongensis</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	675	99 %	0.0	89 %

Del análisis de la tabla se observa un valor de solapamiento entre el clon y las secuencias de la base de datos del 99 % y la máxima similitud alcanzada es del 93 %. Esto indica que no hay secuencia en las Bases de Datos que pueda ser asignada a estos microorganismos. La secuencia que se introdujo encuentra cierta similitud con diferentes miembros del género *Acidianus*. Se pudo construir así el dendograma de la Figura 2.22 con la siguiente aproximación para la ubicación en el proceso evolutivo:

Figura 2.22. Linaje obtenido para los clones conteniendo las secuencias de 500pb del gen ADNr-16S de cultivos provenientes de diferentes sitios de Copahue usando el módulo SEQ MATCH del programa RDP (Ribosomal Data Base Project <http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch>)

Utilizando herramientas informáticas, fue posible construir diferentes árboles para obtener una aproximación filogenética de la cepa tipo-*Acidianus* de Copahue respecto de otros integrantes de la familia Sulfolobaceae. Las secuencias de 550 pb fueron analizadas para determinar la distancia evolutiva entre ellas, mediante el modelo de dos parámetros de Kimura (1980) y la matriz de distancias así obtenida fue usada para construir el árbol con el método de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). No se usó grupo externo, la topología del árbol obtenido fue evaluada por método heurístico haciendo 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). Los valores de *bootstraps* obtenidos se muestran en cada nodo en el árbol de la Figura 2.23, obtenido para la cepa de tipo-*Acidianus* de Copahue.

Figura 2.23. Árbol filogenético inferido usando los métodos de Neighbour-Joining. Los números arriba de cada nodo indican los valores bootstraps (Felsenstein, 1985). La robustez del árbol fue evaluada con un análisis de *bootstrap* utilizando 1000 repeticiones. La escala indica el número de sustituciones acumuladas cada 100 nucleótidos

Se verificó un bajo grado de solapamiento entre los clones conteniendo fragmentos de 550 pb de arqueas del sistema geotermal Copahue respecto de los microorganismos presentes en las Bases de Datos. Para avanzar en la identificación de la especie, fue evidente la necesidad de secuenciar el gen 16S completo. En consecuencia, se procedió al aislamiento y caracterización de esta posible nueva especie dando lugar a la serie de ensayos y resultados que se describirán en el capítulo siguiente.

En este capítulo, se ha logrado seleccionar consorcios termófilos capaces de oxidar hierro(II) y/o compuestos reducidos de azufre y que se utilizarán en las aplicaciones biohidrometalúrgicas en los capítulos finales. Los mismos se han caracterizado fisiológica, microscópica y molecularmente. Entre los resultados más relevantes se ha comprobado que independientemente del origen comparten similares microorganismos y que las condiciones de temperatura que se imponen y, en menor

medida, la fuente de energía que se utiliza, condicionan los microorganismos dominantes. Los cultivos a mayor temperatura (cercana a 65 °C) mostraron mayor presencia de arqueas mientras que lo contrario ocurrió con los cultivos a menor temperatura (cercana a 30 °C). Probablemente el resultado más interesante es que a partir de los análisis a nivel molecular, fue posible localizar una secuencia no asimilable a ninguna otra de las Bases de Datos aunque con cierta similitud con especies del género *Acidianus*. Esto permitió suponer la existencia de una especie no registrada hasta el momento y sobre la cual, se mostrarán resultados más concretos en el capítulo siguiente.

CAPÍTULO 3

MICROORGANISMOS

TERMÓFILOS ACIDÓFILOS

Aislamiento y Caracterización

Las arqueas presentan interesantes capacidades metabólicas y, además de desempeñar un papel relevante en los ambientes extremos, pueden ser importantes en diferentes aplicaciones y procesos biotecnológicos. Muchas arqueas han sido detectadas a través de métodos moleculares aunque sólo unas pocas han podido ser aisladas y cultivadas rutinariamente (Cavicchioli, 2007; Garret y Klenk, 2007). Por tal motivo, siempre resulta de interés el aislamiento de nuevas especies. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos moleculares descritos en el capítulo anterior, mostraron la presencia de una potencial nueva especie de arquea del orden Sulfolobales y, más específicamente, del género *Acidianus*. En este capítulo, se describe el aislamiento y la caracterización fisiológica y molecular de esta nueva especie.

Para el primer objetivo de aislamiento de esta nueva especie, se realizaron diferentes estrategias para lograr su crecimiento en medio sólido. Luego de haber conseguido el aislamiento, se evaluaron diferentes fuentes de energía y, en particular, compuestos de azufre y de hierro, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Finalmente, se completó el análisis molecular para clasificar filogenéticamente a esta nueva especie aislada de las muestras del Sistema Geotermal Copahue.

3.1. Aislamiento en medio sólido

Las especies microbianas termoacidófilas no suelen presentar abundante crecimiento en medio sólido; debido a ello, se plantearon diferentes alternativas para lograr el desarrollo de colonias que permitan obtener cultivos puros. Debido a las condiciones extremas de cultivo, elevada temperatura y bajos valores de pH, los agentes de gelificación usados comúnmente para medios sólidos (agar-agar, agarosa, sílice) no resultan adecuados. Por esa razón, se optó por un polisacárido de alto peso molecular, conocido comercialmente como gelrita (o en su acepción inglesa gellan gum) que es producido por cultivos puros de *Pseudomonas elodia* al fermentar carbohidratos. Este exopolímero está constituido por unidades repetidas de β -D-glucosa, L-ramnosa y D-ácido glucorónico (Figura 3.1). La composición química es aproximadamente de 60 % en glucosa, 20 % en ramnosa y 20 % en ácido glucorónico (Bajaj y col., 2007). La gelrita ha sido recomendada como agente gelificante sustituto del agar para usos

bacteriológicos en general ya que es tolerado por muchos microorganismos (Shungu y col., 1983); es particularmente adecuado para el cultivo de microorganismos acidófilos y termófilos debido a que mantiene su poder gelificante a altas temperaturas y bajos pH (Denning y Baross, 1986; Lin y Casida, 1984).

Figura 3.1. Unidades estructurales que se repiten para constituir el polisacárido gelrita. A) Estructura natural y B) Estructura deacetilada

Los protocolos para la preparación de reactivos y medios de cultivo utilizados en esta fase experimental se describen en el Anexo VIII. Se sembraron en medio sólido los cultivos de enriquecimiento de B9, LMi y LMa, en M88+S y en M88+T. También se sembraron las muestras ambientales obtenidas en dos campañas consecutivas llevadas a cabo en los años 2008 y 2009. Los puntos de muestreo que se evaluaron provenían del Campo Geotermal Copahue (B9, LMi, LMa y LMa3) y del Río Agrio (NA, VA1 y VA2).

El medio sólido de cultivo, con gerlita como agente gelificante, contenía además OK suplementado con extracto de levadura y/o pluripectona, más tetrationato como compuesto reducido de azufre (OK+T+pP). Las placas se incubaron a 65 °C durante 15 días y se prepararon según las indicaciones del protocolo denominado “doble capa” propuesto por Lindstrom y Sehlin (1989). Para ello, se utilizaron simultáneamente dos concentraciones de gelrita, generando una capa superficial relativamente fluida y con mayor contenido de agua, asentada sobre una capa densa que proporciona la rigidez del gel. Este diseño permite que los microorganismos tengan más disponibilidad de agua y

que las placas no se deshidraten tan rápidamente debido a las altas temperaturas de incubación.

Las muestras ambientales sembradas directamente en placa no arrojaron resultados positivos. No se observaron colonias en ninguno de los intentos de aislamientos llevados a cabo durante varias campañas consecutivas. Se obtuvieron colonias, en cambio, a partir de los cultivos de enriquecimiento en M88+S y M88+T para las muestras del campo geotermal Copahue (B9, LMi y LMa) y para las tres muestras del Río Agrio (NA, VA1 y VA2). De las muestras enriquecidas del sitio de muestreo denominado LMa3, sólo arrojaron resultados positivos aquellos cultivos provenientes del pozo termal designado LMa3-75. Algunas de las placas con desarrollo de colonias se muestran en la Figura 3.2.

En general, la formación de colonias fue mucho menor a la cantidad de células sembradas; esto constituye una diferencia respecto de lo reportado para otras especies termófilas como del género *Acidianus* o *Sulfolobus* (Lindstrom y Sehlin, 1989; Cardona y col., 2001; He y col., 2004). Las colonias circulares obtenidas en la mayoría de los cultivos fueron de tamaño pequeño, bordes lisos y crecieron sobreelevadas en la superficie de la placa. El color de las colonias fue blanco en la fase inicial y se tornaron amarillas después de 15 días de incubación a 65 °C. También fue baja la eficiencia en la transferencia de las colonias a nuevos medios sólidos e incluso a medios de enriquecimiento líquidos, resultando dificultoso en muchos casos la recuperación de los cultivos puros.

Figura 3.2. Siembra de placas en medio sólido usando técnica de la doble capa y colonias obtenidas para muestras enriquecidas en M88+S e incubadas a 65 °C

Debido a la dificultad para transferir las colonias a medio líquido, se realizó una nueva siembra de los cultivos de B9, LMi y LMa, en medio sólido, con las sales basales suplementadas con sacarosa y extracto de levadura, y sin tetrationato de potasio. Nuevamente se utilizó gelrita como gelificante y se incubaron las placas a 65°C (Cardona y col., 2001).

La Figura 3.3 muestra que el crecimiento celular se presentó en formas de colonias definidas y como pátina blanca extendida en la superficie del medio sólido después de 4 días de incubación.

Figura 3.3. Colonias obtenidas en medio sólido sin fuente de azufre luego de 4 días de incubación a 65 °C con inóculos provenientes de medio de enriquecimiento M88+T

Las colonias obtenidas fueron de color blanco, cremosas, con bordes lisos y la observación al microscopio óptico reveló presencia de gran cantidad de cocos (Figura 3.4). En cambio, la pátina blanquecina de la superficie mostró al microscopio células con morfología de bacilos de diferente tamaño, exhibiendo en algunos casos células aisladas o conformando cadenas de varios microorganismos unidos.

Figura 3.4. Células con morfología tipo coco o lobular provenientes de las colonias desarrolladas en medio sólido sin fuente de azufre

Figura 3.5. Micrografías de transmisión electrónica de las muestras LMa (A, B y C) y de LMi (D, E y F). La magnificación para A y D es tal que la barra equivale a 0,85 μm ; mientras que en el resto de las fotos la barra equivale 0,21 μm

Con esta variante del medio sólido, parte de las colonias de las placas fueron transferidas exitosamente a los medios de enriquecimiento M88+T, M88+S y M88+Sac, obteniéndose un adecuado desarrollo celular en todos los casos. A partir de estos cultivos se realizaron las experiencias para caracterizar fisiológicamente los aislados obtenidos. La Figura 3.5 muestra una micrografía de transmisión electrónica realizada

sobre las muestras de LMi y LMa en M88+T+pP; en ella se puede apreciar la morfología típica de arqueas con la capa S rodeando la membrana plasmática.

3.2. Determinación de los parámetros de crecimiento

Se realizaron cinéticas de crecimiento utilizando medio M88+Sac que permitió un desarrollo importante de los cultivos provenientes de B9, LMi y LMa (Figura 3.6).

Figura 3.6. Cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas y determinación de la temperatura óptima de crecimiento

Las cinéticas se llevaron a cabo a diferentes temperaturas dentro del rango de 55 a 80 °C y a un pH inicial igual a 3,0, sin regulación posterior. El recuento celular fue realizado mediante microscopía óptica con contraste de fase.

Los tres cultivos mostraron buen desarrollo a todas las temperaturas ensayadas aunque la temperatura óptima resultó ser de 75 °C para todos los casos (ver Figura 3.6).

El tiempo de duplicación fue calculado mediante el algoritmo propuesto por <http://www.doubling-time.com> (Roth, 2006).

También se determinó el valor de pH óptimo para los tres cultivos. Se utilizó medio M88+Sac con diferentes valores de pH inicial y se efectuaron las cinéticas en frascos agitados a 75 °C.

En la Figura 3.7 se observa la evolución de la concentración celular de los diferentes cultivos. Todos los cultivos presentaron desarrollo microbiano en el rango de valores de pH analizados. Los cultivos provenientes de B9 y LMa fueron más eficientes en la producción de biomasa a pH 3,0 mientras que para LMi resultó óptimo el valor de pH 2,5.

Figura 3.7. Cinéticas de crecimiento a 75 °C y a diferentes valores de pH inicial

3.3. Utilización de diferentes fuentes de energía

Una vez determinados los parámetros de pH y temperatura más adecuados, se evaluaron diferentes fuentes de energía.

En la Figura 3.8 se observa la evolución de la población microbiana y del pH para los cultivos B9, LMi y LMa, cuando se utilizaron diferentes fuentes de energía: sacarosa, triptona y azufre.

Figura 3.8. Cinéticas de crecimiento y evolución del pH para diferentes consorcios microbianos utilizando medios de enriquecimiento suplementados con azufre, tetratiónato de potasio y sacarosa

La Figura 3.8 muestra que los cultivos desarrollaron mayor biomasa cuando utilizaron sacarosa como fuente de energía ($4,5 \times 10^8$ células.mL⁻¹, luego de 30 horas). Durante el cultivo, se observaron cúmulos e incluso flóculos de células, tal cual muestra la micrografía de la Figura 3.9 (tomada a las 96 hs de iniciado el ensayo, con una cámara digital Sony Cyber-shot DSCW200 y microscopio óptico equipado con dispositivo de

contraste de fase y magnificación de 1200X). Los pequeños puntos negros, algunos de ellos señalados con flechas amarillas, corresponden a células con morfología lobular (tipo cocos) provenientes del cultivo LMi.

La formación de agregados celulares ha sido descrita en diferentes cultivos de arqueas como respuesta a diferentes condiciones de estrés: exposición a radiación UV o a concentraciones crecientes de algunos cationes (Frols y col., 2009; Frols y col., 2008; Yoshitaka y col., 2005; Yoshitaka y col., 2007; Lapaglia y Hartzell, 1997). No obstante, en este caso no se ha podido establecer la causa para la formación de los flóculos.

Figura 3.9. Fase final de un cultivo proveniente de Las Maquinitas desarrollado en M88+Sa

La concentración celular máxima alcanzada fue aproximadamente de $3,5 \times 10^8$ células.mL⁻¹, después de 12 días, y utilizando tetrionato como fuente de energía; en cambio, cuando el medio sólo fue suplementado con azufre, las poblaciones celulares alcanzaron el rango de $1,8$ a $2,5 \times 10^8$ células.mL⁻¹ después de 30 días de incubación. La Figura 3.10 muestra que en ambos medios se forman algunos aglomerados celulares, aunque en menor proporción que cuando el medio contenía sacarosa.

Figura 3.10. Imágenes de microscopía óptica del cultivo de LMi desarrollado en M88+S y M88+T

Para los medios de cultivo suplementados con sacarosa, el pH se mantuvo en el rango del valor inicial (2,5 a 3,0), mientras que cuando se utilizó tetratiónato de potasio, el valor final del pH descendió hasta 1,6. Los valores de pH más bajos (menores que 1,0), según puede verse en la Figura 3.11, se alcanzaron en el medio M88+S. Esto sugiere la existencia de oxidación microbiana del azufre original o del que probablemente se genera por reacción del tetratiónato.

Figura 3.11. Cultivos provenientes de LMi utilizando diferentes fuentes de energía

La oxidación biológica de azufre a ácido sulfúrico procede en varios pasos e involucra diferentes compuestos intermediarios tales como sulfito, tiosulfato, tetratiónato y sulfuro de hidrógeno. Se conocen diferentes reacciones químicas y se han aislado y caracterizado las correspondientes enzimas que permiten explicar dicha oxidación para algunos microorganismos. El complejo enzimático Sox es uno de ellos, quizás el más estudiado, y cataliza la oxidación de azufre a pH neutro, en ciertas bacterias. Sin embargo, en arqueas o bacterias acidófilas nunca se encontró un complejo similar. Para las arqueas acidófilas, se ha demostrado que la oxidación de azufre es mediada en primer lugar por la enzima sulfurooxigenasa reductasa (SOR) (Urich y col, 2006; Kletzin, 2008). Esta enzima, que cataliza la reacción de dismutación del azufre, tiene características únicas: es soluble, requiere oxígeno y no necesita de cofactores orgánicos para su actividad. Los productos de la reacción son sulfito, tiosulfato y sulfuro de hidrógeno, manteniéndose una relación estequiométrica 1:1 entre compuestos oxidados y reducidos.

El tiosulfato es posiblemente un producto no enzimático de condensación de sulfito, en exceso de azufre:

Si el pH es menor o igual que 4, la reacción se desplaza en forma neta a la izquierda mientras que si el pH es mayor o igual que 6, la reacción está desplazada significativamente a la derecha.

Las reacciones (1) y (2) justifican la disminución del pH observada en las cinéticas de crecimiento de los microorganismos del campo geotérmico Copahue cuando crecieron en M88+S.

Para los cultivos desarrollados en medios suplementados con tetratiónato de potasio, se detectó la acumulación progresiva de un precipitado. En la Figura 3.12 se muestra un cultivo en su estadio final de crecimiento; el precipitado formado *in situ* fue filtrado y secado a 70 °C.

Figura 3.12. Precipitado obtenido en medios de cultivo suplementados con tetrationato de potasio y consorcios provenientes del campo geotérmico Copahue

La morfología y composición del precipitado fue estudiada mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía por rayos de energía dispersiva (EDAX) y microscopía óptica (ver Figura 3.12). El espectro obtenido utilizando EDAX presentó un único pico y puso en evidencia que el elemento azufre es el componente mayoritario del precipitado. Mediante microscopía óptica se observó que el precipitado presentaba cristales piramidales, bi-piramidales rómbicos o combinación de ambos. De estos resultados se infiere que el precipitado es una forma alotrópica de azufre elemental. En otros procesos microbianos sobre tetrationato, también se ha reportado la producción de gránulos constituidos por alguna forma polimérica de azufre insoluble en agua. Estos glóbulos de azufre, que se almacenan dentro o fuera de las

células, participan del metabolismo de oxidación como compuestos intermediarios o como producto final del mismo, tanto en procesos aeróbicos como anaeróbicos (Dahl y Prange, 2006). Diferentes estudios han mostrado que la composición de los glóbulos de azufre puede variar según sea el tipo de microorganismo que lleve a cabo la oxidación, habiéndose encontrado glóbulos formados por anillos de azufre ($\alpha\text{-S}_8$) por cadenas lineales de azufre (S_n) y por politionatos ($\text{S}_n\text{O}_6^{2-}$) (Prange y col., 2002). Por otra parte, la alta entalpía de formación del enlace S-S como en S_8 (264 kJ/mol) tiene como consecuencia la posible formación de numerosos compuestos homo-atómicos en forma de largas cadenas o anillos que, a su vez, pueden reaccionar de manera no enzimática. Así, en medio ácido se pueden acumular politionatos y formarse cadenas de más de 50 átomos de azufre que se descomponen a pH mayor que 6 (Steudel, 2000). Para intentar dilucidar la composición del precipitado formado en los cultivos desarrollados en M88+T se realizó un estudio por IR.

Para ello se comparó el espectro de absorción molecular (IR) del residuo obtenido en el cultivo LMa con sendos patrones de azufre (S_{GA}) y de tetratiónato de potasio de grado analítico. Las muestras fueron preparadas en pastillas de KBr (Figura 3.13).

Figura 3.13. Espectros de absorción IR para azufre, tetratiónato de potasio y precipitado obtenido al cultivar microorganismos provenientes de LMa en M88+T

El precipitado, obtenido en los cultivos de cepas termófilas provenientes de LMa, no mostró ninguno de los picos de absorción característicos de los politionatos ($\text{S}_m\text{O}_6^{2-}$), en los números de onda 650, 1032-1054 y 1219-1240 cm^{-1} (Figura 3.13); estos picos se asignan comúnmente a las deformaciones simétricas (δ_s) de los enlaces (O-S-O) y a las deformaciones simétricas y asimétricas de valencia (ν_s y ν_{as}) de los enlaces (S-O) respectivamente (Church y Evans, 2008). Por otra parte, el comportamiento del espectro del precipitado siguió el mismo patrón que la muestra de azufre sugiriendo que el mismo está constituido por alguna forma alotrópica de azufre elemental como el $\alpha\text{-S}_8$ o, quizás, por cadenas de polisulfuros.

Las bandas correspondientes a las vibraciones de estiramiento para la variedad de azufre ortorrómbica (S_8), se hallan en la región comprendida entre 650 y 1000 nm. Sin embargo, el número de modos de vibración es grande, lo que resulta también en un número considerable de sobretonos y bandas de combinación que dificultan la asignación de las mismas, sobre todo si no se deconvolucionan las bandas (Eckert y Steudel, 2003). De todos modos, todos los indicios conducen a que se trata de un precipitado de azufre; la formación de azufre coincidiría con lo reportado en cultivos de *Acidianus ambivalens* creciendo sobre tetratiónato y que fue justificado por la actividad de una enzima con actividad tetratiónato hidrolasa (TTH) que presenta este microorganismo (Muller y Kletzin, datos no publicados).

3.4. Capacidad hierro-oxidante de los cultivos

Se realizaron ensayos para determinar si los aislados de B9, LMi y LMa podrían oxidar hierro(II) bajo condiciones autotróficas y bajo condiciones heterotróficas. En ellos se usó el medio MP que tiene menor concentración de sulfatos y fosfatos que los medios 9K y M88, para evitar de ese modo la formación de una gran cantidad de precipitados de hierro. El medio MP se suplementó con hierro(II) hasta alcanzar una concentración de 2,0 g.L^{-1} ; cuando fue necesario, se agregó extracto de levadura como fuente orgánica.

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados a 75 °C y a pH igual a 2,0, mostraron que los aislados de B9, LMi y LMa fueron capaces de oxidar hierro(II), en condiciones autotróficas y bajo condiciones aeróbicas, por más de 10 repiques consecutivos. La Figura 3.14 presenta fotografías de frascos, inoculados y estériles, tomadas a las 24 y a las 48 horas de iniciado el ensayo, mostrando la intensificación del color propia del aumento en la concentración de hierro(III). En la misma figura, se muestran dos sectores del campo óptico del microscopio equipado con dispositivo de contraste de fase (aumento de 40X) para el caso de LMi, y representativo de lo observado también en los otros casos. Con flechas amarillas se señalan algunas células con morfología circular (tipo coco); no se observaron flóculos o agregados celulares.

Figura 3.14. Micrografías ópticas de células del cultivo LMi y de cristales de los precipitados de hierro formados durante el ensayo a 75 °C en MP+Fe (aumento 40X)

La población final fue del orden de 1×10^8 células.mL⁻¹ que es semejante a la que se alcanza para otros microorganismos (por ejemplo, *Acidithiobacillus ferrooxidans*) creciendo sobre la misma cantidad de hierro(II).

En la Figura 3.14 se observan cristales de precipitado (indicados por flechas celestes) que se formaron durante la evolución del cultivo. El valor de pH del sistema (aproximadamente 2) y la morfología hexagonal de los cristales indicarían que el precipitado obtenido podría contener goetita, ferrihidrita y/o hematita. Goetita y hematita son los dos óxidos de hierro termodinámicamente más estables en condiciones aeróbicas y a presión atmosférica y han sido descritos en procesos ambientales (Cornell y Schwertmann, 2003; Boudeulle y Muller, 1988).

Figura 3.15. Cinéticas de consumo de hierro(II) a diferentes condiciones de pH y 75 °C

Las cinéticas de oxidación de hierro(II) a diferentes valores de pH inicial se muestra en la Figura 3.15. Aunque estos aislados pueden crecer bajo condiciones autotróficas, en ese caso se suplementó con 0,1 g/L de extracto de levadura que aumentó

la velocidad de oxidación de hierro(II). La velocidad fue mayor para pH igual 2 en los casos de B9 y LMa. En el caso de LMi, se produjo cierto retraso sólo cuando el pH inicial fue 1.

3.5. Ensayos en anaerobiosis

Se han detectado sólo algunas cepas de arqueas termófilas con capacidad de crecer anaeróbicamente y de utilizar hierro(III) autotróficamente y a bajos valores de pH (Kashefi y col., 2002; Slobodkin, 2005; Yoshida y col., 2006). Para evaluar el crecimiento bajo condiciones anaeróbicas a 75 °C, se realizaron ensayos variando las cuplas redox (esto es, variando la especie dadora y/o la aceptora de electrones): Fe(III)/S⁰, Fe(III)/H₂, S⁰/H₂. En los casos correspondientes, el azufre fue agregado en la cantidad de 10,0 g/L; el hierro(III) fue agregado en concentración de 2-4 g.L⁻¹; el hidrógeno fue generado in situ a partir de hierro electrolítico. En todos los casos, se suplementó el medio MP (pH=2,0) con bicarbonato de sodio hasta alcanzar una concentración final de 0,01M.

Par Fe(III)/S⁰

La reacción química que podría aprovechar el microorganismo para obtener energía es la siguiente:

La Tabla 3.1 describe los resultados para los sistemas inoculados y para el control estéril, luego de 7 días de incubación a 75°C y sin agitación. Se observa una disminución en los valores de pH y Eh al final del ensayo y un incremento en la concentración de hierro(II) y en el crecimiento celular en concordancia con la ecuación (3). La Figura 3.16 muestra la reducción de hierro(III) que tuvo lugar en los frascos inoculados (bastante superior a la detectada en el control abiótico). Estos resultados confirman que los cultivos ensayados son capaces de utilizar hierro(III) como último

aceptor de electrones en ausencia de oxígeno y en forma autotrófica y con azufre como dador de electrones.

Tabla 3.1 Parámetros fisicoquímicos y concentración celular a los 7 días de incubación en anaerobiosis a 75 °C. Medio MP de pH igual a 2 y con 4,0 g.L⁻¹ de hierro(III)

Cultivo	Fe(II) (g.L ⁻¹)	Celulas.mL ⁻¹	pH	Eh (mV)
B9	1,39	3,1x10 ⁷	1,25	457
LMi	1,23	2,5x10 ⁷	1,30	417
LMa	1,34	2,0x10 ⁷	1,30	441
Control	0,32	-----	1,90	590

Figura 3.16. Cultivos anaeróbicos creciendo en condiciones autotróficas a expensas de la transferencia de electrones en la cupla [S⁰/Fe(III)] comparados con el control estéril

Par Fe(III)/H₂

Comprobada la capacidad de los aislados de crecer bajo condiciones anaeróbicas, se decidió probar si el hidrógeno podía ser el dador de electrones. Para ello se repitieron los ensayos anteriores pero reemplazando el azufre por hidrógeno gaseoso.

El suministro del gas se realizó en forma indirecta mediante el agregado de hierro electrolítico, finamente dividido y previamente esterilizado (Johnson y col., 2009) que permitió obtener poder reductor de acuerdo a la ecuación (4):

La Figura 3.17 resume los resultados obtenidos para el aislado B9.

Figura 3.17. Evolución de los valores de pH, Eh, población celular y concentración de hierro(III) durante los ensayos en anaerobiosis para cultivos de B9 en M88+S a 75 °C (utilizando el par redox Fe(III)/H₂)

Al cabo de 8 días de incubación a 75 °C, el hierro(III) fue reducido a hierro(II) disminuyendo su concentración en la solución desde un valor de 4,0 g.L⁻¹ a 0,3 g.L⁻¹; en cambio, los controles estériles no modificaron prácticamente la concentración inicial de hierro(III). La foto de la figura ratifica esta afirmación. La reducción de hierro(III) fue acompañada por la disminución en los valores de pH y Eh y por el aumento de la población celular. La ecuación (5) se ajusta a la descripción del proceso a partir del cual los microorganismos obtuvieron energía:

Este comportamiento fue confirmado para los tres aislados.

Par S⁰/H₂

Debido a la evidente capacidad de crecer bajo anaerobiosis, se decidió probar un último par redox. Muchos de los estudios de biorremediación de metales pesados a escala de laboratorio, e incluso a escala piloto, se han focalizado en la generación microbiana de sulfuro de hidrógeno (bio-sulfidogénesis) que permite inmovilizar los iones metálicos por precipitación de los sulfuros. Los principales microorganismos capaces de producir biosulfidogénesis son las bacterias sulfato-reductoras (SRB) (Jameson y col., 2010); lamentablemente, la aplicación de estas técnicas se ha visto generalmente restringida a un rango de pH mayor a 5, debido a la escasa presencia de SRB resistentes a bajos valores de pH (Koschorreck, 2008). No obstante, también se ha reportado producción de sulfuro de hidrógeno a partir del crecimiento anaeróbico de algunas arqueas acidófilas como *Thermoplasma* y *Acidianus* ssp. (Slobodkin y col., 1999; Kletzin y col., 2004; Johnson y Hallberg, 2008). La detección de enzimas como sulfuroreductasa e hidrogenasa en *Acidianus ambivalens*, permitió explicar la existencia de dicha vía metabólica (Kletzin, 2008).

En función de ello, resulta importante analizar si los cultivos enriquecidos del sistema geotermal Copahue son capaces de generar sulfuro de hidrógeno a partir de azufre elemental e hidrógeno gaseoso generado según la ecuación (6)

Se realizaron ensayos en anaerobiosis, con protocolos experimentales similares a los descritos anteriormente, pero reemplazando el aceptor y/o el dador de electrones.

La Figura 3.18 muestra los frascos de anaerobiosis con inóculo LMa después de 72 h de incubación a 75 °C. En este caso, existe producción de H₂S incluso en el control

estéril; para verificarlo cualitativamente se extrajo una muestra con jeringa y se la hizo reaccionar con una solución de acetato de plomo embebida en un papel de filtro. El precipitado obtenido en el centro del papel corrobora la presencia del gas sulfhídrico.

Por otra parte, en el frasco inoculado la cantidad de gas sulfhídrico producido por reducción de azufre, catalizada por acción de los microorganismos presentes, contribuye a la formación y precipitación de FeS negro que se observa en la misma figura.

Figura 3.18. Sistemas estéril e inoculado del ensayo en anaerobiosis a 75 °C con H_2/S como par redox para la reacción de transferencia de electrones.

Los ensayos realizados permitieron corroborar las diferentes estrategias metabólicas a las que esta especie de *Acidianus* puede apelar para subsistir en los ambientes extremos que coloniza. La capacidad de utilizar metabolismos tanto aeróbicos como anaeróbicos, le otorga ventajas claras a esta especie autóctona de *Acidianus* para sobrevivir en un hábitat extremo que, además, puede variar fácilmente en sus condiciones de pH, temperatura y oxígeno disuelto así como por la presencia de fuentes de energía.

3.6. Ensayos de tolerancia a metales pesados y arsénico

Los metales pesados, típicamente tóxicos aun en concentraciones trazas, están presentes en grandes concentraciones en los ambientes naturales habitados por los

microorganismos acidófilos y también en los procesos biohidrometalúrgicos en los que suelen participar dichos microorganismos. En contraste con la gran cantidad de información acerca de los mecanismos y niveles que regulan la tolerancia a metales pesados en microorganismos neutrófilos (Nies, 2003), se conoce relativamente poco acerca de cómo se completan las vías metabólicas y cuales son los límites que soportan los microorganismos procariotas acidófilos y, en particular, los termófilos. Se ha estudiado el grado de toxicidad y el desarrollo de algunas formas de resistencia para varios metales en cultivos de las arqueas: *Sulfolobus metallicus*, *Sulfolobus sulfataricus*, *Metallosphaera sedula*, *Acidianus ssp.*, entre otras (Dopson y col., 2003; Dopson y col., 2006; Remonsellez y col., 2006; Schelert y col. 2006; Salsano y col., 2007; Auernick y col., 2008a).

Debido a esas razones y en función de posibles aplicaciones en procesos biotecnológicos en las que podrían usarse los microorganismos del sistema geotermal Copahue, se realizaron ensayos de tolerancia de los microorganismos aislados, a metales pesados usualmente presentes en operaciones biohidrometalúrgicas y a arsénico. Los ensayos fueron realizados según los protocolos que se describen en el Anexo IX y se evaluó la toxicidad de las siguientes especies de arsénico en estado trivalente y los cationes bivalentes de cobre, níquel, cadmio y cinc.

Los resultados obtenidos para el cultivo de LMa (representativos de todos los aislados) se muestran en la Figura 3.19.

Figura 3.19. Porcentajes de inhibición en el crecimiento de los cultivos LMa en presencia de diferentes metales pesados y arsénico

El catión arsénico(III) inhibió el crecimiento en aproximadamente un 30 % cuando se adicionó en una concentración de 0,3 mM (datos no graficados) mientras que la inhibición fue del 80 % para una concentración igual a 1 mM. Se han reportado valores de tolerancia de este orden para *Metallosphaera sedula* (Dobson y col., 2003). Los cultivos ensayados de LMa mostraron mayor tolerancia a cinc que al resto de los metales. El nivel de cinc tolerado por LMa (10 mM) es del orden de la que se reporta para *Sufolobus acidocaldarius* (Miller y col., 1992) pero inferior a la que soporta *Metallosphaera sedula* (Huber y col., 1989). La tolerancia a metales pesados demostrada por las cepas aisladas de Copahue, fue menor a la encontrada para otras arqueas (Auernick y col., 2008b).

3.7. Ensayos de tolerancia a cloruro de sodio

Los campos termales continentales, en general, reciben el aporte de aguas dulces provenientes de precipitaciones o infiltraciones que reducen la concentración de iones normalmente disueltos en los fluidos hidrotermales. Es frecuente que los microorganismos que habitan estos ambientes no resistan concentraciones salinas mayores al 1 % p/v de cloruro de sodio. No obstante, se han reportado algunas especies moderadamente halotolerantes (0,5-2,5 % de cloruro de sodio) tales como *Pyrobaculum islandicum* y *Thermococcus zilligii* y otras pertenecientes al orden Sulfolobales (Seegerer y col. 1986; Santos y da Costa, 2002; Plump y col., 2007). Se realizaron ensayos para evaluar el crecimiento de los aislados LMa, B9 y LMi en presencia de cantidades crecientes de cloruro de sodio (1-5 %) respecto de un cultivo control sin agregado. El medio basal usado para los ensayos fue medio M88+Sac. La biomasa se cuantificó midiendo absorbancia a 650 nm y los resultados obtenidos se muestran en Figura 3.20 para el cultivo LMa (representativo de los resultados encontrados).

Figura 3.20. Resultados obtenidos al cultivar una muestra de LMa a 75 °C en medio OK+T+pP y con concentraciones crecientes de cloruro de sodio

Para valores de concentración de cloruro de sodio del 1 % se alcanzó el 70 % de inhibición en el crecimiento celular, respecto del cultivo en ausencia de la sal.

3.8. Clonación y secuenciación del gen ADNr -16S

Se realizaron nuevos ensayos de extracción, clonado y secuenciación del gen ADNr-16S para los aislados de B9, LMi y LMa, con la finalidad de obtener la secuencia completa de dicho gen (~1500 pb). Esto permitiría una profundización de los resultados obtenidos a partir del análisis de la secuencia parcial (~ 500 pb) según se especificó en el Capítulo 2.

Mediante el protocolo de clonación y secuenciación, que se describe en el Anexo X, se obtuvieron varias secuencias de cada sitio. Se realizó un exhaustivo análisis de cada grupo, observando los cromatogramas de cada secuencia, alineándolas unas con otras para tratar de eliminar los errores de lectura del secuenciador o nucleótidos faltantes, y seleccionando la de mayor consenso como representativa de ese sitio.

Posteriormente se procedió al análisis y comparación de las secuencias representativas. Este procedimiento permitió ver que las diferencias entre ellas fueron de unos pocos nucleótidos y que podrían representar cierta variación intra-específica asociada al sitio de procedencia.

Posteriormente, las secuencias representativas fueron analizadas mediante el algoritmo BLAST comparando con la base de datos del GenBank. Los resultados obtenidos mostraron que los genes comparados de cultivos B9, LMi y LMa comparten mayores porcentajes de similitud con microorganismos del **género** *Acidianus*, dentro del **orden** Sulfolobales.

La Tabla 3.2 muestra un resumen de los resultados obtenidos en la comparación de las secuencias del ADNr -16S con las cepas del género *Acidianus* presentes en la base de datos de GenBank. El porcentaje de cobertura (porcentaje que se ha conseguido encontrar en la base de datos sobre el total de la longitud de la secuencia que hemos introducido) se mantuvo entre el 99 y el 100% y el valor estadístico E_{value} fue igual a cero para todas las comparaciones efectuados. Esto indica un excelente solapamiento

entre las secuencias comparadas, aportándole un alto grado de significación a la prueba realizada.

Se realizó el estudio filogenético con los datos de las secuencias representativas de cada sitio de muestreo. El resultado es el árbol de la Figura 3.21 obtenido con el método *Neighbor-Joining*. La robustez del árbol fue evaluada con un análisis de *bootstrap* utilizando 1000 repeticiones. La escala indica el número de sustituciones acumuladas cada 100 nucleótidos. Como grupo externo se utilizó la secuencia de la especie *Thermoplasma acidophilum*. En la figura se indican los nombres de las cepas, sus códigos de ceparios y el número de acceso del GeneBank entre paréntesis. Adicionalmente, se señala como <T> cuando la cepa es la representativa de su grupo.

Tabla 3.2. Comparación entre las secuencias de ADNr-16S de los cultivos de Copahue con las cepas de género *Acidianus*

Especies del género	Ale_1_arch_d5	Ale_2_arch_c12	Ale_4_arch_b8
<i>Acidianus</i>	B9	LMa	LMi
<i>Acidianus manzaensis</i> <AB182498.1>	90 % (99 %)	90 % (99 %)	90 % (99 %)
<i>Acidianus sulfidivorans</i> <AY907891.1>	90 % (99 %)	90 % (99 %)	89 % (99 %)
<i>Acidianus brierleyi</i> <D26489.1>	89 % (99 %)	89 % (99 %)	89 % (99 %)
<i>Acidianus infernus</i> <D85505.1>	89 % (100 %)	90 % (100 %)	90 % (100 %)
<i>Acidianus ambivalens</i> <D85506.1>	90 % (100 %)	90 % (100 %)	90 % (100 %)
<i>Acidianus tengchngensis</i> <AF226987.1>	89 % (99 %)	89 % (99 %)	89 % (99 %)

* Porcentaje de cobertura se muestra entre paréntesis, $E_{value} = 0$ para todos los casos

El árbol filogenético se determinó comparando fragmentos de alrededor de 1500 pares de bases, para cada una de los tres aislados, contra otras especies de arqueas. El estudio filogenético realizado mostró que los aislados B9, LMi y LMa comparten una rama que se bifurca en un nodo; en ese punto, se separa de otras especies de *Acidianus* como *A. mazaensis*, *A. ambivalens* y *A. sulfidivorans*; existe, en cambio, una mayor

distancia con otras especies de *Acidianus* como *A. brierleyi* y *A. tengchongenses* que se separaron en nodos anteriores. Del análisis filogenético se infiere que los aislados B9, LMi y LMa constituyen una nueva especie del género *Acidianus* (ver Figura 3.21).

Figura 3.21. Árbol filogenético basado en el análisis de secuencias 16S del ADNr. En el mismo se muestra la posición taxonómica de los clones representativos de cada sitio de muestreo. La escala indica el número de sustituciones acumuladas cada 100 nucleótidos

El árbol filogenético muestra que las tres cepas de *Acidianus* de Copahue forman parte de una rama junto a otras especies de *Acidianus* y a especies de *Metallosphaera*. Sin embargo, estos géneros son fisiológicamente diferentes en términos de su metabolismo: los miembros del género *Acidianus* son anaeróbicos facultativos

mientras que los de *Metallosphaera* son aeróbicos estrictos (semejantes a los del género *Sulfolobus*). Si bien no se analizaron hasta el momento los porcentajes C+G de las cepas Copahue, las diferencias metabólicas encontradas claramente justifican que sean agrupadas en el género de *Acidianus* y no de *Metallosphaera*.

Por otra parte, el género *Acidianus* es separado en varios grupos monofiléticos de acuerdo a los análisis realizados sobre los ADN_r-16S; esta separación en grupos no tiene una correlación con la clasificación fisiológica en base los compuestos que usan como donadores de electrones ya que parte de los *Acidianus* conocidos son autótrofos obligados (*A. infernus*, *A. ambivalens* y *A. tengchongensis*) y otros son autótrofos facultativos (cepas *Acidianus* de Copahue, *A. manzaensis*, *A. brierleyi* y *A. sulfidivorans*) y no se separan con ese criterio en el árbol filogenético.

A continuación se presenta un cuadro comparativo de las diferentes cepas del género *Acidianus* reportadas hasta la fecha.

Especies del género	Parámetros fisiológicos y moleculares					
	Temperatura de crecimiento (°C)	pH de crecimiento (óptima)	Donador de electrones	Aceptor de electrones	Capacidad autotrófica	(%) Similitud 16S DNAr
<i>Acidianus</i>	55-80	1,0-5,0	H₂, S⁰, Fe²⁺	Fe³⁺, O₂	autótrofo	
de Copahue (1)	(75)	(2,5-3,0)	S₄O₆²⁻, *C.O.	S⁰	facultativo	100
<i>Acidianus</i>	60-90	1,0-5,0	H ₂ , S ⁰ ,	Fe ³⁺ ,	autótrofo	
<i>manzaensis</i> (2)	(80)	(1,2-1,5)	*C.O.	O ₂	facultativo	89
<i>Acidianus</i>	45-83	0,35-3,0	S ⁰ , Fe ²⁺ ,	Fe ³⁺ , S ⁰ ,	autótrofo	
<i>sulfidivorans</i> (3)	(74)	(0,8-1,4)	FeS ₂ , MS	O ₂	facultativo	89
<i>Acidianus</i>	45-75	1,0-6,0	H ₂ , S ⁰ , Fe,	S ⁰ ,	autótrofo	
<i>brierleyi</i> (4)	(70)	(1,5-2,0)	SF, *C.O.	O ₂	facultativo	89
<i>Acidianus</i>	65-96	1,0-5,5	H ₂ ,	S ⁰ ,	autótrofo	
<i>infernus</i> (5)	(90)	(2,0)	S ⁰	O ₂	obligado	90
<i>Acidianus</i>	70-87	1,0-3,5	H ₂ ,	S ⁰ ,	autótrofo	
<i>ambivalens</i> (6)	(80)	(2,5)	S ⁰	O ₂	obligado	90
<i>Acidianus</i>	60-90	1,0-5,5	H ₂ ,	S ⁰ ,	autótrofo	
<i>tengchongensis</i> (7)	(80)	(1,5-2,0)	S ⁰	O ₂	obligado	89

*C. O. = Compuestos orgánicos: Extracto de levadura, peptona, triptona, casamino ácidos, glucosa.

(1) Este trabajo; (2) Yosida y col., 2006; (3) Plump y col., 2007; (4) Segerer y col., 1986; (5) Segerer y col., 1986; (6) Kletzin, 2008; (7) He y col., 2004.

Las cepas de *Acidianus* de Copahue fueron capaces de utilizar azufre, tetratiónato de potasio, hierro(II) y algunos compuestos orgánicos como extracto de levadura, peptonas, casaminoácidos, sacarosa, glucosa como dadores de electrones. Además, se comportó como un autótrofo facultativo o mixótrofo. Su metabolismo resultó muy versátil ya que en anaerobiosis utilizó hierro(III) como aceptor de electrones frente al azufre y al hidrógeno y, además, utilizó al hidrógeno como dador de electrones con azufre como aceptor de electrones, generando sulfuro de hidrógeno. Todas estas combinaciones metabólicas a la vez no han sido reportadas para los otros miembros del género *Acidianus* hasta la fecha.

Sin dudas, el mayor logro en este capítulo es el aislamiento y caracterización, tanto fisiológica como molecular, de una nueva especie de *Acidianus* (para la cual se propondrá próximamente el nombre de *Acidianus copahuensis*). Esta especie no solo presenta capacidades lixiviantes en condiciones extremas de pH y de temperatura, sino que, además, es extremadamente versátil en cuanto a los metabolismos que presenta, pudiendo crecer en anaerobiosis y en condiciones aeróbicas y con variadas combinaciones de fuentes de energía, aceptores de electrones y fuentes de carbono.

CAPÍTULO 4

BIOLIXIVIACIÓN DE UN MINERAL DE CINC

Capacidad biolixivante
de consorcios termófilos

En los últimos 25 años la industria mundial del cinc se ha transformado desde la tradicional pirometalurgia a la más moderna hidrometalurgia (Harvey y col., 2002). En la actualidad, cerca del 90 % del total del porcentaje de cinc es obtenido por esta técnica extractiva (Asociación Internacional de Zinc, 2007). Sin embargo, se realizan continuos esfuerzos en mejorar los procesos comerciales para la producción de este metal a fin de lograr tratamientos con menor impacto ambiental. Dentro de este contexto, han empezado a ensayarse las técnicas biohidrometalúrgicas, ya sea a partir de concentrados o de minerales de baja ley cuyo beneficio no sería factible mediante técnicas tradicionales.

La producción mundial de cinc supera los 7 millones de toneladas (Asociación Internacional de Zinc, 2007) y se realiza en más de 50 países; el 67,55 % de la producción total se obtiene en China, Perú, Australia, Canadá y Estados Unidos. La demanda y el precio de este metal ha aumentado continuamente en la última década; en el año 2009, el continente que requirió mayor cantidad de cinc fue Asia, con el 64,45 % (5.099.000 TM) de la demanda total, seguido por la Unión Europea con el 17,64 % (1.396.000 TM), y América con un 14,81 % (1.172.000 TM). En relación con el consumo del continente americano, los principales mercados lo constituyeron Brasil, Canadá, Estados Unidos y México.

La Argentina cuenta con producción nacional de cinc; la exportación del metal a mercados internacionales se incrementó en los últimos años incorporando diferentes mercados entre los que se destacan Japón, China, Países Bajos, Singapur, Pakistán, etc.

Aunque hay yacimientos de cinc en la Provincia de Neuquén, no existe en la actualidad ningún emprendimiento minero activo dedicado a la explotación y producción de este metal. Algunos depósitos minerales han sido caracterizados mientras que otros se encuentran en etapa de exploración y cuantificación de reservas (Zanettini, 1979a; Zanettini, 1979b; Angelelli, 1984; Gallegos y col., 2004; Berbeglia y col., 2005). La producción de cinc podría impactar favorablemente en la economía regional y, por tal motivo, resulta relevante realizar estudios que evalúen los procesos biohidrometalúrgicos para la explotación de cinc.

En este capítulo se describirán los resultados de estudios de biolixiviación de un mineral regional de cinc, utilizando los consorcios termófilos, aislados y seleccionados en la zona geotermal de Copahue, y previamente caracterizados, tanto desde el punto de vista fisiológico como molecular.

Las muestras del mineral utilizado en estos ensayos provienen del yacimiento La Resbalosa ubicado geográficamente en la franja occidental de la provincia del Neuquén, Argentina, comprendida entre el límite con Chile en el oeste y el meridiano 70°-20' aproximadamente en el este (Fernández Lima, 1978). Las muestras fueron finamente molidas hasta alcanzar un tamaño de partículas menor a 74 μm y posteriormente secadas al aire. La composición mineralógica se determinó mediante análisis de difracción de rayos X en un difractómetro marca Rigaku modelo DII-Max $\text{CuK}\alpha$ con filtros de níquel. Los diagramas fueron obtenidos por rotación del goniómetro entre 10° y 70° y a una velocidad de 2 °.min⁻¹. Se realizaron cortes delgados y pulidos de las rocas y se completó la descripción petrocalcográfica del material mediante microscopía óptica. Los componentes mayoritarios y los metales de interés comercial fueron determinados mediante espectroscopía de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente (EA-ICP).

La composición mineralógica de las muestras de La Resbalosa presenta sulfuros metálicos formando vetas de textura brechosa. Las mismas están formadas por clastos del protolito sedimentario muy alterado, rodeando a los sulfuros de una matriz compuesta por agregados de cuarzo microcristalino de diferentes tamaños.

Las principales especies mineralógicas detectadas en la muestra fueron esfalerita (12 %), galena (2 %), pirita (8 %), calcopirita (1 %), cuarzo (67 %) y protolito alterado (10 %). En la Tabla 4.1 se detallan los elementos químicos mayoritarios y minoritarios presentes en el mineral.

Tabla 4.1. Composición química y mineralógica del mineral La Resbalosa (Neuquén, Argentina)

Componentes Mayoritarios (%)									
SiO₂	Al₂O₃	Fe₂O₃	MgO	CaO	Na₂O	K₂O	TiO₂	P₂O₅	MnO
26,31	4,310	18,20	0,20	0,11	0,05	1,24	0,13	0,01	0,62
Componentes Minoritarios (mg.kg⁻¹)									
Cr₂O₃	Cd	Ba	Cu	Zn	Ni	Co	Sr	Zr	
0,027	<10	30	496	226855	<20	<20	<10	76	

En la Figura 4.1 se muestran algunas fracciones del mineral seleccionadas a mano desde el seno de la muestra.

Figura 4.1. Fotografías de muestras del mineral de La Resbalosa. Se observa esfalerita de típica coloración grisácea y brillo no metálico adamantino

El mineral contiene alta concentración de esfalerita y muy poca roca de caja. Los cristales de esfalerita se manifiestan frecuentemente como agregados redondeados, formando maclas irregulares tal cual se muestra en la figura; también es posible encontrarlos en otros hábitos cristalinos como cubos, octaedros o dodecaedros. El color gris oscuro que presenta la esfalerita de La Resbalosa se debe al contenido de hierro en su estructura; en la naturaleza es posible encontrar esfaleritas cuya coloración se incrementa de blanco a negro en función de la incorporación progresiva de hierro en su estructura (Klein y Hurlburt, 2003). Por otra parte, en las muestras de la misma figura se puede ver una pátina oscura color marrón que recubre las maclas de esfalerita y que está constituida por óxidos de hierro y/o por pirrotita.

La composición mineralógica obtenida para el mineral de La Resbalosa es consistente con la procedencia del mineral: en esa zona, la esfalerita se encuentra

frecuentemente asociada a galena, pirita, pirrotita y magnetita (típica para los yacimientos hidrotermales) (Franchini y col., 2000).

Los ensayos de biolixiviación fueron realizados en frascos agitados (150 rpm). Se utilizaron dos medios de cultivo, M0K y M88, para evaluar el comportamiento autótrofo y heterotrófico de los microorganismos presentes en los consorcios termófilos utilizados. El pH inicial de cada sistema fue ajustado con una solución de ácido sulfúrico 10 N, hasta un valor igual a 2,0. El mineral fue adicionado en una densidad de pulpa de 1,0 % p/v. En algunos frascos, se adicionó 1,0 g de azufre en polvo para evaluar el potencial efecto de esta fuente de energía sobre la recuperación de cinc desde el mineral.

Los consorcios utilizados en estos ensayos de biolixiviación provienen de los enriquecimientos de las muestras B9 y LMi, utilizando medio de cultivo M88+T y con un valor de pH igual a 2,0. Tal cual se ha discutido en capítulos previos, estos enriquecimientos tienen una población dominante en arqueas pertenecientes al orden Sulfolobales (y que luego, tal cual se confirmó en el Capítulo 3, corresponden a una nueva especie de *Acidianus*).

Se realizaron controles estériles reemplazando el inóculo por el mismo volumen de una solución de timol en metanol (2,0 %). Ambos tipos de sistemas, inoculados y controles químicos, se mantuvieron en agitación continua a 70 °C durante 45 días. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Se compensaron las pérdidas de agua por evaporación y se extrajeron muestras de la solución para evaluar la disolución de los metales (cobre, hierro y cinc) utilizando espectrofotometría de absorción atómica. Adicionalmente, se monitoreó la evolución de los cultivos mediante recuento celular por microscopia óptica (usando un microscopio con contraste de fase y cámara de conteo Petroff-Hausser) y mediciones de los valores de Eh y pH a través de electrodos específicos. Los residuos sólidos fueron analizados mediante difracción de rayos X (equipo y condiciones descriptas más arriba).

La Tabla 4.2 resume los valores de Eh y pH registrados al inicio y final de la experiencia de biolixiviación. Los valores de pH decrecieron en todos los frascos inoculados; el valor mínimo de pH (0,9) fue obtenido cuando el consorcio de B9 creció en condiciones heterótroficas, contrastando con el valor de pH 1,6, medido en ausencia de fuente orgánica. Para el cultivo LMi, la evolución del pH fue similar al mostrado por el cultivo B9.

Los valores de Eh iniciales en todos los sistemas se corresponden con los esperados para soluciones con concentraciones bajas en hierro(II) mientras que, al cabo de 45 días de ensayo, el registro de Eh sufrió un notorio incremento, especialmente en los sistemas inoculados. Esta actividad oxidativa de hierro(II) ocurrió en mayor medida en el medio M88.

Tabla 4.2. Parámetros fisicoquímicos durante el inicio y finalización del ensayo de biolixiviación del mineral de La Resbalosa con consorcios termófilos

	Tiempo [días]	B9				LMi				Estériles
		0K	0K+S	M88	M88+S	0K	0K+S	M88	M88+S	
pH	1	2,16	2,16	2,32	2,32	2,16	2,16	2,32	2,32	2,16
	45	1,60	1,57	2,15	0,90	1,54	1,66	1,47	0,95	2,40
Eh	1	270	278	279	283	266	262	278	283	260
	45	488	347	580	597	449	322	580	629	366

La Figura 4.2 muestra la cinética de solubilización de hierro durante los ensayos de biolixiviación. El porcentaje de hierro en solución fue calculado en relación al contenido de ese elemento inicialmente presente en el mineral de La Resbalosa.

Figura 4.2. Evolución del hierro solubilizado durante el ensayo de biolixiviación a 70 °C usando diferentes medios de cultivo y los consorcios termófilos B9 y LMi

Ambos consorcios (B9 y LMi) extrajeron mayor cantidad de hierro (hasta un 80 %) cuando los ensayos de biolixiviación se realizaron en medio M88+S. También los valores de Eh resultaron mayores en este medio. Esto indica que la adición de extracto de levadura y de azufre, proporcionan las condiciones más eficientes para remover el hierro inicialmente presente en el mineral.

Los controles estériles prácticamente no registraron hierro en solución; el leve incremento en los valores de Eh de esos sistemas, indicaría una oxidación parcial atribuida a la presencia de oxígeno y a la alta temperatura de incubación. La baja solubilización de hierro en estos controles, es consistente con el valor de pH alcanzado en los mismos (superior a 2,3).

El principal interés económico para el procesamiento del mineral de La Resbalosa, está asociado con la liberación de cinc. En la Figura 4.3 se muestran los perfiles de extracción de cinc para los sistemas inoculados (B9 y LMi) y para los controles estériles, durante los 45 días de ensayo. El porcentaje de cinc extraído fue calculado en base al contenido de cinc inicialmente presente en la muestra tratada.

Figura 4.3. Evolución del cinc solubilizado durante el ensayo de biolixiviación a 70 °C usando diferentes medios de cultivo y los consorcios termófilos B9 y LMi

La extracción de cinc fue mayor al 90 % para los cultivos de B9 y LMi creciendo en medio M88, independientemente de que estuvieran suplementados o no con azufre. Por el contrario, al utilizar medio 0K, la presencia de azufre modificó la extracción de cinc para ambos consorcios. Así, se recuperó aproximadamente entre el 50 y 60 % del cinc en ausencia de azufre mientras que el agregado de azufre provocó que la extracción de cinc cayese por debajo del 30 %. Los controles estériles apenas solubilizaron alrededor del 20 % del cinc contenido en el mineral de La Resbalosa. El mismo comportamiento se registró para la extracción de cobre: se alcanzó una solubilización de aproximadamente el 100 % del cobre de la muestra cuando se usó medio M88, mientras que para el resto de los sistemas la extracción fue menor al 30 % (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos muestran una eficaz disolución de la esfalerita utilizando los consorcios termófilos, especialmente en medio M88. En estas condiciones, las extracciones de cinc, cobre y hierro, fueron significativamente mayores a las obtenidas usando el mismo mineral de La Resbalosa en ensayos realizados en frascos agitados y en un reactor air-lift a 30 °C y con cultivos de bacterias mesófilas como *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* (Giaveno y col., 2005; Giaveno y col., 2007; Lavalle y col., 2008). En estos últimos ensayos, y luego de 45 días de biolixiviación a 30 °C, *A. ferrooxidans* logró una extracción del 60 % de cobre y de zinc y sólo el 10 % de hierro, mientras que *L. ferrooxidans* solubilizó cerca del 85 % de cobre, 60 % de zinc y 35 % de hierro. Resultados similares fueron reportados por Rodríguez y col. (2003c) al procesar concentrados de esfalerita con cultivos mesófilas y termófilos.

Los procesos de degradación de la esfalerita (ZnS) en presencia de microorganismos, proceden a través del mecanismo de polisulfuros (Sand y col., 1999; Sand y col., 2001) como lo esquematizan las siguientes ecuaciones químicas:

El hierro(II) producido en las reacciones 1 y 2 puede ser nuevamente oxidado a hierro(III) mediante la acción de microorganismos oxidantes del hierro (ecuación 4). La presencia de microorganismos oxidantes del azufre cataliza la reacción indicada por la ecuación (3) y también contribuye a la solubilización del cinc. El descenso del pH ayuda a mantener elevada la concentración de hierro(III) en solución que puede seguir atacando el sulfuro de acuerdo a la ecuación (1) (Sand y col., 1995; Tributsch, 1999; Sand y col., 1999; Schippers y Sand, 1999; Sand y col., 2001). Seguramente las ecuaciones indicadas también pueden explicar la solubilización de cinc observada durante los ensayos de biolixiviación descritos en este capítulo.

El agregado de extracto de levadura (M88) provocó un incremento de la población microbiana y, paralelamente, una mayor oxidación de hierro y azufre que, en definitiva, incrementó la extracción de cinc. En los cultivos en medio 0K, el agregado de azufre probablemente secuestró buena parte de los microorganismos que colonizaron inicialmente la superficie del azufre. Este efecto pudo disminuir la acción oxidante sobre el hierro(II) y, en definitiva, disminuyó la solubilización del cinc.

Los difractogramas de rayos X de los residuos sólidos formados durante los procesos de lixiviación, se muestran en la Figura 4.4. Después de 45 días de tratamiento con el consorcio LMi, la intensidad de los picos atribuidos a pirita y esfalerita disminuyó considerablemente; paralelamente, se detectó anglesita (PbSO_4) que corresponde a la oxidación de la galena (PbS) a través del hierro(III) generado por acción microbiana. También se detectó jarosita como principal compuesto de hierro(III) precipitado en los cultivos. En los controles estériles, la disminución de la intensidad de los picos de esfalerita y pirita y el incremento de la señal de jarosita fueron significativamente menores que en los sistemas inoculados. Por otra parte, en los controles estériles se detectó azufre (ya que no fue oxidado por acción microbiana) y no se detectó anglesita. En los residuos de la biolixiviación en medio 0K, se detectó mayor contenido de azufre; probablemente el azufre cubrió parcialmente al sulfuro retardando su solubilización. También se detectaron anglesita y jarosita pero en menor intensidad que en las lixivitaciones con M88.

Figura 4.4. Diagramas de rayos X obtenidos a partir de los residuos de los ensayos de biolixiviación del mineral de La Resbalosa (LR), utilizando un cultivo de LMi en M88, durante 45 días a 70 °C

Los resultados obtenidos en la biolixiviación de este mineral fueron analizados a través del modelo difusional conocido como “shrinking core/product layer”. En este modelo se describe a la partícula que contiene a los sulfuros metálicos como un núcleo que va reaccionando en el tiempo pero que mantiene su diámetro inicial; a medida que avanza la reacción se forma una capa no-reactiva a través de la cual deben difundir tanto productos como reactivos para continuar con el proceso de disolución (Levenspiel, 1972).

En los residuos sólidos de los ensayos de biolixiviación se detectaron azufre elemental, anglesita y compuestos de hierro(III) (principalmente jarosita). Estos compuestos conjuntamente con la ganga del mineral, podrían formar una capa no reactiva de compuestos insolubles sobre el núcleo de las partículas de mineral. Si el proceso de extracción de cinc está controlado por un mecanismo de tipo difusional, entonces la velocidad de lixiviación de cinc estará controlada por la difusión de productos y reactivos a través de esa capa no reactiva. En estos casos la cinética extractiva puede ser descrita por la ecuación (5) (Fowler y Crundwell, 1999):

$$Kp\ t = 1 - 2/3\ X - (1 - X)^{2/3} \quad (5)$$

Donde Kp es la constante parabólica (días^{-1}); t es el tiempo (días) y X es la fracción de cinc que ha reaccionado.

La Figura 4.5 muestra la gráfica de $[1 - 2/3\ X - (1 - X)^{2/3}]$ en función del tiempo (días) tomando los valores de extracción de la Figura 4.3.

Figura 4.5. Gráfica de $1 - 2/3X - (1 - X)^{2/3}$ en función del tiempo para datos de la biolixiviación del mineral de La Resbalosa, utilizando un cultivo LMi (ver Figura 4.2)

En la Figura 4.5 se muestra el ajuste lineal para los test de biolixiviación llevados a cabo con la muestra LMi. El ajuste lineal se realizó sin considerar los valores que corresponden a la etapa de colonización del sulfuro (descrito por Lizama y col., 2003). El período de colonización del sulfuro sólo es observado si la población inicial de microorganismos es baja al momento de la inoculación. Por lo tanto, si el período de colonización es visible, no se puede usar en ese rango de tiempo el modelo propuesto porque la ecuación 5 no representa esa situación. Finalizada la colonización de la superficie, se observa una segunda etapa con velocidad estacionaria correspondiente al

estado descripto por el modelo difusional propuesto. Los valores de los coeficientes de correlación lineal (R^2) mostrados en la figura indican que las biolixiviaciones realizadas en medio 0K se ajustan al modelo de difusión planteado. Similares resultados fueron reportados para la biolixiviación de otros minerales de cinc (pero con microorganismos mesófilos) por varios autores (Fowler y Crundwell, 1999; Liao y Deng, 2004; da Silva, 2004a). Para ese mismo mineral, en procesos de biolixiviación con *L. ferrooxidans* a 30 °C y en reactor air lift, se obtuvo un valor de $R^2 = 0,886$; en ese caso no se observó etapa de colonización durante el período inicial de biolixiviación (Giaveno y col., 2007). Al analizar los valores de R^2 obtenidos de aplicar el modelo propuesto a los sistemas que usaron M88 (suplementado o no con azufre), se observa que el modelo no ajusta del mismo modo a esta condición experimental. Para avanzar en este estudio, las pendientes de las rectas de la Figura 4.5, fueron usadas para calcular los coeficientes de difusividad del hierro(III) a través de la capa de cenizas no reactivas (D). De este modo, se asume que el principal mecanismo de solubilización de cinc es el ataque oxidante del hierro(III). El coeficiente D ($m^2.s^{-1}$) se calcula de acuerdo a la ecuación (6) propuesta por da Silva (2004b).

$$D = Pendiente \frac{\rho_{ZnS} R^2}{12 [Fe^{3+}]} \quad (6)$$

Donde $[Fe^{3+}]$ es la concentración del catión en solución ($mol.m^{-3}$), ρ_{ZnS} es la densidad molar de la esfalerita dentro de la muestra ($mol.m^{-2}$) y R es el radio medio de las partículas (m). En la Tabla 3 se comparan los coeficientes D calculados para todos los tratamientos realizados a 70 °C respecto de los obtenidos a 30 °C para el mismo mineral. Los valores obtenidos son todos del mismo orden; no obstante, en general las barreras difusionales van disminuyendo según la temperatura aumenta y, además, la barrera será menos importante cuando la capa de azufre sea removida por la actividad microbiana.

El ensayo de biolixiviación usando M88 obtuvo el mayor coeficiente de difusión. Esto indicaría que en esas condiciones no existieron problemas difusionales (razón por la cual el modelo no ajustó demasiado) y coincidiría con la ausencia de azufre en los residuos de rayos X. Una actividad microbiana intensa en estas condiciones,

podría haber consumido buena parte de esta capa no reactiva de azufre, evitando ser una barrera para la continuidad de la disolución del sulfuro.

Tabla 4.3. Comparación de los coeficientes (D) obtenidos para los ensayos de biolixiviación del mineral de La Resbalosa

Ensayo	T (°C)	[Fe ³⁺] (mol.m ⁻³)	ρ_{SZn} (mol.m ⁻²)	Pendiente (dia ⁻¹)	D (m ² .s ⁻¹)x10 ⁻¹⁵
M88	70	14,11	5840	0,0108	6,020
M0K	70	3,41	5840	0,00155	3,570
M88+S	70	18,66	5840	0,00874	3,689
M0K+S	70	5,68	5840	0,000402	0,557
LR airlift	30	10,3	5840	0,00138	1,040

En este capítulo se ha mostrado la capacidad biolixivante de los consorcios termófilos aislados en Copahue sobre un mineral de cinc. La solubilización fue máxima cuando se utilizó medio M88 a 70 °C y superior a la reportada con cultivos mesófilos en frascos y en air-lift sobre el mismo mineral. Precisamente, salvo para dicho medio, la biolixiviación fue limitada por problemas difusionales a través de una capa no reactiva de azufre y probablemente de jarosita que en medio M88 fue menos importante.

CAPITULO 5

BIOOXIDACIÓN DE UN MINERAL DE ORO

Capacidad biooxidante
de consorcios termófilos

El norte de la provincia de Neuquén (Argentina) cuenta con extensos yacimientos auríferos en áreas muy próximas a la región geotermal del volcán Copahue. El distrito minero Andacollo, emplazado en la cordillera del Viento y el río Neuquén, es de interés económico por la explotación de sus vetas auríferas y también de interés histórico, debido a la actividad minera desarrollada por grupos de etnia mapuche a principios del siglo XIX. En la primera mitad del siglo XX, la actividad estuvo caracterizada por labores de tipo artesanal llevada a cabo por pirquineros y lavadores de oro que llegaron de diferentes lugares del país. A partir de 1950, la actividad fue organizada por la Dirección Provincial de Minería y otros entes del Gobierno de la provincia de Neuquén, en función de explorar y cuantificar las reservas. Años más tarde, se entregaron los yacimientos en concesión a diferentes empresas que, con capitales públicos o privados, intensificaron la exploración. En el año 1998, la empresa del estado CORMINE SEP y la empresa chileno-canadiense Minera Andacollo Gold (MAG SA) sellaron el acuerdo para explotar un área de 22000 has; este acuerdo se encuentra vigente a la fecha y motoriza la economía de la región con la extracción, concentración y venta de oro y, en algunos casos, de plata. La región minera de Andacollo cuenta con reservas en otras áreas que podrían ser utilizadas en el futuro. La información hasta el momento indica: mineral probado (minas Erika, Sofía y Julia; 275.400 tns con una ley promedio de 11,25 g.t⁻¹ de oro), mineral probable (minas Erika, Sofía, Julia, Buena Vista; 196.300 tns con una ley promedio de 11,20 g.t⁻¹ de oro) y recursos inferidos (minas Erika, Sofía, Julia, Buena Vista, Rosario, La Colorada, Carlita, Peludo y Juanita; 417.900 tns con una ley 11,04 g.t⁻¹ de oro); esta información proviene de la hoja geológica 3772-IV de Andacollo (Rovere, 2004). En la Figura 5.1 se observa una vista aérea de una de las áreas en explotación.

Figura 5.1. Vista aérea de la planta de concentración de oro de la empresa Minera Andacollo Gold SA en las proximidades a la mina Bella Vista localidad de Andacollo

La producción de la planta se basa en el procesamiento de 350 t.día^{-1} . Los productos que se obtienen y se venden son (Coutsiers, 2010):

A) Arenas de alta ley: con un 0,3 % de humedad y con una ley de 1000-3000 g.t^{-1} de Au y de 5000-14000 g.t^{-1} de Ag.

B) Concentrado de flotación: con un 10 a 11 % de humedad y con una ley de 50-100 g.t^{-1} de oro y 4.000-10.000 g.t^{-1} de plata.

Estos minerales concentrados en la planta de tratamiento de Andacollo se definen como refractarios (Bhappu, 1990; Marsden y House, 2006), ya que las partículas de oro se encuentran diseminadas en una matriz con contenidos variables de pirita y arsenopirita dependiendo del yacimiento de procedencia. Adicionalmente, se destacan por su carácter polimetálico al presentar diferentes sulfuros asociados conformando la muestra.

En este capítulo se describen los estudios de biooxidación realizados con minerales concentrados de oro provenientes de la planta de tratamiento de Andacollo, provincia de Neuquén, utilizando los consorcios enriquecidos a partir de aguas y barros de Copahue. En primer lugar, se presentan ensayos de biooxidación realizados a 75 °C utilizando los consorcios B9 y LMi. El objetivo primordial de estos estudios fue analizar la potencialidad de estos consorcios para el pretratamiento de los minerales en función de obtener la máxima recuperación de oro en la etapa final de cianuración; por esa razón, se utilizó la temperatura óptima para estos consorcios. En segundo lugar, se realizaron ensayos adicionales de biooxidación a 30 °C. El objetivo principal fue evaluar la flexibilidad de los consorcios microbianos aislados para desarrollarse a temperaturas muy lejos de las correspondientes al aislamiento y de las óptimas. Además, permitió comparar la eficiencia de estos consorcios con microorganismos mesófilos y sin la ventaja adicional que provoca la operación a mayor temperatura.

5.1. Ensayos de biooxidación a 75 °C utilizando consorcios termófilos

Para realizar el conjunto de ensayos a 75 °C se empleó una muestra del mineral de oro refractario, concentrado por flotación y molido a tamaño de partícula menor a 74 µm. La muestra de mineral provenía de la planta de tratamiento Andacollo y, específicamente, de las minas Erika y Sofía. La misma fue caracterizada mediante análisis químico por fluorescencia de rayos X y por análisis mineralógico utilizando microscopía óptica sobre cortes delgados y difracción de rayos X.

Las composiciones químicas y mineralógicas de la muestra utilizada se muestran en la Tabla 5.1. Los metales de mayor relevancia desde el punto de vista económico, el oro y la plata, están acompañados por otros como hierro, plomo, cinc y cobre que están esencialmente como sulfuros en este mineral polimetálico. El contenido de arsénico es suficientemente alto como para poder tener efecto inhibitorio sobre los microorganismos.

Tabla 5.1. Caracterización del mineral proveniente de Andacollo utilizado en los ensayos de biooxidación con consorcios termófilos

Composición Química							
Tamaño de partícula	g.t ¹		%				mg.Kg ⁻¹
	Au	Ag	Pb	Cu	Zn	Fe	As
	< 74 μm	160	288	2,8	0,3	1,2	24,1
Composición Mineralógica							
cuarzo (SiO ₂), feldespato (KAlSi ₃ O ₈), pirita (FeS ₂), arsenopirita (FeAsS), esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS ₂), trazas de galena (PbS)							

Se realizó la estimación semi-cuantitativa del contenido de minerales presentes en la muestra mediante la observación al microscopio óptico de cortes delgados de roca y la aplicación de métodos estadísticos convencionales. La Figura 6.2 A muestra uno de los cortes delgados realizados y la composición porcentual que se calculó sobre el mismo. Los resultados están representados por los números 1 a 4 en la figura indicando: 1) pirita intercrecida con arsenopirita (65 %), 2) escasa esfalerita con inclusiones muy finas de calcopirita (5 %), 3) ganga formada preferentemente por carbonatos, cuarzo euhedral y escasa clorita (30 %) y, 4) trazas de galena.

En las micrografías ópticas de las Figuras 6.2 B y C, se observa un grano de oro y algunos cristales de sulfuros metálicos como pirita, esfalerita, galena y calcopirita. Las presencias de pirita y de arsenopirita en el mineral, detectadas por los análisis de difracción de rayos X realizados, indican que gran parte del oro se presenta ocluido en la matriz y este hecho se convierte en un escollo para la explotación comercial de estos minerales por procesos tradicionales.

Figura 5.2. A) Corte delgado y pulido de una roca de la mina Sofía; B y C) Microscopia óptica del mineral concentrado. Foto B: grano de oro diseminado en pirita (la partícula de oro mide 2,52 micrones). Foto C: pirita con esfalerita y motas de calcopirita

Los ensayos de biooxidación se realizaron con consorcios B9 y LMi (ver Figura 5.3.), enriquecidos en medios de cultivo 0K+S y M88+S.

Los tests de biooxidación se realizaron en frascos agitados (150 rpm) y termostatizados (75 °C), con una densidad de pulpa de mineral de 1 %. Los medios de cultivo M88 y 0K fueron eventualmente suplementados con azufre elemental en polvo (10,0 g/L). Se realizaron controles estériles agregando el mismo volumen de agua estéril en reemplazo del inóculo correspondiente. El pH inicial fue 2,0 para todos los sistemas y no fue ajustado durante el ensayo. Se determinaron las concentraciones de los metales (cobre, hierro y cinc) en solución mediante espectrofotometría de absorción atómica (Anexo II).

Figura 5.3. A y B) Micrografías electrónicas de barrido de cultivos LMi en medio 0K y M88 respectivamente. (Barras: 5 µm para A y 2 µm para B)

Figura 5.4. Evolución del pH y de la población microbiana en suspensión en los diferentes sistemas

La Figura 5.4 muestra la evolución del pH y la población microbiana en suspensión en cada uno de los sistemas. En los controles se produce un rápido ascenso del pH, probablemente debido a la reacción de especies básicas presentes en el mineral. En los sistemas inoculados, el pH tiende a descender (en particular, si se suplementó con azufre) seguramente por la actividad de los microorganismos azufre-oxidantes del consorcio.

Como se ha comprobado en experiencias previas, el desarrollo de la población microbiana fue significativamente mayor cuando se utilizó medio M88 (seguramente por desarrollo heterotrófico). Cuando no hay agregado de extracto de levadura o de azufre, el desarrollo microbiano en suspensión es menor. Independientemente de ello, parte de la población se encuentra adherida y se desarrolla sobre la superficie del mineral (ver Figura 5.5). En la imagen B de la misma figura se muestra una micrografía de transmisión electrónica de una célula del mismo cultivo. La flecha destaca la membrana típica de las células de arqueas que se hace visible en el corte ultradelgado observado al microscopio electrónico (Grogan, 1996).

Figura 5.5. Células de B9: A) desarrolladas en medio 0K y adheridas sobre cristales de mineral posiblemente pirita (aumento=27000X). B) Micrografía (TEM) donde se puede apreciar la estructura de la pared celular (flecha) y la morfología lobular típica de arqueas

La cantidad de hierro solubilizado, asociado a la disolución de la pirita que es el mineral en el que está principalmente ocluido el oro, es un parámetro que nos permite

seguir la evolución del ensayo de biooxidación. La Figura 5.6 muestra la evolución del hierro en solución durante el ensayo.

Figura 5.6. Solubilización de hierro en los ensayos de biooxidación del mineral de Andacollo utilizando los consorcios termófilos B9 y LMi

Los controles estériles no presentan cantidades apreciables de hierro en solución; este resultado está fundamentalmente asociado al incremento de pH registrado en esos sistemas que favorece la precipitación de compuestos de hierro y a la ausencia de microorganismos oxidantes del hierro que podrían generar el hierro(III) necesario como oxidante para la disolución de la pirita. Las mayores extracciones de hierro se alcanzaron en los sistemas inoculados con el consorcio B9 sin aporte de fuente orgánica, es decir, utilizando medio 0K con o sin azufre. Probablemente esto está asociado a que la solubilización de pirita es favorecida por el mantenimiento de altas concentraciones de catión férrico en solución. Cuando se utilizó el consorcio LMi, los valores de hierro en solución para los sistemas sin aporte de extracto de levadura, fueron

mayores al resto aunque no tan altos como los sistemas equivalentes con el consorcio B9.

Figura 5.7. Solubilización de cinc y cobre en los ensayos de biooxidación del mineral de Andacollo utilizando los consorcios termófilos B9 y LMi

Para ambos consorcios, puede verse que hay una falta de correlación entre la población planctónica desarrollada y la cantidad de hierro solubilizado. En definitiva, la fuente orgánica de energía presente cuando se usó M88, favoreció el crecimiento de la

población heterotrófica aunque esto no significó un incremento en la solubilización de hierro. De todos modos, en todos los cultivos se alcanzó una significativa solubilización de hierro; usualmente se considera que la remoción de 40-50 % del contenido en sulfuros, suele ser suficiente para recuperar más del 90 % del oro presente en el mineral (Gentina y Acevedo, 2005).

La Figura 5.7 muestra las concentraciones de cinc y cobre en solución durante el ensayo. La extracción de cinc y de cobre fue mayor en los sistemas sin azufre y sin extracto de levadura indicando que el desarrollo microbiano sobre el mineral es suficiente para soportar su lixiviación. El agregado de otras fuentes de energía favorece el desarrollo microbiano pero no la lixiviación de los sulfuros.

La solubilización de hierro alcanzada en este trabajo, fue comparada con los resultados obtenidos en ensayos previos de biooxidación de este mineral utilizando como inóculo cultivos puros y mixtos de microorganismos mesófilos y oxidantes del hierro y/o azufre (Chiacchiarini y col., 2001; Chiacchiarini y col., 2003). Los estudios realizados con *A. ferrooxidans* (*Af*) y *A. thiooxidans* (*At*), tanto en frascos agitados como en un reactor de tipo airlift (ALR), fueron en condiciones de agitación, temperatura y pH equivalentes a las correspondientes a estos ensayos; el medio fue OK sin suplemento de azufre. La Figura 5.8 compara los resultados de hierro solubilizado después de 40 días de ensayo. Es evidente en este gráfico, que los cultivos termófilos son mucho más eficientes que los mesófilos.

Figura 5.8. Comparación de los porcentajes de hierro solubilizado en los ensayos de biooxidación usando los consorcios termófilos B9 y LMi, respecto de los valores alcanzados en otros ensayos reportados (Chiacchiarini y col., 2001 y 2003) usando cultivos con microorganismos mesófilos

La posible toxicidad que pueden encontrar los consorcios microbianos cuando se exponen a ambientes para los cuales no han sido convenientemente adaptados, podría ser parcial o totalmente inhibitorio. Se ha reportado que, usualmente, las cepas mesófilas y termófilas moderadas presentan mayor resistencia que las termófilas, en particular a ciertas especies inhibitorias como el arsénico (Hallberg y col., 1996). Este efecto, no obstante, no fue observado en los ensayos realizados dentro de este Trabajo de Tesis. Por esa razón, estos microorganismos podrían resultar interesantes para un desarrollo del proceso de biooxidación a mayor escala. Para ello, deberían superarse todavía algunos problemas tecnológicos asociados con el trabajo a temperaturas del orden de la óptima para estos consorcios (tales como el material de los tanques que debe ser capaz de resistir medios ácidos y oxidantes a altas temperaturas, la baja solubilidad del oxígeno, etc.); no obstante, ya existen experiencias piloto con tanques construidos con material cerámico que podrían evitar al menos el primero de los problemas y también propuestas de cambio estratégico para intentar usar reactores tipo pilas (con

mucho mayor control que el que se ejerce usualmente en esta metodología de lixiviación) que permitan operar a temperaturas tan elevadas como las necesarias para estos consorcios.

5.2. Ensayos de biooxidación a 30 °C utilizando consorcios termófilos

En función del segundo objetivo planteado, se realizaron estudios de biooxidación con los consorcios termófilos pero a 30 °C.

Para realizar estas experiencias se utilizó mineral concentrado en la planta de tratamiento de Andacollo proveniente de la mina Buena Vista. Este yacimiento está actualmente en explotación por parte de la empresa Minera Andacollo Gold SA; precisamente esta fue la razón para esa elección ya que de este modo es mucho más cercana la posibilidad de transferir la metodología de pretratamiento microbiano a otra escala. En cualquier caso, el mineral utilizado en estos ensayos de biooxidación a 30 °C, conserva su carácter de refractario y polimetálico: se identificaron por análisis de difracción de rayos X las mismas especies minerales (excepto arsenopirita) que en las muestras usadas en los ensayos descritos más arriba y realizados a 75 °C. Las composiciones, química y mineralógica, determinadas mediante fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDXRF) y por difracción de rayos X respectivamente, se detallan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Caracterización del mineral proveniente mina Buena Vista concentrado en la planta de tratamiento de Minera Andacollo Gold SA

Composición Química							
Tamaño de partícula	g.t ⁻¹		%				
	Au	Ag	Pb	Cu	Zn	Fe	S
< 74 µm	71	200	1,2	0,3	3,1	15,2	19,2
Composición Mineralógica							
cuarzo (SiO ₂), feldespato (KAlSi ₃ O ₈), pirita (FeS ₂),							
esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS ₂), trazas de galena (PbS)							

Se efectuó la caracterización morfológica del mineral mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las características morfológicas del mineral utilizado en los ensayos de biooxidación, se muestran en la Figura 5.9. Se puede apreciar un cristal cúbico de pirita con las dimensiones registradas en la imagen SEM. Acompañan a la pirita, otras fracciones de sólido de menor tamaño de partícula que son producto de la molienda realizada como paso previo a la concentración.

Figura 5.9. Micrografía (SEM) del mineral antes de ser sometido al tratamiento de biooxidación. Cristal masivo de pirita (41,04 µm x 32,78 µm) en el seno del mineral concentrado de la mina Buena Vista, Andacollo (barra = 20µm)

Para los ensayos de biooxidación se utilizaron como inóculo los consorcios enriquecidos en medio 874 provenientes de los sitios de muestreo denominados LMa3-70, LMa3-75 y LMa3-80. Como se indicó previamente, estos consorcios corresponden a diferentes pozos termales en la misma zona pero con diferente temperatura; en ellos se identificaron microorganismos pertenecientes a los géneros *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y *Acidithiobacillus* entre las eubacterias y al género *Ferroplasma*, entre las arqueas. La composición de estos cultivos resultó ser similar a aquella usualmente reportada para consorcios que colonizan ambientes ricos en hierro (Rawlings y col., 2003; Rawlings, 2005).

Los ensayos de biooxidación se realizaron utilizando medio 2K, con pH inicial igual a 1,8 y con adición de extracto de levadura (0,2 %). Para comparar la capacidad oxidativa de los microorganismos nativos del sitio LMa3 con otras cepas oxidantes del hierro, se efectuaron ensayos adicionales inoculados con cultivos mesófilos de colección.

Los microorganismos puros utilizados fueron *A. ferrooxidans* DSM 11477 y *L. ferrooxidans* ATCC 29047, ambos crecidos en medio 9K a pH 1,8.

Los tests de biooxidación fueron realizados en frascos agitados a 150 rpm, a 30 °C y con 3,0 % de densidad de pulpa en el mineral. Cada frasco fue inoculado con 5 % del inóculo correspondiente a los cultivos *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, LMa3-70, LMa3-75 y LMa3-80. En el control estéril, el inóculo fue reemplazado por cantidad equivalente de agua estéril. Durante el ensayo se cuantificaron las variaciones en la población celular, los valores de pH y Eh y las concentraciones de los metales hierro, cobre y cinc en solución, según se describen en anexo correspondiente métodos analíticos.

El mineral sin tratar y los residuos de los procesos de biooxidación fueron analizados mediante microscopía de barrido electrónico (SEM), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopia de absorción en infrarrojo (IR). Se realizó la lixiviación por cianuración del material concentrado antes y después del proceso de biooxidación, para cuantificar la recuperación de oro. El proceso de cianuración se realizó durante 48 h con una solución de cianuro de sodio (2 g.L^{-1}) y se usó hidróxido de calcio para ajustar el pH del sistema hasta un valor de 11,5 (Salina y col., 2004; Nava-Alonso y col., 2007).

La Figura 5.10 (A y B) muestra los valores de pH y Eh registrados a lo largo de la experiencia. El valor de pH fue inferior a 2,0 durante todo el ensayo para los sistemas inoculados indicando que hubo una significativa actividad microbiana en esos sistemas. En los frascos estériles, el pH fue inestable en la fase inicial para luego mantenerse en forma estacionaria en un valor cercano a 2.

Figura 5.10. Cambios en los valores de pH y Eh durante el ensayo de biooxidación

El valor del Eh (Figura 5.10B) mostró un ascenso significativo especialmente para los tres consorcios de LMa3 y para el cultivo puro de *L. ferrooxidans*. Los consorcios con cepas nativas alcanzaron valores de Eh (650-700 mV) que son elevados y dan cuenta de una fuerte actividad hierro oxidante; esta actividad seguramente está vinculada con la presencia de *Leptospirillum* y de *Ferroplasma* en el consorcio (Rawlings y col, 1999; Golyshina y Timmis, 2005). Precisamente, los valores de Eh obtenidos para el consorcios LMa3 son similares a los alcanzados por *L. ferrooxidans* pero significativamente superiores a los valores obtenidos para los cultivos puros de *A. ferrooxidans* (430-450 mV) en las mismas condiciones experimentales. La concentración celular registrada para los consorcios de Copahue fue del orden de $3,7 \times 10^8$ células.mL⁻¹ mientras que para el resto de los cultivos se mantuvo próxima al valor de 1×10^8 células.mL⁻¹.

Considerando la composición del concentrado de oro de Andacollo, la evolución de hierro, pero también de cinc y de cobre en solución, deberían ser

parámetros adecuados para seguir la cinética de biooxidación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.11.

Figura 5.11. Evolución del hierro(II) durante los ensayos de biooxidación y cinéticas de disolución de cobre, cinc e hierro en frascos inoculados y controles estériles

La capacidad para oxidar hierro(II) por los consorcios de Copahue puede comprobarse en la Figura 5.11 A; se observan diferencias significativas en este comportamiento respecto de los cultivos puros y, más aun, sobre los controles estériles. Por otra parte en la Figura 5.11 B se muestra la solubilización de hierro(III). Se puede ver que los cultivos LMa3-70 y LMa3-75 alcanzaron los mayores porcentajes de solubilización de hierro (100 %) mientras que LMa3-80 registró un 70 % de disolución del metal. Los valores de hierro(III) en solución para los consorcios nativos fueron superiores a los registrados por los cultivos puros (47,8 % para *L.f.* y 28,5 % para *A.f.*). Los controles estériles sólo registraron el 8,8 % de hierro oxidado y disuelto (Figura 5.11 B).

Tal cual muestra la Figura 5.11 C, los porcentajes de cinc solubilizado fueron prácticamente el 100 % para *A.f.* y *L.f.*, aproximadamente 75 % para los consorcios y

41 % para los sistemas estériles. La disolución de cobre (Figura 5.11 C) fue máxima para el sistema inoculado con *A.f.* (94,5%), seguido por LMa3-75 y *L.f.* (aproximadamente 86 %), posteriormente, LMa3-70, LMa3-80 y el control estéril (81,9 %, 50,1 % y 25,2 % respectivamente). Las diferencias en la eficiencia de la solubilización de hierro por los consorcios de Copahue respecto de las encontradas para cinc y para cobre, no han podido ser explicadas hasta el momento.

Se analizaron los residuos sólidos obtenidos al final del ensayo mediante espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (IR). Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 5.12.

El análisis IR mostró que jarosita fue la fase predominante en los residuos. Esto quedó demostrado por la presencia predominante de las bandas ν_3 , correspondientes a las vibraciones anti-simétricas de estiramiento con señales triple degeneradas, identificadas por los picos en los difractogramas para 1190 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} y 1004 cm^{-1} , y también por las vibraciones de deformación ν_4 a 628 cm^{-1} . Por otra parte, se observaron diferencias en las posiciones de algunos picos que podrían ser atribuidos a las variaciones en concentración de los iones monovalentes (sodio, potasio, amonio o hidronio) presentes en la solución; los mismos posibilitan la formación de diferentes tipos de jarosita. También se observaron las bandas típicas de cuarzo (798 cm^{-1} , 778 cm^{-1} y 694 cm^{-1}), de clorita correspondiente a la deformación por estiramiento (3551 cm^{-1}), hematita (660 cm^{-1}) y siderita (740 cm^{-1}) (Bishop y Murad, 2005; Márquez y col., 2006).

Figura 5.12. Espectro infrarrojo para los residuos sólidos provenientes de los ensayos de biooxidación levadas a cabo sobre las muestras de mineral concentrado de la planta de tratamiento de Andacollo

Los residuos provenientes de las biooxidaciones e incluso de los controles estériles, fueron sometidos a cianuración para analizar la recuperación del oro. De los residuos de los controles estériles sólo se lixivió el 45,3 % del oro, mientras que para los residuos de biooxidación con los consorcios LMa3-70 y LMa3-75 se recuperó hasta un 93 % del oro (Tabla 5.3). El consumo total de cianuro fue mayor en los tratamientos biológicos que en el control estéril; no obstante, el cálculo de oro producido por kg de cianuro invertido, fue mayor para los sistemas inoculados con consorcios nativos respecto de los estériles (3,5 y 2,2 respectivamente).

Tabla 5.3. Recuperación de metales y consumos de cianuro para los diferentes ensayos biooxidación

	<i>A.f.</i>	<i>L.f.</i>	LMa3-70	LMa3-75	LMa3-80	Estéril
% Fe solubilizado	28,5	47,8	100,0	100,0	73,3	8,8
% Au extraído	55,0	63,0	96,3	96,3	80,3	45,3
Au (g.t⁻¹) extraído	39,1	44,8	68,5	68,5	57,1	32,2
NaCN (kg.t⁻¹)	14,2	14,7	19,5	19,5	15,4	14,0
Au (g)/NaCN (kg)	2,6	2,9	3,5	3,5	3,5	2,2

Estos resultados confirman que es posible usar los consorcios provenientes de ambientes geotermales del volcán Copahue para procesos de biooxidación, aún cuando se realicen a temperaturas mucho menores que los hábitats de los cuales fueron aislados. Más aún, en esas condiciones mostraron ser incluso más eficientes que las especies mesófilas cuya potencialidad en los procesos de biooxidación está ampliamente demostrada.

CAPÍTULO 6

BIODISOLUCIÓN DE UN MINERAL DE HIERRO

Participación en el drenaje ácido

De todos los contaminantes de los cursos de agua, quizás son los drenajes ácidos de minas (DAM) y drenajes ácidos de rocas (DAR) los más graves por su naturaleza, extensión y dificultad de resolución. Los ríos y acuíferos afectados por este tipo de contaminación se caracterizan por su acidez, por el alto contenido en sulfatos y metales pesados de sus aguas y por el contenido metálico de sus sedimentos (Johnson y Hallberg, 2005; Hallberg, 2010).

En general, este tipo de contaminación se origina cuando los sulfuros metálicos se contactan con oxígeno y humedad, ya sea como parte de procesos antropogénicos o geoquímicos naturales. De este modo los sulfuros insolubles son transformados a sulfatos mediante una serie compleja de reacciones que tienen lugar en la superficie de las rocas con la consecuente producción de ácido. Si bien la cinética de oxidación de los sulfuros es lenta, es factible que en la naturaleza se conjuguen diferentes variables que pueden acelerar los procesos hasta niveles alarmantes (Edwards y col., 2000). Entre los factores más importantes que catalizan la oxidación e incrementan la velocidad de disolución de los sulfuros, se pueden mencionar la temperatura y la presencia de microorganismos acidófilos.

Estudiar la incidencia en la producción de DAM y DAR asociadas a las dos variables mencionadas, implica indirectamente estudiar la acción de consorcios termófilos sobre los sulfuros e interpretar los resultados en función de parámetros ambientales. La mayor parte del conocimiento generado hasta la fecha ha sido desarrollado principalmente en torno a los sulfuros de hierro más abundantes (pirita, pirrotita, marcasita) utilizando casi exclusivamente a las bacterias como los microorganismos catalizadores (Shokes y Moller, 1999; Sracek y col., 2004; Johnson, 2006; Akcil y Koldas, 2006; Hallberg, 2010). Por lo tanto, extender las investigaciones a sulfuros no convencionales y someterlos a la acción de arqueas es un área de la microbiología que requiere ser explorada.

En este capítulo, se estudió la disolución del mineral natural troilita (FeS) mediada por consorcios termófilos provenientes de B9 y LMi.

Antes de realizar los ensayos de disolución, se procedió a la caracterización química y mineralógica de la troilita. Para ello, el mineral fue molido hasta tamaño de partícula menor que $74\ \mu\text{m}$ y secado al aire. La composición química fue obtenida por espectrofotometría de fluorescencia de rayos X (FRX) en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo EDX-800HS. La composición mineralógica fue evaluada mediante difracción de rayos X, en un difractómetro marca Rigaku modelo DII-Max $\text{CuK}\alpha$ con filtros de níquel. Los diagramas fueron obtenidos con rotación del goniómetro en el rango de 10° a $70^\circ\ 2\theta$ por pasos de $0,05^\circ\cdot\text{s}^{-1}$. La caracterización morfológica fue llevada a cabo mediante microscopía electrónica de barrido en un equipo LEO EVO 40 XVP con detector de electrones secundarios marca England; se realizó análisis EDAX para determinar la composición química puntual.

A partir de los ensayos de fluorescencia de rayos X, se determinó la composición química del mineral que se muestra en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Composición porcentual del mineral troilita usado en los ensayos de biodisolución a $65\ ^\circ\text{C}$

Fe_2O_3	SO_3	CuO	ZnO
51,3 %	48,2 %	0,25 %	0,12 %
MnO	Cr_2O_3	Mn_2O_3	NiO
0,10 %	0,05 %	0,04 %	0,04 %

Los porcentajes de hierro y azufre presentes en la muestra permitieron calcular una relación Fe/S igual a 1,067. Este valor es muy cercano al cociente esperado para el monosulfuro.

Por otra parte, y a partir de los difractogramas de rayos X, se pudo constatar que la troilita fue el mineral más abundante en la muestra. La Figura 6.1A muestra algunas impurezas de marcasita, un disulfuro polimorfo de la pirita (FeS_2).

Las micrografías electrónicas de barrido del mineral original, mostraron las características morfológicas del mismo: se observaron cristales de caras planas típicas del hábito cúbico de la troilita y pequeños agregados de material producto de la molienda previa del material (Figura 6.1B).

Figura 6.1. A) Diagrama de difracción de rayos X de la troilita (T) con impurezas de marcasita (M) y B) Micrografía (SEM) del mineral

El mineral molido fue esterilizado en autoclave a 121 °C de temperatura. Para disminuir la oxidación del sulfuro durante el proceso de esterilización, el mineral fue mantenido en un contenedor hermético. Los ensayos de disolución de troilita fueron realizados en frascos agitados. El mineral fue adicionado a cada sistema en una concentración final de 4 % m/v. Los inóculos se prepararon a partir de los consorcios B9 y LMi.

Las experiencias de biodisolución fueron realizadas en diferentes medios con pH inicial igual a 2,0 (ver Tabla 6.2). La incubación se realizó a 65 °C, manteniendo agitación continua (150 rpm) por aproximadamente 70 días. La temperatura del ensayo fue seleccionada en función de aquella a la que habían sido enriquecidos los consorcios. Durante el ensayo se siguieron los valores de pH y Eh del sistema por medidas con electrodos específicos. También se midió la concentración de hierro total en solución a través de espectrofotometría de absorción atómica. Los controles estériles consistieron en sistemas similares donde el inóculo fue reemplazado por igual volumen de agua acidulada estéril. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se cuantificó la dispersión por métodos estadísticos de rutina.

Tabla 6.2. Descripción de los medios de cultivo e inóculos utilizados durante el ensayo de disolución de la troilita

Denominación	B9+S	B9+Sac	LM+S
Procedencia	Baño 9	Baño 9	Las Maquinitas
Medio de cultivo	M88+S	M88+Sac	M88+S
Bacterias.ml ⁻¹	2,5x10 ⁸	3,5x10 ⁸	1,9x10 ⁸

Figura 6.2. Cinética de solubilización de hierro a partir de troilita, utilizando los consorcios termófilos B9 y LMi, con diferentes medios de cultivo (pH inicial igual a 2,0) a 65 °C

Durante los ensayos, se observó un lento incremento en la concentración de hierro en solución durante la etapa inicial; luego de 10 días, se logró una significativa disolución en aquellos cultivos que contienen azufre y, en especial, en los inoculados con el consorcio B9 (Figura 6.2).

La presencia de hierro(II) en solución durante la etapa inicial se debe seguramente a la disolución abiótica de la troilita producida por las condiciones de acidez del medio de cultivo y está representada por la ecuación 1. Este proceso ocurrió en mayor medida en los sistemas inoculados, debido a la capacidad de estos consorcios microbianos de producir ácido sulfúrico (ecuación 2).

El consorcio procedente de B9, y en M88+Sac, se diferenció del control estéril recién una semana más tarde que el resto de los cultivos; esto podría ser debido a que, durante la etapa inicial, el consorcio se desarrolló preferentemente a expensas de la fuente orgánica y posteriormente comenzó a oxidar el azufre formado como producto de la oxidación química de la troilita (ecuación 3)

Después de 70 días de ensayo, los porcentajes de solubilización de hierro fueron de $60 \pm 12 \%$, $48 \pm 9 \%$, $32 \pm 7 \%$, y $15 \pm 2 \%$ para B9+S, LMi+S, B9+Sac y el control estéril, respectivamente. La solubilización fue mayor en todos los cultivos respecto del control estéril; estos cálculos se realizaron con el hierro finalmente presente en solución. Debe tenerse presente que parte del hierro disuelto por acción sobre la troilita, no se mantuvo en solución sino que precipitó parcialmente. Los procesos de precipitación no dependen sólo de la concentración de hierro total soluble, sino también del pH de la solución; es por eso que no puede obtenerse una relación directa entre el hierro disuelto y el solubilizado. Para analizar en forma más exhaustiva la extensión de la disolución, se tomó el pico de difracción más intenso del patrón de difracción de la troilita (2,05Å) y se

lo normalizó respecto del mismo pico pero en la troilita sin tratar. De esta forma se calculó la disolución obteniéndose los siguientes valores: 90,5 %, 85,7 %, 81,0 % y 52,4 % para B9+S, LM+S, B9+Sac y control abiótico, respectivamente. Aunque la tendencia es la misma que la mostrada por los porcentajes de hierro solubilizado, estos valores son mayores que los primeros ya que incluyen el hierro precipitado. Por otro lado, esta precipitación de compuestos de hierro, pudo cubrir la superficie evitando la continuidad de la disolución. Probablemente la amplia dispersión que mostraron los resultados de solubilización de hierro (ver Figura 6.2) esté también vinculada a la precipitación. Las mayores solubilizaciones se obtuvieron para los sistemas con azufre suplementado y, de ellos, el consorcio B9 fue más eficiente (precisamente porque alcanzó menores valores de pH probablemente impidiendo mayor precipitación).

Figura 6.3. Evolución del pH y Eh durante los ensayos de biolixiviación de troilita

En la Figura 6.3, se muestra la evolución de los valores de Eh y pH durante la disolución. Inicialmente los valores de pH se incrementaron mientras que los valores de Eh disminuyeron. Este comportamiento es típico para la fase inicial de la disolución ácida de la troilita y de otros sulfuros y consistente con las ecuaciones 1 y 3 (Bhatti y col., 1993). Luego del incremento inicial, los valores de pH en los controles abióticos no se modificaron significativamente. En los sistemas inoculados, en cambio, se registró un

descenso de pH que seguramente se corresponde con la generación de ácido sulfúrico (ecuación 3); esto también ocurrió en los cultivos sin azufre suplementado y esto probablemente se debe a que el mismo fue generado 'in situ' tal cual lo indica la ecuación 2.

El valor de Eh se incrementó significativamente (alcanzando valores mayores a 600 mV) en aquellos cultivos inoculados con B9 y suplementados con azufre. En los otros sistemas y en el control abiótico, los valores de Eh se mantuvieron alrededor de los 300 mV. Estos resultados sugieren que consorcio proveniente de B9 se adaptó mejor a las condiciones impuestas por el ensayo, logrando mantener activos a los microorganismos oxidantes del hierro que lo componían y cuyas capacidades metabólicas ya fueron descritas en capítulos previos.

La oxidación de hierro(II) es mostrada en la ecuación 4 y está fuertemente catalizada por microorganismos hierro-oxidantes. La hidrólisis del catión férrico generado contribuye a la disminución del pH de sistema. Los procesos de hidrólisis (ecuaciones 5-7) pueden, por otra parte, generar una abundante cantidad de precipitados de hierro; entre ellos, se distinguen: goethita (FeOOH), jarosita ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) y schwermanita ($\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6\text{SO}_4$).

Los residuos sólidos obtenidos al final de la lixiviación, fueron caracterizados en el mismo equipo de difracción de rayos X que se utilizó para caracterizar la mineralogía de la troilita. Se aplicó una técnica analítica que permitió la disolución selectiva de los precipitados para estudiar los compuestos de hierro poco cristalizados formados durante los ensayos de lixiviación (Bhatti y col., 1993; Schulze, 1994). Se utilizaron dos soluciones, una de oxalato de amonio (OA) 0,2 M con pH igual a 3 y otra

de ácido clorhídrico 0,5 M, en función de solubilizar de modo diferencial a los precipitados formados durante el ensayo. Después de cada extracción, se registró un diagrama de difracción de rayos X del residuo sólido remanente. Se obtuvieron sendos diagramas diferenciales de difracción de rayos X (DRXD) para cada tratamiento por sustracción entre los patrones de difracción de la muestra tratada con oxalato de amonio o con ácido clorhídrico y los residuos sin tratar (detalles del protocolo utilizado se pueden ver en el Anexo XI).

La Figura 6.4 muestra los precipitados obtenidos al finalizar el ensayo de biolixiviación de troilita; los residuos exhiben una amplia gama de colores característicos de los óxidos de hierro y sulfuros remanentes en el sistema: ocre para la jarosita, rojo intenso para la hematita, amarillo para la goethita y anaranjado para la schwertmannita.

Figura 6.4. Precipitados de hierro obtenidos durante la disolución de troilita en el sistema inoculado con el consorcio B9 en M88+S

La caracterización de estos precipitados, llevada a cabo por las técnicas de difracción explicitadas anteriormente, se muestra en la Figura 6.5. Las especies mineralógicas encontradas fueron azufre (S), jarosita (J), hematita (H), goethita (G), troilita (T) y marcasita (M). Después de la solubilización selectiva con la solución de oxalato ácido de amonio, las especies detectadas fueron azufre, jarosita, goethita,

schwertmannita, y troilita. La aplicación de la técnica diferencial de difracción de rayos X permitió la identificación del mineral schewertmannita (que no se detectó en el difractograma total, seguramente por estar ocluido en el resto de los precipitados). La schwertmannita es un óxido pobremente cristalinizado y ha sido identificado como un producto típico de la oxidación bacteriana de la piritita y de otros sulfuros de hierro; suele encontrárselo en las zonas cercanas a las minas metalíferas y de carbón que tienen drenaje ácido (Bigham y col, 1994; Pogliani y Donati, 2000; Cornell y Schwertmann, 2003; Murad y Rojik, 2003; Caraballo y col., 2009).

Figura 6.5. Diagramas de difracción de rayos X de los residuos de la lixiviación de troilita usando consorcio B9 en M88+S: A) Tratamiento con oxalato de amonio (OA); B) Tratamiento con ácido clorhídrico. Ambas figuras incluyen los difractogramas de la muestra total sin tratamiento, la muestra tratada y el diagrama diferencial de difracción de rayos X (DRXD). Azufre (S), jarosita (J), hematita (H), goethita (G), troilita (T), schwertmannita (Sw), marcasita (M)

La Tabla 6.3 muestra las principales especies mineralógicas en todos los residuos sólidos.

Tabla 6.3. Minerales identificados en los residuos sólidos mediante técnicas de DRX y DRXD. Azufre (S), jarosita (J), hematita (H), goethita (G), marcasita (M), schwetmannita (Sw), troilita (T). DRX-Total: sin ningún tratamiento; DRX-OA y DRX-HCl: después de tratamiento con oxalato de amonio de pH 3 y ácido clorhídrico 5 M, respectivamente; DRXD: DRX diferencial

Ensayos	DRX-Total	DRX-OA pH=3	DRX -HCl 5 M	DRX D Total-AO	DRX D Total-HCl
Mineral natural*	T – M				
B9+S	S-J-T-M-G-H	S-J-T-G- Sw	S-J-T-M	M-H-Sw	G-H
B9+Sac	S-J-T-M-G-H	S-J-T-G-M- Sw	S-J-T-M	H-Sw	G-H
LM+S	S-J-T-M-G-H	S-J-T-G- Sw	S-J-T-M	M-H-Sw	G-H
Control estéril	S-J-T-M	S-J-T-M	S-J-T-M		

*mineral antes de ser tratado.

Los residuos sólidos de los controles abióticos fueron similares entre ellos para cada uno de los tratamientos aplicados y las mismas especies fueron detectadas en todos los difractogramas. También para todos los ensayos se encontró un remanente de troilita (a través de SEM combinada con EDAX) confirmando que parte de la misma no fue disuelta. En el análisis por EDAX se obtuvieron los siguientes porcentajes atómicos: 48,5 % para azufre y 51,5 % para hierro los cuales arrojaron un cociente Fe/S de 1,06 característico de la troilita. La micrografía electrónica de barrido de la misma fracción del residuo permitió comprobar cristales en forma de cubos con caras tabulares característicos del hábito cristalino de la troilita (Figura 6.6).

Figure 6.6. Espectro EDAX y micrografía electrónica de barrido (SEM) de los precipitados de troilita que forman parte de los residuos (barra = 10μm)

La hematita no fue detectada en los residuos de los controles abióticos en acuerdo con Murad y Rojik (2003). La precipitación de compuestos de hierro(II) está fuertemente condicionada por el valor del pH del medio. La jarosita precipita a pH menor a 3, la schwertmannita lo hace entre 2,5 y 5,5, la hematita a pH mayor a 2, la goethita entre 4,5 y 6,5 y la ferrhidrita precipita a pH a valores mayores a 6. Además, la schwertmannita y la ferrihidrita son metaestables y pueden ser transformados en goethita y hematita (Schwertmann y Murad, 1983; Kumpulainen y col., 2008). En los residuos provenientes de nuestros ensayos (Tabla 6.2), se detectaron especies que se correlacionan con los valores de pH alcanzados en diferentes momentos del proceso; la ferrhidrita no fue detectada en ninguno de los sistemas porque el pH nunca alcanzó valores tan altos.

Los resultados muestran que, al igual que otros sulfuros metálicos, la disolución de la troilita puede ser fuertemente catalizada por microorganismos que oxidan azufre y/o hierro (como los que están presentes en los dos consorcios provenientes de los sitios de muestreo del campo geotérmico Copahue), en contraste con la solubilización que puede presentar este sulfuro en ácidos abióticos (Thomas y col., 2003). La actividad microbiana parece responder principalmente a microorganismos azufre-oxidantes ya que buena parte del hierro en solución, excepto en uno de los cultivos, permaneció en su menor estado de oxidación. Aunque se verificó que la presencia de azufre incrementa la velocidad de disolución, su adición no es estrictamente necesaria para permitir el desarrollo de las comunidades microbianas y la disolución de la troilita, probablemente porque puede ser generado 'in situ' por oxidación química del sulfuro.

La Figura 6.7 muestra una serie de micrografías de transmisión electrónica obtenidas de los cultivos al final del ensayo de biolixiviación de la troilita.

Luego de 70 días de incubación todavía son detectables ambos tipos de microorganismos. Los bacilos parecen haber desarrollado una gruesa capa de exopolímeros (flechas fucsias) alrededor de la membrana celular; similares resultados han sido encontrados para microorganismos oxidantes de hierro como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* para los cuales, los exopolímeros son mediadores en la adherencia y en los procesos de biolixiviación-biooxidación y biocorrosión (Gehrke y col., 1998; Rojas-Chapana y Tributsch, 2004; Sand y Gehrke, 2006).

Figura 6.7. Células tipo bacilos y cocos irregulares o lobulares de arqueas después de 70 días de incubación a 65°C sobre troilita. B9 en M88+S (A-27000X, B 14000X, D 20000X); LMi en M88+S (C 20000X, E 8000X, F 20000X)

En la misma figura se puede apreciar que las arqueas, seguramente de la nueva especie de *Acidianus*, han acumulado algunos compuestos de hierro(III) al juzgar por las partículas que se observan en las proximidades de la membrana externa (flechas verdes) y también en el interior de las células. Además, se han podido apreciar extensiones de la membrana celular (señaladas por las flechas celestes) que no habían sido detectados en células planctónicas presentes en medios más ricos.

Un adicional e interesante resultado desprendido de estos estudios, es el hecho de que los consorcios naturales extraídos de distintos sitios de muestreo con amplias diferencias en su temperatura, han demostrado flexibilidad térmica y algunos de sus miembros (especialmente arqueas del orden Sulfolobales) han sido capaces de mantener su viabilidad y adaptarse a condiciones muy diferentes de la su hábitat original manteniendo sus potencialidades biolixivantes especialmente la de oxidar azufre.

La conclusión fundamental de este capítulo, es que los consorcios microbianos termófilos provocaron una fuerte disolución de la troilita; esto es significativo ya que la troilita suele estar presente en ambientes naturales en los cuales pueden proliferar aquellos consorcios. Durante esta disolución se observó un descenso importante del pH y un incremento en el Eh del lixiviado que constituyen esta disolución como un posible precursor de la formación de drenajes ácidos de minas.

CONCLUSIONES

Logros y publicaciones

CONCLUSIONES

Durante este Trabajo de Tesis Doctoral, se ha focalizado la búsqueda de consorcios extremos, en particular acidófilos y termófilos, dentro de la variada diversidad de sitios que pueden encontrarse en el Campo Geotérmico Copahue. Los enriquecimientos dirigidos a favorecer microorganismos hierro y azufre oxidantes, mostraron resultados positivos en diversos sitios. De ellos, los consorcios presentes en enriquecimientos a 65 °C mostraron su capacidad para desarrollarse en condiciones aeróbicas, tanto autotróficas como heterotróficas. También se demostró su crecimiento bajo condiciones anaeróbicas utilizando hierro(III) como último aceptor de electrones y azufre y/o hidrógeno como dadores de electrones.

Los ensayos de caracterización molecular permitieron comprobar que los consorcios provenientes de los sitios Baño 9, Las Máquinas y Las Maquinitas estaban constituidos mayoritariamente por arqueas del orden Sulfolobales y que gran parte de dicha población pertenecía al género *Acidianus*. A partir de los análisis de secuenciación de 16S del rRNA se comprobó una baja similitud con otras especies de *Acidianus* reportadas lo cual lo indica como una nueva especie; la misma es capaz de crecer autotrófica o heterotróficamente y bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

Por otra parte, los consorcios enriquecidos a partir del sitio denominado LMa3 mostraron ser arqueas y bacterias oxidantes del hierro. Entre las arqueas se detectó *Ferroplasma* a través de la técnica de hibridación fluorescente in situ (FISH) mientras que dentro de las bacterias se detectaron *Sulfobacillus*, *Leptospirillum* y miembros del género *Acidithiobacillus*.

Los consorcios termofílicos aislados mostraron ser altamente eficientes en la biolixiviación de minerales de cinc permitiendo la recuperación casi completa del metal. Los resultados de la biolixiviación se ajustaron al modelo de capa no reactiva. La eficiencia de estos consorcios los muestra como potencialmente adecuados para ser usados en aplicaciones a nivel comercial aunque con las restricciones propias que imponen la temperatura de trabajo de los mismos.

Los consorcios termofílicos de Baño 9 y Las Maquinitas mostraron ser capaces de biooxidar un concentrado de un mineral refractario de oro a 70 °C, superando ampliamente lo que se consiguió con microorganismos mesófilos a 30 °C sobre el mismo mineral. Por otro lado,

consorcios provenientes de Las Máquinas pudieron biooxidar un mineral semejante a 30 °C (temperatura muy alejada de la que tenían los sitios de los cuales fueron aislados) de manera más eficiente que la conseguida por microorganismos mesófilos a la misma temperatura.

Estos mismos consorcios catalizaron significativamente la disolución de troilita que es un sulfuro de hierro asociado a otros cuya oxidación provoca la aparición de drenajes ácidos tanto de rocas como de minas. Los resultados muestran que la acción de microorganismos acidófilos sobre este sulfuro (que puede estar presente en los mismos ambientes extremos que habitan microorganismos semejantes) podría contribuir a la generación de drenajes ácidos ya que durante la disolución de la troilita se comprobó un fuerte descenso del pH (esencialmente por la precipitación de compuestos oxidados de hierro(III) el cual fue producido por actividad bacteriana) y la generación de un lixiviado con alto contenido en ión férrico; este lixiviado podría disolver otros sulfuros sumando otros metales pesados al mismo.

Resumiendo, los principales logros de este Trabajo de Tesis Doctoral son los siguientes:

- 1) Obtención de consorcios termófilos estables con capacidades biolixiviantes
- 2) Verificación de la amplia flexibilidad térmica de algunos de estos consorcios que le permiten mantener actividad azufre y/o hierro-oxidante en condiciones térmicas muy diferentes a las de su origen
- 3) Verificación de una comunidad microbiana similar en enriquecimientos producidos en muestras tomadas en sitios de diferentes condiciones fisicoquímicas originales
- 4) Aislamiento de una nueva especie de *Acidianus*
- 5) Biolixiviación de un mineral de cinc utilizando consorcios termófilos a 70 °C con rendimientos muy superiores a los alcanzados con cultivos mesófilos
- 6) Biooxidación de un mineral refractario de oro utilizando consorcios termófilos a temperaturas coincidentes o no con las de sus orígenes que produjo una recuperación mayor de oro en la cianuración posterior
- 7) Verificación de la acción de los consorcios termófilos naturales en la disolución de troilita que es un sulfuro de hierro asociado a otros que participan en el drenaje ácido de minas

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis han sido ya parcialmente publicados en:

- “The influence of two thermophilic consortia on troilite (FeS) dissolution” M.A. Giaveno, G. Pettinari, E. González Toril, A. Aguilera, M.S. Urbieto, E. Donati. Aceptado para su publicación en Hydrometallurgy, noviembre 2010, DOI information: 10.1016/j.hydromet.2010.11.015
- “First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue-Caviahue system”. P. Chiacchiarini, L. Lavalle, A. Giaveno, E. Donati. Hydrometallurgy **104**, 494-500, 2010.
- “Bioleaching of a zinc sulfide ore by thermophilic consortia isolated from Copahue Volcano”. A. Giaveno, E. Donati. Advanced Materials Research **20-21**, 79-82, 2007.
- “Oxidative capacity of native strains from Copahue geothermal system in the pretreatment of a gold sulfide ore”. A. Giaveno, P. Chiacchiarini, C. Cordero, L. Lavalle, J. Huergo, E. Donati. Advanced Materials Research **71-73**, 473-476, 2009.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se abren diferentes líneas de investigación, tanto básicas como aplicadas para el futuro próximo; entre ellas se destacan:

- Estudios específicos con la nueva especie aislada en función de caracterizarla fisiológicamente, registrarla y, además, analizar su potencialidad biolixivante
- Análisis de la flexibilidad térmica de los consorcios y de la modificación de la estructura de la comunidad frente a los cambios de temperatura
- Extensión a otra escala de los estudios de biolixiviación y biooxidación realizados para este trabajo
- Estudios de biolixiviación y biooxidación con otros minerales utilizando los mismos consorcios de este trabajo

REFERENCIAS

- Acevedo, F., 2002. Present and future of bioleaching in developing countries. EJB Electronic Journal of Biotechnology 5, 196-199.
- Akcil, A., Koldas, S., 2006. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. Journal of Cleaner Production 14, 1139-1145.
- Allen, E.E., Tyson, G.W., Whitaker, R.J., Detter, J.C., Richardson, P.M., Banfield, J.F., 2007. Genome dynamics in a natural archaeal population. Ecology, PNAS, 104, 1883-1888
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. Journal of Bacteriology 172, 762-770.
- Amann, R.I., Ludwig W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews 59, 143-169.
- Angelelli, V., 1984. Yacimientos metalíferos de la República Argentina, Volumen II. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, UNLP, La Plata, p. 704
- Anjum, F., Bhatti, H.N., Ghauri, M.A., 2010. Enhanced bioleaching of metals from black shale using ultrasonics. Hydrometallurgy 100, 122-128.
- APHA, AWWA, WPCF, 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos, S.A Madrid, p. 1715.
- Armijo, F., Ubogui, J., Corvillo, I., Monasterio, A.M., Maraver, F., 2008. Estudio de los peloides de las Termas de Copahue (Neuquén, Argentina). Balnea 4, 143-150.
- Aston, J.E., Apel, W.A., Lee, B.D., Peyton, B.M., 2010. Effects of cell condition, pH, and temperature on lead, zinc, and copper sorption to *Acidithiobacillus caldus* strain BC13. Journal of Hazardous Materials 184, 34-41.
- Astudillo, C., Acevedo, F., 2008. Adaptation of *Sulfolobus metallicus* to high pulp densities in the biooxidation of a flotation gold concentrate. Hydrometallurgy 92, 11-15.

- Astudillo, C., Acevedo, F., 2009. Effect of CO₂ air enrichment in the biooxidation of a refractory gold concentrate by *Sulfolobus metallicus* adapted to high pulp densities. *Hydrometallurgy* 97, 94-97.
- Astudillo, C., González, P., Gentina, J.C., Acevedo, F., 2008. Effect of pulp densities on the bioleaching capacity of an adapted strain of *S. metallicus*. *Journal of Biotechnology* 136, S482-S482.
- Auernik, K.S., Cooper, C.R., Kelly, R.M., 2008^a. Life in hot acid: pathway analyses in extremely thermoacidophilic archaea. *Current Opinion in Biotechnology* 19, 445-453.
- Auernik, K.S., Maezato, Y., Blum, P.H., Kelly, R.M., 2008^b. The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 682-692.
- Bajaj, I.B., Survase, A.A., Saudagar, P.S., Singhal, R.S., 2007. Gellan gum: fermentation, production, downstream, processing and applications. *Reviews Food Technology and Biotechnology* 45, 341-354.
- Bastías, M., Gentina, J.C., 2010. Variables affecting the growth and ferrous oxidation capacity of *L. ferrooxidans* in continuous culture. *Hydrometallurgy* 104, 351-355.
- Bathe, S., Norris, P.R., 2007. Ferrous iron- and sulfur-induced genes in *Sulfolobus metallicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2491-2497.
- Berbeglia, Y., Martínez Dopico, C.I., Gallegos, E., Vattuone, M.E.Y, Latorre, C.O., 2005. Gunningita en asociación con silicatos de cinc en la veta Lastenia del distrito Pb-Zn Campana Mahuida, Neuquén, XVI Congreso Geológico Argentino (La Plata), Tomo II, p. 603-606.
- Bermúdez, A.H., Delpino, D.H., 2002. Las Erupciones del volcán Copahue del año 2000. Impacto social y del medio económico. Provincia de Neuquén, Argentina, 15° Congreso Geológico Argentino (El Calafate), 3, p. 365-370.
- Bertoldo, C., Antranikian, G., 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 6, 151-160.
- Bevilaqua, D., Garcia Jr., O., Tuovinen, O.H., 2010. Oxidative dissolution of bornite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Process Biochemistry* 45, 101-106.

- Bhappu, R.B., 1990. Hydrometallurgical processing of precious metals ores. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review 6, 67-80.
- Bhatti, T., Bigham, J., Carlson, L., Tuovinen, O., 1993. Minerals products of pyrrhotite oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. Applied and Environmental Microbiology 56, 1984-1990.
- Bigham, J.M., Carlson, L., Murad, E., 1994. Schwertmannite, a new iron oxyhydroxy-sulphate from Pyhasalmi, Finland, and other localities. Mineralogical Magazine 58, 641-648.
- Bishop, J.L., Murad, E., 2005. The visible and infrared spectral properties of jarosite and alunite. American Mineralogist 90, 1100-1107.
- Boctor, N.Z., Bell, P.M., Mao, H.K., 1982. Petrology and shock metamorphism of Pampa del Infierno chondrite. Geochimica et Cosmochimica Acta, 46, 1903-1911.
- Bond, P.L., Banfield, J.F., 2001. Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for in situ detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acid mine drainage environments. Microbial Ecology 41, 149-161.
- Boothroyd, I.K.G., 2009. Ecological characteristics and management of geothermal systems of the Taupo Volcanic Zone, New Zealand. Geothermics 38, 200-209.
- Boudeulle, M., Muller, J.P., 1988. Structural characteristics of hematite, goethite, and their relationships with kaolinite in a laterite from Cameroon. A TEM study. Bulletin Minéralogical 111, 149-166.
- Breed, A.W., Hansford, G.S., 1999. Studies on the mechanism and kinetics of bioleaching. Minerals Engineering 12, 383-392.
- Brierley, C.L., 2010. Biohydrometallurgical prospects. Hydrometallurgy 104, 324-328.
- Brierley, J.A., 2008. A perspective on developments in biohydrometallurgy. Hydrometallurgy 94, 2-7.
- Brierley, J.A., Brierley, C.L., 1999. Present and future commercial applications of biohydrometallurgy. In: R. Amils and A. Ballester (editors) Proc. International Biohydrometallurgy Symposium IBS-99, El Escorial, España. Elsevier, Amsterdam, Part A, 81-97.

- Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., Weiss, R.L., 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Archives of Microbiology 84, 54-68.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D., Noller, H.F., 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology 148, 107-127.
- Bunch, T.E., Keil, K., Olsen, E., 1970. Mineralogy and Petrology of Silicate Inclusions in Iron Meteorites. Contributions to Mineralogy and Petrology 25, 297-340.
- Canales, C., Acevedo, F., Gentina, J.C., 2002. Laboratory-scale continuous bio-oxidation of a gold concentrate of high pyrite and enargite content. Process Biochemistry 37, 1051-1055.
- Cancho, L., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., Muñoz, J.A., 2007. Bioleaching of a chalcopyrite concentrate with moderate thermophilic microorganisms in a continuous reactor system. Hydrometallurgy 87, 100-111.
- Caraballo, M.A., Rötting, T., Nieto, J.M., Ayora, C., 2009. Sequential extraction and DXRD applicability to poorly crystalline Fe- and Al-phase characterization from an acid mine water passive remediation system. American Mineralogist 94, 1029-1038.
- Cardona, S., Romenssellez, F., Guiliani, N., Jerez, C., 2001. The glycogen-bound polyphosphate kinase from *Sulfolobus acidocaldarius* is actually glycogen synthase. Applied and Environmental Microbiology 67, 4773-4780.
- Caselli, A.T., Agosto, M.R., Farazio, A., 2005. Cambios térmicos y geoquímicos del lago cratérico del volcán Copahue (Neuquén): posibles variaciones cíclicas del sistema volcánico. XVI Congreso Geológico Argentino (La Plata), 1, p. 751-756.
- Cavicchioli, R. (Editor), 2007. Archaea: molecular and cellular biology, ASM Press, Washington, USA, p. 523.
- Chiacchiarini, P., de la Fuente, V., Donati, E., 2001. Pre-treatment of a low grade refractory gold sulphide ore (Andacollo Neuquen-Argentina) using an airlift reactor. En: Ciminelli, V., García Jr., O. (Eds), Biohydrometallurgy: fundamentals technology and sustainable development Proceedings of

- International Biohydrometallurgy Symposium IBS-01, Ouro Preto, Brasil, Elsevier, Amsterdam, Part A, p. 107-113.
- Chiacchiarini, P., de la Fuente, V., Donati, E., 2003. Pre-treatment of a refractory gold sulfide ore by means of *Acidithiobacilli* cells. Latin American Applied Research 33, 33-37.
- Chiacchiarini, P., Lavalle, L., Giaveno, A., Donati, E., 2009. Acidophilic microorganisms from geothermal Copahue Volcano system. Assessment of biotechnological applications. Advanced Materials Research 71, 87-91.
- Chiacchiarini, P., Lavalle, L., Giaveno, A., Donati, E., 2010. First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue-Caviahue system. Hydrometallurgy 104, 334-341.
- Chiriță, P., Descostes, M., 2006a. Anoxic dissolution of troilite in acidic media. Journal of Colloid Interface Science 294, 376-384.
- Chiriță, P., Descostes, M., 2006b. Troilite oxidation by hydrogen peroxide. Journal of Colloid Interface Science 299, 260-269.
- Church, J.S., Evans, D.J., 2008. A spectroscopic investigation into the reaction of sodium tetrathionate with cysteine. Spectrochimica Acta 69, 256-262.
- Ciftci, H., Akcil, A., 2010. Effect of biooxidation conditions on cyanide consumption and gold recovery from a refractory gold concentrate. Hydrometallurgy 104, 142-149.
- Clark, D.A., Norris, P.R., 1996. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. Microbiology 142, 785-790.
- Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part IV: The role of redox potential in the presence of mesophilic and thermophilic bacteria. Hydrometallurgy 93, 106-115.
- Corkhill, C.L., Vaughan, D.J., 2009. Arsenopyrite oxidation - A review. Applied Geochemistry 24, 2342-2361.
- Cornell, R.M., Schwertmann, U., 2003. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences, and uses. Second Edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p. 664.

- Costa, M.C., 1997. Hydrometallurgy of gold: new perspectives and treatment of refractory sulphide ores. *Fizykochemiczne Problemy Mineralurgii* 31, 63-72.
- Coto, O., Galizia, F., Hernández, I., Marrero, J., Donati, E., 2008. Cobalt and nickel recoveries from laterite tailings by organic and inorganic bio-acids. *Hydrometallurgy* 94, 18-22.
- Coutsiers, N., 2010. Informe técnico interno generado por profesionales responsables del área Medio Ambiente de la Minera Andacollo Gold S.A.
- da Silva, G.L., 2004^a. Relative importance of diffusion and reaction control during the bacteria and ferric sulfate leaching of zinc sulfide. *Hydrometallurgy* 73, 313-324.
- da Silva, G.L., 2004^b. Kinetics and mechanism of the bacterial and ferric sulfate oxidation of galena. *Hydrometallurgy* 75, 99-110.
- Dahl, C., Prange, A., 2006. Bacterial sulfur globules: occurrence, structure and metabolism. *Microbiology Monographs* 1, 21-51.
- Dai, Q., Feng, X., Qiu, G., Jiang, H., 2003. Mercury contaminations from gold mining using amalgamation technique in Xiaolinling Region, Shanxi Province, PR China, *Journal de Physique IV* 107, 345-348.
- Deive, F.J., Domínguez, A., Barrio, T., Moscoso, F., Morán, P., Longo, M.A., Sanromán M.A., 2010. Decolorization of dye reactive black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). *Journal of Hazardous Materials* 182, 735-742.
- Delpino, D., Bermúdez, A., 1993. La actividad del volcán Copahue durante 1992. Erupción con emisión de azufre piroclástico. *Actas del 12° Congreso Geológico Argentino y 2° Congreso de Exploración de Hidrocarburos (Neuquén)*, 4, p. 292-301.
- Deming, J.W., Baross, J.A., 1986. Solid medium for culturing black smoker bacteria at temperatures to 120°C. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 238-243.
- Díaz, X., Roldán, C., 1999. A study of the adaptation of native iron oxidizing bacteria to thiourea. *Process Metallurgy* 9, 247-255.
- Ding, J., Price, W.E., Ralph, S. F., Wallace, G.G., 2003. Recovery of gold cyanide using inherently conducting polymers *Polymer International*, 52, 1, 51-55.

- Donati, E., Curutchet, G., Pogliani, C., Tedesco P., 1996. Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Process Biochemistry* 31, 129-134.
- Donati, E., Sand, W. (Eds.) 2007. Microbial processing of metal sulfides. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 326.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Hind, A., Bowman, J.P., Bond, P.L., 2004. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2079-2088.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R., Bond, P.L., 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149, 1959-1970.
- Dopson, M., Sundkvist, J.E., Lindström, E.B., 2006. Toxicity of metal extraction and flotation chemicals to *Sulfolobus metallicus* and chalcopyrite bioleaching. *Hydrometallurgy* 81, 205-213.
- Dreisinger, D., 2006. Copper leaching from primary sulfides: options for biological and chemical extraction of copper. *Hydrometallurgy* 83, 10-20.
- Du Plessis, C.A., Batty, J.D., Dew, D.W., 2007. Commercial applications of thermophile bioleaching. En: *Biomining*. Rawlings, D., Johnson, B. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 57-80.
- Eckert, B., Steudel, R., 2003. Molecular spectra of sulfur molecules and solid sulfur allotropes. *Topics in Current Chemistry* 231, 181-191.
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Gihring, T.M., Banfield, J.F., 2000. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acidic mine drainage. *Science* 287, 1796-1798.
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Druschel, G.K., McGuire, M.M., Hamers, R.J., Banfield, J.F., 2000. Geochemical and biological aspects of sulfide mineral dissolution: lessons from Iron Mountain, California. *Chemical Geology* 169, 383-397.
- Egorova, K., Antranikian, G., 2005. Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology* 8, 649-655.
- Ehrlich, H.L., Newman, D.K., 2009. *Geomicrobiology*, fifth edition, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA., p. 630.

- Eichler, J., 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances* 19, 261-278.
- Falco, L., Pogliani, C., Curutchet, G., Donati E., 2003. A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy* 71, 31-36.
- Fatmehsari Haghsheenas, D., Keshavarz Alamdari, E., Bonakdarpour, B., Darvishi, D., Nasernejad, B., 2009. Kinetics of sphalerite bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 99, 202-208.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Fernández Lima, J.C., 1978. Yacimientos de minerales Metalíferos. VII Congreso Geológico Argentino, Relatorio de Geología y Recursos Naturales del Neuquén (Buenos Aires), p. 209-221.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., Golyshin, P.N., 2007. Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology* 10, 207-214.
- Fleming, C.A., 1992. Hydrometallurgy of precious metals recovery. *Hydrometallurgy* 30, 127-162.
- Florian, B., Noël, N., Sand, W., 2010. Visualization of initial attachment of bioleaching bacteria using combined atomic force and epifluorescence microscopy. *Minerals Engineering* 23, 532-535.
- Folguera, A., Ramos, V., 2000. Control estructural del volcán Copahue (38° S - 71° O): implicancias tectónicas para el arco volcánico cuaternario (36-39° S). *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 55, 229-244.
- Fowler, T.A., Crundwell, F.K., 1999. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5285-5292.
- Franchini, M.B., Meinert, L.D., Montenegro, T.F., 2000. Skarns related to porphyry-style mineralization at Caicayén Hill, Neuquén, Argentina: composition and evolution of hydrothermal fluids. *Economic Geology* 95, 1197-1213.
- Frimmel, H.E., 2008. Earth's continental crustal gold endowment *Earth and Planetary Science Letters* 267, 45-55.

- Frols, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Boekema, E.J., Driessen, A.J.M., Schleper, C. Albers, S.V., 2008. UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Molecular Microbiology* 70, 938-952.
- Frols, S., White, M.F., Schleper, C., 2009. Reactions to UV damage in the model archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemical Society Transactions* 37, 36-41.
- Gahan, S.C., Sundkvist, J.E., Sandström, Å., 2010. Use of mesalime and electric arc furnace (EAF) dust as neutralising agents in biooxidation and their effects on gold recovery in subsequent cyanidation. *Minerals Engineering* 23, 731-738.
- Gallegos, E., Berbeglia, Y., Martínez Dopico, C.I., Lagorio, S.L., Vattuone, M.E., Latorre, C.O., 2004. Hallazgo de zincsilita acompañada de willemita y hemimorfita en la veta lastenia del distrito Pb-Zn Campana Mahuida, Neuquén. En: Séptimo Congreso de Mineralogía y Metalogenia (La Plata), p. 55-58.
- Garrett, R.A., Klenk H.P. (Eds), 2007. *Archaea: evolution, physiology and molecular biology*. Blackwell Publishing, Singapore, p. 388.
- Garrick-Bethell, I., Weiss, B.P., 2010. Kamacite blocking temperatures and applications to lunar magnetism, *Earth and Planetary Science Letters* 294, 1-7.
- Gatti, M., Milocco, R., Giaveno, A., 2003. Modeling the bacterial oxidation of ferrous iron with *Acidithiobacillus ferrooxidans* using kriging interpolation. *Hydrometallurgy* 71, 89-96.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W., 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2743-2747.
- Gentina, J.C., Acevedo Bonzi, F., 2005. Biolixiviación de minerales de oro. En: *Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras*, Acevedo, F., Gentina, M. (Eds), Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, Capítulo 5, p. 79-92.
- Gericke, M., Govender, Y., Pinches, A., 2010. Tank bioleaching of low-grad chalcopyrite concentrates using redox control. *Hydrometallurgy* 104, 414-419.

- Giaveno, A., Donati, E., 2001. Bioleaching of heazlewoodite by *Thiobacillus* spp. *Process Biochemistry* 36, 955-962.
- Giaveno, M.A., Chiacchiarini, P.A., Lavalle, T.L., Donati, E.R., 2005. Reversed flow airlift reactor characterization for bioleaching applications. En: Harrison, STL, Rawlings, D.E., Petersen, J. (Eds). *Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium*, Cape Town, South Africa, Compress, p. 125-135.
- Giaveno, A., Lavalle, L., Chiacchiarini P., Donati, E., 2007. Bioleaching of zinc from low-grade complex sulfide ores in an airlift by isolated *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 89, 117-126.
- Golyshina, O.V., Pivovarova, T.A., Karavaiko, G.I., Kondrate'va, T.F., Moore, E.R., Abraham, W.R., Lundsorf, H., Timmis, K.N., Yakinov, M.M., Golyshin, P.N., 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. Nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. Nov., comprising a distinct lineage of the *Archaea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 997-1006.
- Golyshina, O.V., Timmis, K.N., 2005. *Ferroplasma* and relatives recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments. *Environmental Microbiology* 7, 1277-1288.
- Gómez, E., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., 1996. Study by SEM and EDS of chalcopyrite bioleaching using a new thermophilic bacteria. *Minerals Engineering* 9, 985-999.
- Gómez, E., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F., 1999^a. Silver-catalysed bioleaching of a chalcopyrite concentrate with mixed cultures of moderately thermophilic microorganisms. *Hydrometallurgy* 51, 37-46.
- Gómez, E., Ballester, A., González, F., Blázquez, M.L., 1999^b. Leaching capacity of a new extremely thermophilic microorganism, *Sulfolobus rivotincti*. *Hydrometallurgy* 52, 349-366.
- González Díaz, E., 2005. Geomorfología de la región del volcán Copahue y sus adyacencias (centro-oeste del Neuquén). *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 60, 72-87.

- González, R., Gentina, J.C., Acevedo, F., 1999. Continuous biooxidation of a refractory gold concentrate. *Process Metallurgy* 9, Part 1, 309-317.
- González, R., Gentina, J.C., Acevedo, F., 2004. Biooxidation of a gold concentrate in a continuous stirred tank reactor: mathematical model and optimal configuration. *Biochemical Engineering Journal* 19, 33-44.
- González-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R., Amils, R., 2003. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4853-4865.
- González-Toril, E., Gómez, F., Malki M., Amils, R., 2006. Methods for the isolation and study of acidophilic microorganisms. *Methods of Microbiology* 35, 436-502.
- Grogan, D., 1996. Isolation and fractionation of cell envelope from the extreme thermo-acidophile *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Microbiological Methods* 26, 35-43.
- Groudev, S.N., Spasova, I.I., Komnitsas, K., Paspaliaris, I., 2001. Microbial heap leaching of copper and gold from a sulphide ore. In: Ciminelli V. García Jr. O. (editors) *Biohydrometallurgy: fundamentals, technology and sustainable development* Proc. International Biohydrometallurgy Symposium IBS-01. Ouro Preto, Brasil. Elsevier, Amsterdam, Part A, 581-586.
- Gu, G., Zhao, K., Qiu, G., Hu, Y., Sun, X., 2009. Effects of *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus caldus* on surface properties of pyrrhotite. *Hydrometallurgy* 100, 72-75.
- Guo, Z., Zhang, L., Cheng, Y., Xiao, X., Pan, F., Jiang, K., 2010. Effects of pH, pulp density and particle size on solubilization of metals from a Pb/Zn smelting slag using indigenous moderate thermophilic bacteria. *Hydrometallurgy* 104, 25-31.
- Hall, J.R., Mitchell, K.R., Jackson-Weaver, O., Kooser, A.S., Cron, B.R., Crossey, L.J., Takacs-Vesbach, C.D., 2008. Molecular characterization of the diversity and distribution of a thermal spring microbial community by using rRNA and metabolic genes. *Applied Environmental Microbiology* 74, 4910-4922.
- Hallberg, K., Sehlín, H., Lindström, E., 1996^a. Toxicity of arsenic during high temperature bioleaching of gold-bearing arsenical pyrite. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45, 212-216.

- Hallberg, K.B., Dopson, M., Lindstrom, A.B., 1996^b. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. Journal of Bacteriology 178, 6-11.
- Hallberg, K.B., 2010. New perspectives in acid mine drainage microbiology. Hydrometallurgy 104, 448-453.
- Hansford, G.S., Vargas, T., 2001, Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes. Hydrometallurgy 59, 135-145.
- Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J.-H., Gehrke T., Sand, W., 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. Hydrometallurgy 83, 245-254.
- Harahuc, L., Lizama, H.M., Suzuki, I., 2000. Effect of anions on selective solubilization of zinc and copper in bacterial leaching of sulfide ores. Biotechnology and Bioengineering 69, 196-203.
- Harvey, T., Van Der Merwe, W., Afewu, K., 2002. The application of the GeoBiotics GEOCOAT[®] biooxidation technology for the treatment of sphalerite at Kumba resources' Rosh Pinah mine. Minerals Engineering 15, 823-829.
- Hawkes, R.B., Franzmann, P.D., O'hara, G., Plumb, J. J., 2006. *Ferroplasma cupricumulans* sp. nov., a novel moderately thermophilic, acidophilic archaeon isolated from an industrial-scale chalcocite bioleach heap. Extremophiles 10, 525-530.
- He, Z., Zhong, H., Li, Y., 2004. *Acidianus tengchongensis* sp. nov., a new species of acidothermophilic archaeon isolated from an acidothermal spring. Current Microbiology 48, 159-163.
- He, H., Yang, Y., Xia, J., Ding, J., Zhao, X., Nie, Z., 2008. Growth and surface properties of new thermoacidophilic archaea strain *Acidianus manzaensis* YN-25 grown on different substrates. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 18, 1374-1378.
- He, H., Xia, J.L., Yang, Y., Jiang, H., Xiao, C., Zheng, L., Ma, C., Zhao, Y., Qiu, G., 2009. Sulfur speciation on the surface of chalcopyrite leached by *Acidianus manzaensis*. Hydrometallurgy 99, 45-50.
- Hedenquist, J.W., Izawa, E., Arribas, A., White, N.C., 1996. Epithermal gold deposits: Styles, characteristics, and exploration. In Society of Resource

- Geology Geology (Editor), Resource Geology Special. Publication Komiyama Printing Co., Tokyo 1, 165-182.
- Hilson, G., Hilson, C. J., Pardie S., 2007. Improving awareness of mercury pollution in small-scale gold mining communities: Challenges and ways forward in rural Ghana Environmental Research 103, 75-287.
- Holmes, D.S., Bonnefoy, V., 2007. Genetic and bioinformatic insights into iron and sulfur oxidation mechanisms of bioleaching organisms. En: Biomining. Rawlings, D., Johnson, B. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 281-308.
- Huber, G., Spinnler, C., Gambacorta, A., Stetter, K.O., 1989. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. Systematic and Applied Microbiology 12, 38-47.
- International Zinc Association: Zinc basics and applications. 2007. Available from www.iza.com.
- Jain, R., Pathak, A., Sreekrishnan, T.R., Dastidar, M.G., 2010. Autoheated thermophilic aerobic sludge digestion and metal bioleaching in a two-stage reactor system, Journal of Environmental Sciences 22, 230-23.
- Jameson, E., Rowe, O.F., Hallberg, K. B., Johnson, D.B., 2010. Sulfidogenesis and selective precipitation of metals at low pH mediated by *Acidithiobacillus* spp. and acidophilic sulfate-reducing bacteria. Hydrometallurgy 104, 488-493.
- Jerez, C.A., 2008. Hydrometallurgy: The use of genomics, proteomics and other OMICS technologies for the global understanding of biomining microorganisms. Hydrometallurgy 94, 162-169.
- Jica-EPEN, 1992. The feasibility study on the northern Neuquén geothermal development project. Final Report. Japan International Cooperation Agency-Ente Provincial de energía del Neuquén.
- Johnson, D.B., 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. FEMS Microbiology Ecology 37, 307-317.
- Johnson, D.B., 2001. Importance of microbial ecology in the development of new mineral technologies. Hydrometallurgy 59, 147-157.
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2005. Acid mine drainage remediation options: a review. Science of the Total Environment 338, 3-14.

- Johnson, D.B., 2006. Biohydrometallurgy and the environment: intimate and important interplay. *Hydrometallurgy* 83, 153-166.
- Johnson, D.B., Hallberg, K.B., 2008. Carbon, iron and sulfur metabolism in acidophilic microorganisms. *Advances Microbiology Physiology* 54, 202 - 256.
- Johnson, D.B., Jameson, E., Rowe, O.F., Wakeman, K., Hallberg, K.B., 2009. Sulfidogenesis at low pH by acidophilic bacteria and its potential for the selective recovery of transition metals from mine water. *Advanced Materials Research* 71-73, 693-696.
- Johnson, D.B., Joulain, C.E., d'Hugues, E.P., Hallberg, K.B., 2008. *Sulfobacillus benefaciens* sp. nov., an acidophilic facultative anaerobic Firmicute isolated from mineral bioleaching operations. *Extremophiles* 12, 789-798.
- Karavaiko, G.I., Bogdanova, T.I., Tourova, T.P., Kondrateva, T.F., Tsaplina, I.A., Egorova, M.A., Krasil'nikova, E.N., Zakharchuk, L.M., 2005. Reclassification of '*Sulfobacillus thermosulfidooxidans* subsp. thermotolerans' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillus disulfidooxidans* Dufresne et al. 1996 as *Alicyclobacillus disulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 941-947.
- Kashefi, K., Tor, J.M., Holmes, D.E., Gaw Van Praagh, C.V., Reysenbach, A.L., Lovely, D.R., 2002. *Geoglobus ahangari* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic archaeon capable of oxidizing organic acids and growing autotrophically on hydrogen with Fe (III) serving as the sole electron acceptor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 719-728.
- Keeling, S.E., Davies, K.L., Palmer, M.L., Townsend, D.E., Watkin, E., Johnson, J.A., Watling, H.R., 2006. Utilisation of native microbes from a spent chalcocite test heap. *Hydrometallurgy* 83, 124-131.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.

- King, H.E., Prewitt, C.T., 1982. High-pressure and high-temperature polymorphism of iron sulfide (FeS). *Acta Crystallographica* 38, 1877-1887.
- Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., Sand, W., 2003. Bioleaching—a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* 71, 83-88.
- Klein, C., Hurbert Jr., C.S., 2003. Manual de mineralogía, Ed. Reverté, Cuarta Edición, Barcelona, España, p. 620.
- Kletzin, A., Ulrich, T., Muller, F., Bandejas, T. M., Gomez, C.M., 2004. Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36, 77-91.
- Kletzin, A., 2007^a. General characteristics and important model organisms. En: *Archaea. Molecular cell biology*, Cavicchioli, R. (Ed.), Norwalk: ASM Press, Washington DC, Chapter 2, p. 14-92.
- Kletzin, A., 2007^b. Metabolism of inorganic sulfur compounds in Archaea. En: *Archaea. evolution, physiology, and molecular biology*. Garrett, R.A., Klenk, H.P. (Eds), Oxford, Blackwell, Chapter 23, p. 261-274.
- Kletzin, A., 2008. Oxidation of sulfur and inorganic sulfur compounds in *Acidianus ambivalens*. En: *Microbial sulfur metabolism*. Dahl, C., Fredrich, G.C. (Eds), Springer, Berlin, Chapter 15, p. 184-200.
- Klingl, A., Mentale, R., Lottspeich, F., Albers, S.V., Zolghadr, B., Rachel, R., Kletzin, A., 2009. *Acidianus*, *Sulfolobus* and *Metallosphaera* surface layers: structure, composition and gene expression. *Molecular Microbiology* 73, 58-72.
- Kolthoff, I.M., 1972. Análisis químico cuantitativo. Cuarta edición. Editorial Nigar, Buenos Aires, p. 1321.
- Komnitsas, C., Pooley, F.D. 1989. Mineralogical characteristics and treatment of refractory gold ores. *Minerals Engineering*, 2, 449-457.
- Konishi, Y., Nishimura, H., Asai, S., 1998. Bioleaching of sphalerite by the acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi*. *Hydrometallurgy* 47, 339-352.
- Koschorreck, M., 2008. Microbial sulfate reduction at a low pH. *FEMS Microbiology Ecology* 64, 329-342.

- Kumpulainen, S., Räisänen, M.L., Von der Kammer, F., Hofmann T., 2008. Ageing of synthetic and natural schwertmannites at pH 2-8. *Clay Minerals* 43, 437-448.
- Lapaglia, C., Hartzell, P.L., 1997. Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3158-3163.
- Lavalle, L., Giaveno, A., Pogliani, C., Donati, E., 2008. Bioleaching of polymetallic sulfide mineral by native strains of *Leptospirillum* from Patagonia. *Process Biochemistry* 43, 445-450.
- Lee, J. Acar, S., Doerr, D.L., Brierley, J. A., 2010. Comparative bioleaching and mineralogy of composited sulfide ores containing enargite, covellite and chalcocite by mesophilic and thermophilic microorganisms *Hydrometallurgy*, doi: 10.1016/j.hydromet.2010.10.001
- Levenspiel, O., 1972. *Chemical Reaction Engineering*, Segunda Edición, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 361-373.
- Liao, M.X., Deng, T.L., 2004. Zinc and lead extraction from complex raw sulfides by sequential bioleaching and acidic brine leach. *Minerals Engineering* 17, 17-22.
- Lin, C.C., Casida Jr., L.E., 1984. Gerlerite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 427-429.
- Lindstrom, B.E., Sehlin, H.M., 1989. High efficiency of plating of the thermophilic sulfur-dependent archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2030-2021.
- Lindström, E B., Sandström, Å., Sundkvist, J.E., 2003. A sequential two-step process using moderately and extremely thermophilic cultures for biooxidation of refractory gold concentrates *Hydrometallurgy* 71, 21-30.
- Lizama, H., Suzuki, I., 1989. Synergistic competitive inhibition of ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* by increasing concentrations of ferric Iron and Cells. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 2588-2591.
- Lizama, H.M., Fairweather, M.J., Dai, Z., Allegretto, T.D., 2003. How does bioleaching start?. *Hydrometallurgy* 69, 109-116.

- Logsdon, M. J., Hagelstein, K., Mudder, T. I., 1999. The management of cyanide in gold extraction. Editado por ICME International Council on Metals and the Environment, Ottawa, Canadá, p.44.
- Longhans, D., Lord, A., Lampshire, D., 1995. Biooxidation of an arsenic-bearing refractory gold ore. *Minerals Engineering* 8, 147-158.
- Ly Arrascue, M., 2005. Biooxidación de concentrados refractarios de arsenopirita en tanques agitados: experiencia industrial en Tamboraque, Perú. En: *Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras*. Editores: Acevedo F. y Gentina J. Ediciones Universitarias Valparaíso. Valparaíso 93-105.
- Ly Arrascue, M.E., van Niekerk, J., 2006. Biooxidation of arsenopyrite concentrate using BIOX® process: Industrial experience in Tamboraque, Perú. *Hydrometallurgy* 83, 90-96
- Macalady, J.L., Jones, D.S., Lyon, E.H., 2007. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology* 9, 1402-1414.
- Mackintosh, M.E., 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology* 105, 215-218.
- Maiza, P., Mas, G., 1980. Estudio de los sulfatos Alunita-Natroalunita. Síntesis de la Serie. *Revista Asociación Argentina Mineralogía, Petrología y Sedimentología* 11, 32-41.
- Mangold, S., Harneit, K., Rohwerder, T., Class, G., Sand, W., 2008^a. Novel combination of atomic force microscopy and epifluorescence microscopy for visualization leaching bacteria on pyrite. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 410-415.
- Mangold, S., Laxander, M., Harneit, K., Rohwerder, T., Claus, G., Sand, W., 2008^b. Visualization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilms on pyrite by atomic force and epifluorescence microscopy under various experimental conditions. *Hydrometallurgy* 94, 127-132.
- Marhual, N.P., Pradhan, N., Kar, R.N., Sukla, L.B., Mishra, B.K., 2008. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. *Bioresource Technology* 99, 8331-8336.

- Márquez, M., Gaspar, J., Bessler, K.E., Magela, G., 2006. Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in São Bento Mine (Brasil). *Hydrometallurgy* 83, 114-123.
- Marsden, J., House, I., 2006. The chemistry of gold extraction. Society for mining, metallurgy and exploration, inc. (SME), Littleton, Colorado, USA, Segunda Edición, p. 645.
- Mas, G., Mas, L., Bengochea, L., 1993. Inclusiones fluidas en el pozo exploratorio COP-3; Campo Geotérmico Copahue; Provincia del Neuquén, Argentina. XII Congreso Geológico Argentino (Mendoza), 5, p. 92-98.
- Mas, G., Mas, L., Bengochea, L., 1996^a. Alteración ácido-sulfática en el campo geotérmico Copahue, Provincia de Neuquén. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 51, 78-86.
- Mas, G., Mas, L., Bengochea, L., 1996^b. Las cloritas del campo geotérmico Copahue, Neuquén. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 51, 177-184.
- Mas, L., 1993. El Campo Geotermico de Copahue: Los minerales de alteración y las inclusiones fluidas como indicadores de los parámetros físico químicos del sistema. Tesis para optar al título de Doctor en Geología. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina, p. 199.
- Mas, L., Mas, G., Bengochea, L., 2000. Heat flow of Copahue geothermal field, its relation with tectonic scheme. *Proceedings World Geothermal Congress, Japan*. p. 1419-1424.
- Mathur, J., Bizzoco, R.W., Ellis, D.G., Lipson, D.A., Poole, A.W., Levine, R., Kelley, S.T., 2007. Effects of abiotic factors on the phylogenetic diversity of bacterial communities in acidic thermal springs. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2612-2623.
- Matlakowska, R., Sklodowska, A., 2010. Uptake and degradation of copper and cobalt porphyrins by indigenous microorganisms of Kupferschiefer (Fore-Sudetic Monocline, Poland). *Hydrometallurgy* 104, 501-505.
- Mezei, L.M., Stors, D.R., 1994. Purification of PCR products. En: *PCR technology: Current innovations*. Griffin, H.G. y Griffin, A.M. (Eds.), CRC Press Boca Raton, FL., p.21-27.

- Mikkelsen, D., Kappler, U., McEwan, A.G., Sly, L.I., 2009. Probing the archaeal diversity of a mixed thermophilic bioleaching culture by TGGE and FISH. *Systematic and Applied Microbiology* 32, 501-513.
- Miller, K.W., Risanico, S.S., Risatti, J.B., 1992. Differential tolerance of *Sulfolobus* strains to transition-metals. *FEMS Microbiological Letters* 93, 69-73.
- Miller, P., Brown A., 2005. Bacterial oxidation of refractory gold concentrates. *Developments in Mineral Processing* 15, 371-40.
- Monasterio, A.M., 2008. Termas de Copahue. *Balnea* 4, 151-163.
- Monasterio, A.M., Grenovero, S., 2008. Influencia del tratamiento termal en pacientes con diagnóstico de osteoartrosis primaria de rodilla y manos derivados por el plan termalismo al complejo termal de Copahue, Neuquén, Argentina, en la temporada 2003-2007. *Balnea* 4, 133-141.
- Mousavi, S.M., Jafari, A., Yaghmaei, S., Vossoughi, M., Roostaazad, R., 2006. Bioleaching of low-grade sphalerite using a column reactor. *Hydrometallurgy* 82, 75-82.
- Mousavi, S.M., Yaghmaei, S., Vossoughi, M., Jafari, A., Hoseini, S.A., 2005. Comparison of bioleaching ability of two native mesophilic and thermophilic bacteria on copper recovery from chalcopyrite concentrate in an airlift bioreactor. *Hydrometallurgy* 80, 139-144.
- Mousavi, S.M., Yaghmaei, S., Vossoughi, M., Jafari, A., Roostaazad, R., 2006. Zinc extraction from Iranian low-grade complex zinc-lead ore by two native microorganisms: *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Sulfobacillus*. *International Journal of Mineral Processing* 80, 238-243.
- Mousavi, S.M., Yaghmaei, S., Vossoughi, M., Jafari, A., Roostaazad R., Turunen I., 2007. Bacterial leaching of low-grade ZnS concentrate using indigenous mesophilic and thermophilic strains *Hydrometallurgy* 85, 59-65.
- Muñoz Bravo, J.O., Stern, Ch., Bermúdez, A., Delpino, D., Dobbs, M.F., Frey, F.A., 1989. El vulcanismo de Los Andes. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 44, 270-283.
- Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., Acevedo, F., Gentina, J.C., González P., 2006. Electrochemical study of enargite bioleaching by mesophilic and thermophilic microorganisms. *Hydrometallurgy* 84, 175-186.

- Murad, E., Rojik, P., 2003. Iron-rich precipitates in a mine drainage environment: influence of pH on mineralogy. *American Mineralogist* 88, 1915-1918.
- Mutch, L.A., Watling, H.R., Watkin, E.L.J., 2010. Microbial population dynamics of inoculated low-grade chalcopyrite bioleaching columns. *Hydrometallurgy* 104, 391-398.
- Muyzer, G., Hottenträger, S., Teske, A., Wawer, C., 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA - A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. En: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. y de Bruijn, F.J. (Eds), Segunda Edición, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 3.4.4.1-3.4.4.22.
- Nava-Alonso, F., Elorza-Rodríguez, E., Pérez-Garibay, R., Uribe-Salas, A., 2007. Análisis químico de cianuro en el proceso de cianuración: revisión de los principales métodos *Revista de Metalurgia* 43, 20-28.
- Nies, D.H., 2003. Eflux mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27, 313-339.
- Nieto, J.M., Sarmiento, A.M., Olías, M., Canovas, C.R., Riba, I., Kalman, J., Delvalls, T.A., 2007. Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. *Environment International* 33, 445-455.
- Noël, N., Florian, B., Sand, W., 2010. AFM & EFM study on attachment of acidophilic leaching organisms. *Hydrometallurgy* 104, 370-375.
- Norris, P., Burton, N., Foulis, N., 2000. Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4, 71-76.
- Norris, P.R., Clark, D.A., Owen, J.P., Waterhouse, S., 1996. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology* 142, 775-783.
- Norris, P.R., 2007. Acidophile diversity in mineral sulfide oxidation. En: *Biomining*. Rawlings, D., Johnson, B. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 199-215.
- Ojeda, M.W., Perino, E., Ruiz, M.C., 2009. Gold extraction by chlorination using a pyrometallurgical process. *Minerals Engineering* 22, 409-411.

- Ojumu, T.V., Hansford, G.S., Petersen J., 2009. The kinetics of ferrous-iron oxidation by *Leptospirillum ferriphilum* in continuous culture: The effect of temperature. *Biochemical Engineering Journal* 46, 161-168.
- Okibe, N., Johnson, D.B., 2004. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: Significance of microbial interactions. *Biotechnology and Bioengineering* 87, 574-583.
- Olson, G.J., Brierley, J.A., Brierley, C.L., 2003. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 249-257.
- Ozkaya, B., Sahinkaya, E., Nurmi, P., Kaksonen, A.H., Puhakka, J.A., 2007. Iron oxidation and precipitation in a simulated heap leaching solution in a *Leptospirillum ferriphilum* dominated biofilm reactor. *Hydrometallurgy* 88, 67-74.
- Panarello, H.O., 2002. Características isotópicas y termodinámicas de reservorio del campo geotérmico Copahue- Caviahue, provincia de Neuquén. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 57, 328-340.
- Parker, S.R., Gammons, C.H., Pedrozo, F.L., Wood, S.A., 2008. Diel changes in metal concentrations in a geogenically acidic river: Rio Agrio, Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178, 213-223.
- Pedrozo, F., Kelly, L., Diaz, M., Temporetti, P., Baffico, G., 2001. First result on the water chemistry, algae and trophic status of an Andean acidic lake system of volcanic origin in Patagonia (Lake Caviahue). *Hydrobiology* 452, 129-137.
- Pedrozo, F., Temporetti, P., Beamud, G., Diaz, M., 2008. Volcanic nutrient inputs and trophic state of Lake Caviahue, Patagonia, Argentina. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178, 205-212.
- Perevalova, A.A., Kolganova, T.V., Birkeland N.K., Schleper, C., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Lebedinsky, A.V., 2008. Distribution of Crenarchaeota Representatives in Terrestrial Hot Springs of Russia and Iceland. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7620-7628.
- Pesce, A., 1989. Evolución vulcano tectónica del Complejo Efusivo Copahue Caviahue; su modelo geotérmico preliminar. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 44, 307-327.

- Petersen, J., 2010. Modelling of bioleach processes: Connection between science and engineering. *Hydrometallurgy* 104, 404-409.
- Pina, P.S., Oliveira, V.A., Cruz, F.L.S., Leão, V.A., 2010. Kinetics of ferrous iron oxidation by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *Biochemical Engineering Journal* 51, 194-197.
- Plumb, J., Haddad, C.M., Gibson, J.A., Franzmann P.D., 2007. *Acidianus sulfidivorans* sp. Nov., an extremely acidophilic, thermophilic archaeon isolated from a solfatara on Lihir Island, Papua New Guinea, and emendation of the genus description. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1418-1423.
- Plumb, J.J., Hawkes, R.B., Franzmann, P.D., 2007. The microbiology of moderately thermophilic and transiently thermophilic ore heaps. En: *Biomining*. Rawlings, D., Johnson, B. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 217-236.
- Pogliani, C., Donati, E., 2000. Immobilisation of *Thiobacillus ferrooxidans*: importance of jarosite precipitation. *Process Biochemistry* 35, 997-1004.
- Prado, O.A., 2005. Situación y perspectivas de la minería metálica en Argentina. Series: Recursos Naturales e Infraestructura, 91. CEPAL, Naciones Unidas, Santiago de Chile, p. 64.
- Prange, A., Hornes, J., Reinhold, Ch., Modrow, H., Dahl, Ch., 2002. Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur. *Microbiology* 148, 267-276.
- Pratt, A.R., Muir I.J., Nesbitt, H.W., 1994. X-ray photoelectron and Auger electron spectroscopic studies of pyrrhotite and mechanism of air oxidation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 827-841.
- Qin, W., Zhen, S., Yan, Z., Campbell, M., Wang, J., Liu, K., Zhang Y., 2009. Heap bioleaching of a low-grade nickel-bearing sulfide ore containing high levels of magnesium as olivine, chlorite and antigorite. *Hydrometallurgy* 98, 58-65.
- Quatrini, R., Valdés, J., Jedlicki, E., Holmes, D.S., 2007. The use of bioinformatics and genome biology to advance our understanding of bioleaching microorganisms. En: *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Donati, E., Sand, W. (Eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 221-240.
- Rapacioli, R.A., 1985. El Lago Caviahue y su Cuenca. Reporte técnico EPAS oficina de Gobierno de la Provincia de Neuquén, Argentina, p. 72.

- Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1994. Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1232-1240.
- Ravot, G., Masson, J.M., Lefèvre, F., 2006. 34 Applications of extremophiles: the industrial screening of extremophiles for valuable biomolecules. *Methods in Microbiology* 35, 785-813.
- Rawlings, D.E., 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4, 13-28.
- Rawlings, D.E., 1995. Restriction enzyme analysis of 16S rRNA genes for the rapid identification of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* strains in leaching environments. En: *Proceedings del International Biohydrometallurgy Symposium, IBS-95*. Jerez, J.C.A., Vargas, T., Toledo, H., Wiertz, J.V. (Eds), Vol. 1, University of Chile, Santiago de Chile, p. 343-350.
- Rawlings, D.E., Tributsch, H., Hansford, G.S., 1999. Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 145, 5-13.
- Rawlings, D.E., Dew, D., du Plessis, C., 2003. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology* 21, 38-44.
- Rawlings, D.E., 2007. Relevance of cell physiology and genetic adaptability of biomining microorganisms to industrial processes. En: *Biomining*. Rawlings, D., Johnson, B. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, p. 177-195.
- Rawlings, D.E., Johnson, B.D. (Eds.), 2007. *Biomining*. Springer-Verlag, Berlin, p. 324.
- Remonsellez, F., Orell, A., Jerez, C.A., 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology* 152, 59-66.
- Rivera-Santillán, R.E., Ballester Pérez, A., Blázquez Izquierdo, M.L., González-González, F., 1999. Bioleaching of a copper sulphide flotation concentrate using mesophilic and thermophilic microorganisms. *Process Metallurgy* 9, 149-158.

- Robles, J., Doers, M., 1994, pGEM[®]-T Vector systems troubleshooting guide Promega. Notes 45, 1-28.
- Rochette, P., Gattacceca, J., Ivanov, A.V., Nazarov, M.A., Bezaeva, N.S., 2010. Magnetic properties of lunar materials: Meteorites, Luna and Apollo returned samples. *Earth and Planetary Science Letters* 292, 383-391
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., Muñoz, J.A., 2003^a. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71, 37-46.
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F. Muñoz, J.A., 2003^b. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71, 47-56.
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F., Muñoz, J.A., 2003^c. New information on the sphalerite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71, 57-66.
- Rohwerder, T., Sand, W., 2007. Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Engineering in Life Sciences* 7, 301-309.
- Rojas-Chapana, J.A., Tributsch, H., 2004. Interfacial activity and leaching patterns of *Leptospirillum ferrooxidans* on pyrite. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 19-29.
- Romano, P., Blázquez, M.L., Alguacil, F.J., Muñoz, J.A., Ballester, A., González, F., 2001. Comparative study on the selective chalcopyrite bioleaching of a molybdenite concentrate with mesophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 196, 71-75.
- Roth, V., 2006. <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
- Rovere, E.I, 2004. Hoja Geológica 3772-VI Andacollo. Programa Nacional de Cartas Geológicas Argentinas, boletín 298, SEGEMAR, Buenos Aires, p. 104.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biological of Evolution* 4, 406-425.
- Salinas, E., Rivera, I., Carrillo, F., Patiño, R., Hernández, J., Hernández, L.E., 2004. Mejora del proceso de cianuración de oro y plata, mediante la pre-oxidación

- de minerales sulfurosos con ozono. Revista de la Sociedad Química de México 48, 315-320.
- Salinas-Martínez, A., de los Santos-Córdova, M., Soto-Cruz, O., Delgado, E., Pérez-Andrade, H., Háuad-Marroquín, L.A., Medrano-Roldán, H., 2008. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. Journal of Environmental Management 88, 115-119.
- Salsano, A.M., Febbraio, F., Farias, T., Cetrangolo, G.P., Nucci, R., Scaloni, A., Manco, G., 2007. Redox stress proteins are involved in adaptation response of the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* to nickel challenge. Microbial Cell Factories 6, 1-25.
- Sampson, M.I., Van der Merwe, J.W., Harvey, T.J., Bath, M.D., 2005. Testing the ability of a low grade sphalerite concentrate to achieve autothermality during biooxidation heap leaching. Minerals Engineering 18, 427-437.
- Sand, W., 2003. Microbial life in geothermal waters. Geothermics 32, 655-667.
- Sand, W., Gehrke T., 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. Research in Microbiology 157, 49-56.
- Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R., Schippers, A., 1995. Sulfur chemistry, biofilm and the indirect attack mechanism—a critical evaluation of bacterial leaching. Applied and Environmental Microbiology 43, 961-966.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.G., Schippers, A., 1999. Direct versus indirect bioleaching. Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99, Elsevier, Amsterdam, p. 27-49.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa P., Schippers, A., 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy 59, 159-175.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA-sequencing with chain terminating inhibitors. En: Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America. Biochemistry 74, 5463-5467.
- Santos, H., da Costa, M.S., 2002. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. Environmental Microbiology Mini-review 4, 501-509.

- Schelert, J., Drozda, M., Dixit, V., Dillman, A., Blum, P., 2006. Regulation of mercury resistance in the crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 188, 7141-7150.
- Schippers, A., Sand, W., 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by the indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 319-321.
- Schippers, A., 2007. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. En: *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Donati, E., Sand, W. (Eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 3-33.
- Schippers, A., Nagy, A.A., Kock, D., Melcher, F., Gock, E.D., 2008. The use of FISH and real-time PCR to monitor the biooxidation and cyanidation for gold and silver recovery from a mine tailings concentrate (Ticapampa, Peru). *Hydrometallurgy* 94, 77-8.
- Schippers, A., Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Kock, D., Wright, T.L., 2010. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* 104, 342-350.
- Schulze, D.G., 1994. Differential X-ray Diffraction Analysis of Soil Minerals. *Soil Science Society of America Journal* 677, 412-428.
- Schwertmann, U., Murad, E., 1983. Effect of pH on the formation of goethite and hematite from ferrihydrite. *Clays Clay Minerals* 31, 277-284.
- Schwertmann, U., Cornell, R.M., 2000. Iron oxides in the laboratory. Preparation and characterization, Second Edition, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, p. 210.
- Seeger, A., Neuner, A.M., Kristjansson, J.K., Stetter, K.O., 1986. *Acidianus infernus* gen. nov.? sp. nov. and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaeobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 559-564.
- Shiers, D.W., Ralph, D.E., Watling, H.R., 2010. A comparative study of substrate utilisation by *Sulfobacillus* species in mixed ferrous ion and tetrathionate growth medium. *Hydrometallurgy* 104, 363-369.

- Shokes, T.E., Moller, G., 1999. Removal of dissolved heavy metals from acid rock drainage using iron metal. *Environmental Science of Technology* 33, 282-287.
- Shungu, D., Valiant, M., Tutlane, V., Weinberg, E., Weissberger, B., Koupal, L., Gadebusch, H., Stapley, E., 1983. Gelrite as an agar substitute in bacteriological media. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 840-845.
- Silverman, M.P., Lundgren, D.G., 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology* 77, 642-647.
- Simate, Ge.S., Ndlovu, S., Walubita, L.F., 2010. The fungal and chemolithotrophic leaching of nickel laterites - Challenges and opportunities. *Hydrometallurgy* 103, 150-157.
- Skála, R., Císařová, I., Drábek, M., 2006. Inversion twinning in troilite. *American Mineralogist* 91, 917-921.
- Skinner, W.M., Nesbitt, H.W., Pratt, A.R., 2004. XPS identification of bulk whole defects and itinerant Fe 3d electrons in natural troilite (FeS) *Geochimica et Cosmochimica Acta* 68, 2259–2263.
- Skoog, D.A., 2001. Química analítica, Séptima Edición, Editorial Mc Graw Hill, México.
- Skoog, D.A., Holler, J.F., Nieman, T.A., 2001. Principios de análisis instrumental, Quinta Edición, Editorial Mc Graw Hill-Interamericana, México. p.980.
- Slobodkin, A. I., Zavarzina, D. G., Sokolova, T. G., Bonch-Osmolovskaya, E. A., 1999. Dissimilatory reduction of inorganic electron acceptors by thermophilic anaerobic prokaryotes. *Microbiology* 68, 522-542.
- Slobodkin, A.I., 2005. Thermophilic microbial metal reduction. *Microbiology* 74, 581-595.
- Slobodkina, G.B., Kolganova, T.V., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I., 2009. *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron (III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2880-2883.

- Sracek, O., Choquette, M., Gelinas, P., Lefebvre, R., Nicholson, R.V., 2004. Geochemical characterization of acid mine drainage from a waste rock pile, Mine Doyon, Quebec, Canada. *Journal of Contaminant Hydrology* 69, 45-71.
- Stahl, D.A., Amann, R., 1991. Development and application of nucleic acid probes. En: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds). John Wiley & Sons, Chichester, p. 205-248.
- Steudel, R., 2000. The chemical sulfur cycle. En: *Environmental technologies to treat sulfur pollution*. Lens, P.N.L., Hulshoff, P.L. (Eds), IWA, London, p.1-32.
- Takayanagi, S., Kawasaki, H., Sugimori, K., Yamada, T., Sugai, A., Ito, T., Yamasato, K., Shioa, M., 1996. *Sulfolobus hakonensis* sp. nov., a novel species of acidotermophilic archaeon. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 337-382.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Thomas, J.E., Skinner, W.M., Smart, T.C., 2003. A comparison of the dissolution behavior of troilite with other iron(II) sulfides; implications of structure. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 831-843.
- Tributsch, H., 1999. Direct versus indirect bioleaching. *Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99*. Elsevier, Amsterdam, p. 51-60.
- Tuffin, M., de Groot, P., Deane, S.M., Rawlings, D.E., 2004. Multiple sets of arsenic resistance genes are present within highly arsenic-resistant industrial strains of the biomining bacterium, *Acidithiobacillus caldus*. *International Congress Series* 1275, p. 165-172.
- Ubogui, J., Roma, A., Garvier, V., García, F., Magariños, G., Perrota, G., Monasterio, A.M., 2008. Seguimiento clínico de pacientes con psoriasis en Termas de Copahue (Neuquén, Argentina). *Balnea* 4, 123-132.
- Urich, T., Gomes, C.M., Kletzin, A., Frazao, C., 2006. X-ray Structure of a self-compartmentalizing sulfur cycle metalloenzyme. *Science* 311, 996-1000.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Holmes, D.S., 2008. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*:

- insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 94, 180-184.
- Vallés, J., Baschini, M., Pettinari, G. and García, N. 2004. Characterization of muds and waters of the Copahue Geothermal Field, Neuquén Province, Patagonia, Argentina. *ICAM-Brasil* 1, 507-510.
- Vallés, J., Pettinari, G., Baschini, M., Grathoff, G., 2005. Characterization of muds and waters of the Copahue Geothermal Field, Neuquén Province, Patagonia Argentina, *International Congress of Applied Mineralogy* 1, 507 - 510.
- Varekamp, J.C., 2003. Lake contamination models for evolution towards steady state. *Journal of Limnology* 62, 67-72.
- Varekamp, J.C., 2004. Copahue Volcano: a modern terrestrial analog for the opportunity landing site? *Eos* 85, 401- 407
- Varekamp, J.C., Ouimette, A., Herman, S., Delpino, D., Bermúdez, A., 2001. The 1990-2000 eruptions of Copahue, Argentina: a “beehive” volcano in turmoil. *Geology* 29, 1059-1062.
- Varekamp, J.C., Ouimette, A., Herman, S., Flynn, K., S., Bermúdez, A.H., Delpino, D.H., 2009. Naturally acid waters from Copahue volcano, Argentina. *Applied Geochemistry* 24, 208-220.
- Ver Eecke, H.C., Kelley, D.S., Holden, J.F, 2009. Abundances of hyperthermophilic autotrophic Fe(III) oxide reducers and heterotrophs in hydrothermal sulfide chimneys of the northeastern Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 242-245.
- Viera, M., Pogliani, C., Donati, E., 2007. Recovery of zinc, nickel, cobalt and other metals by bioleaching. En: *Microbial Processing of Metal Sulfides*, Donati, E., Sand, W. (Eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 103-119.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136-143.
- Watling, H.R., 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. *Hydrometallurgy* 84, 81-108.
- Watling, H.R., 2008. The bioleaching of nickel-copper sulfides. *Hydrometallurgy* 91, 70-88.

- Watling, H.R., Perrot, F.A., Shiers, D.W., 2008. Comparison of selected characteristics of *Sulfobacillus* species and review of their occurrence in acidic and bioleaching environments. *Hydrometallurgy* 93, 57-65.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4, 752-764.
- Whitman, W.B., 2009. Dialog: the modern concept of the prokaryote. *Journal of Bacteriology* 191, 2000-2005.
- Woese, C. R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *PNAS*, 1, 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS* 87, 4576-4579.
- Woese, C.R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *PNAS*, 97, 8392-8396.
- Xia, J., Yang, Y., He, H., Liang, C., Zhao, X., Zheng, L., Ma, C., Zhao, Y., Nie, Z., Qiu G., 2010. Investigation of the sulfur speciation during chalcopryrite leaching by moderate thermophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. *International Journal of Mineral Processing* 94, 52-57.
- Xie, Y., Xu, Y., Yan, L., Yang, R., 2005. Recovery of nickel, copper and cobalt from low-grade Ni-Cu sulfide tailings. *Hydrometallurgy* 80, 54-58.
- Xingyu, L., Bowei, C., Jiankang, W., Renman, R., 2010. *Leptospirillum* forms a minor portion of the population in Zijinshan commercial non-aeration copper bioleaching heap identified by 16S rRNA clone libraries and real-time PCR. *Hydrometallurgy* 104, 399-403.
- Yanai, K., 1997. General view of twelve martian meteorites. *Minerals Journal* 19, 65-74.
- Yang, X., Zhang, X., Fan, Y., Li, H., 2008. The leaching of pentlandite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* with a biological-chemical process. *Biochemical Engineering Journal* 42, 166-171.
- Yoshida, N., Nakasato, M., Ohmura, N., Ando, A., Saiki, H., Ishii, M., 2006. *Acidianus manzaensis* sp.nov., a novel thermophilic archaeon growing

- autotrophically by the oxidation of H_2 with the reduction of Fe^{3+} . *Current Microbiology* 53, 406-411.
- Yoshitaka, K., Ito, T., Masahiro, K., Nakayama, M., 2005. Ca^{2+} Dependence cell aggregation of halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100, 681-684.
- Yoshitaka, K., Nobuhiro, H., Mizue, E., Masashi, N., 2007. Effects of divalent cations on *Halobacterium salinarum* cell aggregation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 42-46.
- Yun, Z., 1986. Thermophilic microorganisms in the hot springs of Tengchong geothermal area, West Yunnan, China. *Geothermics* 15, 347-358.
- Zanettini, J.C.M., 1979^a. Geología de la comarca de Campana Mahuida (Provincia del Neuquén). *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 34, 61-68.
- Zanettini, J.C.M., 1979^b. Geología del pórfiro cuprífero Campana Mahuida, Provincia del Neuquén. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 34, 224-234.
- Zhang, C.L., Ye, Q., Huang, Z., Li, W., Chen, J., Song, Z., Zhao, W., Bagwell, C., Inskeep, W.P., Ross, C., 2008. Global occurrence of archaeal amoA genes in terrestrial hot springs. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 6417-6426.
- Zhou, H., Zhang, R., Hu, P., Zeng, W., Xie, Y., Wu, C., Qiu, G., 2008. Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite. *Journal of Applied Microbiology* 105, 591-601.
- Zhou, X.X., Wang, Y.B., Pan, Y.J., Li, W.F., 2006. Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins. *Biomedical and Life Sciences Amino Acids* 34, 25-33.

ANEXOS

ANEXO I

Medios de cultivo para enriquecimiento

Medio 88 (M88)

En los cultivos de enriquecimiento de arqueas termófilas acidófilas se utilizó el medio denominado M88, recomendado por la colección de cultivos alemana DSMZ (<http://dsmz.de/media/media88.htm>), que fuera originalmente propuesto por Brock y col. (1972).

Se preparó una solución stock concentrada de todos los componentes según se indica en la Tabla 1, a excepción del extracto de levadura. El pH fue ajustado a temperatura ambiente hasta un valor de 2,0 con ácido sulfúrico 10 N. Se esterilizó en autoclave 20 min a 121°C. Tanto el extracto de levadura como el resto de los sustratos orgánicos (glucosa, sacarosa, casaminoácidos, etc) o de otras fuentes de energía que se utilizaron, fueron esterilizados por separado y se adicionaron al medio de cultivo en el momento de efectuar la dilución correspondiente.

Tabla 1. Componentes del medio M88

Componentes	(g.L ⁻¹)	Componentes	(mg.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,30	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
KH ₂ PO ₄	0,28	CuSO ₄ .7H ₂ O	0,08
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,01
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,07	VaSO ₄ .2H ₂ O	0,01
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,02	CoSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Extracto de levadura	1,00	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	4,50
		MnSO ₄ .H ₂ O	1,53

M88+S

Se denominó (M88+S) al medio M88 suplementado con 5,0 g.L⁻¹ de azufre. El pH del medio fue regulado según requerimiento del ensayo. El azufre fue esterilizado por separado a 110 °C durante tres sesiones de 45 minutos y fue mantenido a -4 °C hasta su utilización.

M88+T

En este caso, se adicionó tetratiónato de potasio ($K_2S_4O_6$) en una concentración de $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ al medio de cultivo M88; el pH del medio fue regulado según requerimiento del ensayo y esterilizado en autoclave a 121°C por 20 min.

M88+Sac y M88+Glu

En la preparación de estos medios, se adicionó alternativamente sacarosa o glucosa al medio M88 en una concentración de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. Se reguló el pH del medio según requerimiento del ensayo y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 min.

M88+Fe(II)

Se adicionó hierro(II) disolviendo $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ al medio M88 hasta alcanzar la concentración requerida por el ensayo ($1,0\text{-}2,0 \text{ g.L}^{-1}$). Se ajustó el valor del pH a 2,0 y se esterilizó por filtración utilizando membranas de $0,2 \mu\text{m}$.

Medio 9K y 9K modificado

Se trata del clásico medio de cultivo 9K (Silverman y Lundgren, 1959) cuya composición se indica en la Tabla 2. Fue usado como medio de enriquecimiento para microorganismos autótrofos termófilos oxidantes del hierro. El pH fue regulado a valores cercanos a 2,0 para mantener una adecuada concentración de hierro(II) en solución. Los medios de cultivo se esterilizaron mediante microfiltración y se guardaron a 4°C hasta su utilización. Cuando el contenido de hierro fue diferente de 9 g.L^{-1} , se cambió el número inicial del nombre para indicar el contenido adecuado.

Tabla 2. Medio 9K

Compuestos	g.L^{-1}
$(NH_4)_2SO_4$	3,0
KCl	0,1
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	$1,4 \times 10^{-2}$
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	44,2

Medio OK+T+pP

Se preparó el medio de cultivo con la composición de sales basales correspondientes al medio 9K de Silverman y Lundgren (1959), pero sin hierro y con la adición de 2,0 g.L⁻¹ de pluripectona o casaminoácidos y 3 g.L⁻¹ de K₂S₄O₆.

Medio Plumb (MP)

Se utilizó la composición basal del medio de cultivo propuesto por Plumb y col. (2007). Este medio se utilizó en ensayos sobre hierro tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas. También se lo utilizó en ensayos bajo condiciones anaeróbicas.

Tabla 3. Medio Plumb MP

<i>Compuestos</i>	<i>g.L⁻¹</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,50
K ₂ HPO ₄	0,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25

El medio basal fue alternativamente suplementado con 0,1 g.L⁻¹ de extracto de levadura, 5 g.L⁻¹ de azufre o las cantidades convenientes de FeSO₄.7H₂O o Fe₂(SO₄)₃.H₂O para alcanzar la concentración requerida de hierro en solución.

Medio 874

Según se indica en la Tabla 4, se utilizó como medio de enriquecimiento para arqueas del género *Ferroplasma*. El medio 874 (Golyshina y col., 2000) es recomendado por la colección de cultivos DSMZ (http://www.dsmz/medium/pdf/DSMZ_Medium874.pdf).

Tabla 4. Medio 874

Solución A		Solución C	
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,40 g	Extracto de levaduras 10 %	1,6 mL
KCl	0,10g	Solución de elementos traza	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,20g	FeCl ₃ .6H ₂ O	1,93 g
K ₂ HPO ₄	0,10 g	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18 g
Solución elementos traza	10,0 mL	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,45 g
Agua destilada	950,0 mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O	22,00 mg
Solución B		CuCl ₂ .2H ₂ O	5,00 mg
FeSO ₄ .7 H ₂ O	25,0 g	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3,00 mg
H ₂ SO ₄ , 1N	40,0 mL	VaSO ₄ .2H ₂ O	3,80 mg
Agua destilada	10,0 mL	CoSO ₄ .7H ₂ O	2,00 mg
		Agua destilada	1000 mL

Se adicionó la solución B a la solución A, se ajustó el pH en el rango de 1,6-1,8 con ácido sulfúrico 10 N y se esterilizó por filtración con membrana de 0,2 µm. Finalmente, se adicionó el volumen indicado de solución de extracto de levadura previamente esterilizada.

ANEXO II

Métodos analíticos

Determinación de la población celular

En todas las experiencias se utilizó un microscopio Bausch & Lomb Galen™ equipado con dispositivo de contraste de fase y una cámara de conteo celular Petroff-Haüsser.

Procedimiento. La cámara cargada se colocó en el microscopio y el recuento se realizó una vez que el preparado se estabilizó. La cámara Petroff-Hausser está construida de manera tal que pueden observarse 25 celdas con una dimensión unitaria de 0,2 mm x 0,2 mm x 0,02 mm. Se realizó el recuento celular en 5 (cinco) celdas no contiguas. Luego, el total de células se dividió por el volumen total de dichas celdas ($4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$) a fin de obtener el resultado expresado como células.mL⁻¹.

$$\begin{aligned} \text{Cálculos:} \quad \text{volumen de celda} &= (0,2 \times 0,2 \times 0,02) \text{ mm}^3 = 8 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \\ \text{volumen de 5 celdas} &= 8 \times 10^{-4} \text{ mm}^3 \times 5 = 4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 \\ \text{células.mL}^{-1} &= \Sigma \text{ células} \times 10^3 \text{ mm}^3/\text{mL} / (4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3) \\ \text{células.mL}^{-1} &= \Sigma \text{ células} / (4 \times 10^{-6} \text{ mm}^3) \end{aligned}$$

Los conteos fueron generalmente realizados por triplicado y se aceptaron desviaciones no mayores a un 10% para una misma muestra.

Determinación de hierro(II) por espectrofotometría de absorción molecular

Se seleccionó un método espectrofotométrico utilizando 1,10-fenantrolina para la determinación de hierro (II) a concentraciones menores de 2 g.L⁻¹ (Kolthoff y col., 1988).

Preparación de Reactivos.

Buffer acetato de amonio: 250 g NH₄C₂H₃O₂, 150 mL AD y 700 mL ácido acético glacial.

Solución de 1,10-fenantrolina monohidratada: 100 mg de C₁₂H₈N₂.H₂O en 100 mL AD. Agregar 2 gotas de HCl concentrado.

Solución de hidroxilamina: 5,12 g de NH₂OH.HCl en 100 mL de AD.

Solución 100 ppm Fe (II): 30,3 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL.

Serie de patrones de hierro: se preparó una serie de patrones tomando los volúmenes indicados en la Tabla 5 a partir de la solución patrón de 100 ppm y adicionando 10 mL de buffer y 10 mL de solución de 1,10-fenantrolina a cada matraz de 100 mL.

Tabla 5. Serie patrón de hierro

Patrón N°	Vol. a tomar (mL)	mg.L ⁻¹ Fe (II)
1	0	0
2	1	1
3	2	2
4	4	4
5	5	5
6	7	7

Las soluciones patrón se pueden conservar hasta 6 meses en un lugar fresco y al resguardo de la luz.

Preparación de muestras.

Para la determinación de Fe (II): se mezclaron 1 mL muestra, 1 mL buffer acetato y 1 mL de 1,10-fenantrolina; se dejó estabilizar la mezcla entre 15 a 30 minutos y posteriormente se agregó 7 mL AD

Para la determinación de Fe total: se mezclaron 1 mL muestra, 0,5 mL hidroxilamina, 1 mL buffer acetato y 1 mL 1,10-fenantrolina; se dejó estabilizar la mezcla entre 15 a 30 minutos y posteriormente se agregó 6,5 mL AD.

Se realizó la lectura de absorbancia a 510 nm.

Determinación de hierro(II) por permanganometría

El método seleccionado para la determinación de hierro (II) a concentraciones mayores de 2 g.L^{-1} , fue la titulación con KMnO_4 en medio ácido (Kolthoff y col., 1988). El permanganato de potasio es un buen agente oxidante y el intenso color del ion permanganato es suficiente para indicar por sí mismo el punto final de la mayor parte de las volumetrías en que se emplea, por lo cual no se requiere el uso de otros indicadores.

Los resultados obtenidos por este método al analizar la concentración de hierro (II) presente en soluciones patrones de sal de Mohr en diferentes concentraciones, fueron muy satisfactorios y acordes al valor estimado demostrando que la permanganimetría era un método analítico adecuado para las determinaciones a realizar.

Preparación de reactivos.

Solución de KMnO_4 0,1 N: Se pesaron 3,2 g de KMnO_4 p.a., se disolvieron en 1 litro de agua destilada y se calentó la solución hasta ebullición y se la mantuvo a temperatura levemente inferior al punto de ebullición durante 1 h. Se dejó la solución en reposo para que se enfríe por 3 d y se filtró el líquido a través de un crisol filtrante de vidrio sinterizado. Se transfirió el filtrado a una botella limpia, manteniendo la solución en frasco oscuro color caramelo para evitar la luz. Se valoró con oxalato de sodio en medio ácido.

Solución Zimmermann-Reinhardt (solución Z-R): Se disolvieron 70 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ en 500 mL de agua, se agregaron 125 mL de H_2SO_4 concentrado y 125 mL de H_3PO_4 85%, y finalmente se diluyó hasta 1 litro.

Titulación de la solución de KMnO_4 0,1 N: se utilizó una solución de un agente reductor patrón primario, el oxalato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ Peq = 67). Se pesaron entre 0,25 g y 0,30 g de oxalato de sodio previamente secados en estufa durante 2 h a $105\text{-}110^\circ\text{C}$ y se disolvieron en 60 mL de agua destilada y 6 mL de H_2SO_4 concentrado en erlenmeyer de 250 mL. Se calentó la solución hasta $80\text{-}90^\circ\text{C}$ y se tituló con la solución de KMnO_4 hasta aparición del primer tinte rosado que permanezca durante 20 s.

Nota: La temperatura de la solución debe ser superior a 60°C en el punto final.

Determinación de la concentración de hierro (II) en las muestras.

Se colocaron 25 mL de agua destilada en un erlenmeyer, se añadieron 5 mL de solución Z-R y se colocaron con exactitud entre 0,5 a 1 mL de muestra según la cantidad de hierro presente en la muestra. Se tituló con una solución de KMnO_4 aproximadamente 0,01 N la cual se preparó diluyendo 1:10 a la solución madre valorada anteriormente hasta aparición de la tonalidad rosada característica permanente.

$$\text{Cálculos:} \quad \text{g.L}^{-1} \text{ Fe(II)} = (\text{N}_{\text{KMnO}_4} \times \text{V}_{\text{KMnO}_4}) / \text{V}_{\text{muestra}} \times 55,8$$

Espectrofotometría de absorción atómica

El procedimiento utilizado en este trabajo para determinar la concentración de metales en solución se basó en la construcción de curvas de calibración a partir de soluciones sintéticas. Se utilizó en todas las determinaciones un Espectrofotómetro de Absorción Atómica METROLAB 250A. El caudal de aspiración fue ajustado en 3 mL.min⁻¹. Todas las lecturas se realizaron a una altura de observación en la llama de 10 mm aproximadamente.

Determinación de cobre

Selección de escala: Las condiciones operacionales e instrumentales óptimas fueron las siguientes:

Longitud de onda (nm)	327,4
Corriente de lámpara	10 mA
Nº ranura monocromador	R = 1
Tipo de llama	aire-acetileno
Caudales: comburente	9,40
combustible	1,41
Sensibilidad	0,14 ppm
Rango	5-25 ppm

Preparación de patrones: Solución madre de 2000 ppm de cobre (Titrisol Merck): Este patrón fue preparado a partir del contenido de una ampolla (1 g de cobre) disuelto en 5 mL de HCl concentrado y llevado a un volumen de 500 mL con agua bidestilada.

Serie patrón: Se preparó una solución patrón de 100 ppm diluyendo 5 mL de la solución madre de 2000 ppm en agua bidestilada en matraz de 100 mL. Luego se preparó una

serie de patrones tomando los volúmenes indicados en la Tabla 6, a partir de la solución patrón de 100 ppm y adicionando 0,5 mL de HCl concentrado a cada matraz de 100 mL. *Curva de calibración:* Con los patrones preparados y luego de optimizar las condiciones de lectura se procedió a determinar el contenido de cobre. En la Figura 1 se presenta un ejemplo de los resultados obtenidos.

Tabla 6. Serie patrón de cobre

Patrón N°	Vol. a tomar (mL)	mg.L ⁻¹ Cu
1	0	0
2	5	5
3	10	10
4	15	15
5	20	20
6	25	25

Se observa que los valores de concentración de los patrones ajustan adecuadamente a una recta cuando son graficados en función de la absorbancia.

Figura 1. Curva de calibración para la determinación de cobre por AA

Interferencias: La determinación de cobre se realiza por aspiración directa de la muestra en la llama aire-acetileno ya que se comprobó la ausencia de interferencias químicas salvo para relaciones de Fe/Cu altas. Este efecto puede minimizarse usando una llama de aire-acetileno oxidante o llama de óxido nitroso-acetileno.

Determinación de cinc

Selección de escala: Las condiciones operacionales e instrumentales óptimas son las siguientes:

Longitud de onda (nm)	214,3
Corriente de lámpara	7 mA
Nº ranura monocromador	R = 1
Tipo de llama	aire-acetileno
Caudales: comburente	9,40
combustible	1,41
Sensibilidad	0,2 ppm
Rango	0,4-2 ppm

Preparación de patrones: Solución madre de 2000 ppm de cinc (Titrisol Merck): Este patrón fue preparado a partir del contenido de una ampolla (1,0000 g de Zn) disuelto en 20 mL de HCl concentrado y llevado a un volumen de 500 mL con agua bidestilada.

Serie patrón: Se preparó una solución patrón de 100 ppm en cinc diluyendo de 5 mL de la solución madre de 2000 ppm en agua bidestilada en matraz de 100 mL. Luego se preparó una serie de patrones tomando los volúmenes indicados en la Tabla 7 a partir de la solución patrón de 100 ppm y adicionando 0,5 mL de HCl concentrado a cada matraz de 100 mL.

Tabla 7. Serie patrón de cinc

Patrón Nº	Vol. a tomar (mL)	mg.L ⁻¹ Zn
1	0,0	0,0
2	0,4	0,4
3	1,0	1,0
4	1,5	1,5
5	2,0	2,0

Curva de calibración: Con los patrones preparados y luego de optimizar las condiciones de lectura se procedió a determinar el contenido de cinc. La Figura 2 presenta un ejemplo de los resultados obtenidos donde se observa que los valores de concentración de los patrones ajustan adecuadamente a una recta cuando son graficados en función de sus respectivas absorbancias.

Figura 2. Curva de calibración para la determinación de cinc por AA

Interferencias: se comprobó la ausencia de interferencias químicas salvo para relaciones de Fe/Zn altas. Este efecto puede minimizarse usando una llama de aire-acetileno oxidante o llama de óxido nitroso-acetileno.

ANEXO III

Caracterización microscópica de los cultivos

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido LEO EVO 40 XVP, con detector de electrones secundarios marca ENGLAND. De cada muestra, se tomaron 2 especímenes para microscopía electrónica de barrido, uno más diluido y el otro más concentrado. Los distintos especímenes fueron dispersados sobre un cubreobjetos con poli-lisina y sometidos a una fijación con glutaraldehído 2,5 % en buffer fosfato de Sorensen (pH=7,2) a temperatura ambiente por una hora; se lavaron con el mismo buffer y se deshidrataron con acetona en concentraciones crecientes desde 25-100 % hasta 3 veces durante 10 min. Se secaron por punto crítico con un equipo Polaron (England) y se fijaron a los porta muestras para SEM. Posteriormente se metalizaron con oro en un equipo para pulverizar marca Pelco 91000. El espesor de la capa de oro depositada fue de 250 Å aproximadamente.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se realizó la caracterización ultraestructural de los cultivos utilizando microscopía electrónica de transmisión (TEM). De cada muestra, se tomaron imágenes representativas a distintas magnificaciones. El equipo utilizado fue un Microscopio Electrónico de Transmisión, marca JEOL 100 CXII (Tokio, Japón, 1983). Los cortes delgados se realizaron con el ultra-micrótopo LKB con cuchilla de diamante.

Las muestras se fijaron con glutaraldehído 2,5 % en buffer fosfato de Sorensen con pH igual a 7,2, por una hora. Se lavaron con el mismo buffer tres veces por una hora y luego se realizó una segunda fijación con tetróxido de osmio al 2 %, por una hora. Las muestras se deshidrataron con acetona en concentraciones crecientes desde 25 a 100% hasta tres veces por 10 min cada paso. Se infiltró con resina Spurr de baja densidad embebiendo por pasos con soluciones de concentración acetona/resina de las siguientes proporciones acetona/resina de 3/1; 1/1; 1/3 y resina pura. Luego se polimerizó en estufa durante toda la noche a 70 °C. Todos los pasos se realizaron centrifugando con una microcentrífuga marca Beckman a 9000 rpm.

Se realizaron las secciones ultrafinas con un ultramicrotomo LKB con cuchilla de diamante y se colocaron en grillas de cobre de 200 mesh. Se contrastaron con acetato de uranilo (40 min) y citrato de plomo (20 min). Se observaron en el microscopio de transmisión a 80KV. Se utilizaron películas marca Kodak SO 163 para registrar las micrografías.

Microscopía de fuerza atómica y epi-fluorescencia (AFM-EFM)

Los ensayos realizados utilizando estas microscopías fueron realizados en el laboratorio del Dr. Wolfgang Sand, Biofilm Center de la Universidad de Duisburg-Essen, Alemania. Se utilizó un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) NanoWizar ®II (JPK Instrument, Alemania) con una estación para la visualización del material marca Biomaterial™ adosada al software para la adquisición de datos, procesamiento e interpretación de las imágenes marca JPK SPM. Todas las mediciones fueron llevadas a cabo en medio líquido, usando cantilevers sin cobertura (μ MASH® CSC38 B, constante típica de resorte=0,03 N/m, frecuencia de resonancia 10 kHz). Las imágenes de AFM fueron obtenidas a las condiciones de voltaje y velocidad lineal de barrido de 0,75V y 0,8 Hz, respectivamente.

El Microscopio de Epifluorescencia (EFM), usado para obtener las imágenes de las muestras teñidas con DAPI, fue un equipo marca Zeiss® AxioImager A1m, equipado con lámpara de vapor de mercurio HBO 100, con filtros 49-10 y objetivos de inmersión en aceite y de aire 20-100X (Zeiss® EC plan Neofluar 440480/9903 y EC epiplan Neofluar 422393/9900) y una cámara digital (Zeiss®, AxioCam MRm). El portamuestra está diseñado para combinar la imagen que se examina por AFM, con la que se toma por EFM con una precisión de ($\pm 5 \mu\text{m}$) (Mangold y col., 2008). Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa para almacenar y procesar datos Zeiss AxioVert-Software®.

Como paso previo a la observación con los microscopios de fuerza atómica o epi-fluorescencia, las muestras debieron ser fijadas y teñidas con DAPI. Para ello, se limpiaron los portaobjetos de vidrio por sonicación (Bandelin®, Sonorex RX 510-H). Posteriormente los vidrios se lavaron en una solución de detergente Mucosol® (2% v/v), se enjuagaron con agua deionizada, se dejaron escurrir y se almacenaron en metanol por 1 min, para ser evaporados en atmósfera de nitrógeno hasta sequedad y guardados

convenientemente. Sobre los portaobjetos se colocó 15 μ L de poli-L-lisina y se dejó evaporar en ambiente limpio y seco para evitar depósitos de polvo u otras partículas. Sobre la película de poli-L-lisina, se colocó una suspensión de microorganismos provenientes de un flóculo obtenido por centrifugación de una alícuota del medio de cultivo a analizar resuspendido en 100 μ L de medio basal. La tinción con DAPI se realizó sobre las muestras fijadas en poli-L-lisina agregando una gota de solución de colorante DAPI (0,01 %) conteniendo formaldehído (2 %), dejando incubar por 5 min y lavando posteriormente con 1 mL de PBS y mantenidas en solución de sales basales (Mackintosh, 1978). Todas las muestras fueron visualizadas AFM y EFM en líquido.

ANEXO IV

Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Se describen a continuación los protocolos de FISH utilizados en el presente trabajo experimental.

Preparación de portaobjetos. Los ensayos de hibridación se realizaron sobre portaobjetos de vidrio, recubiertos con una fina capa de gelatina. La película se obtuvo después de sumergir los vidrios en una suspensión acuosa de gelatina y alumbre de plomo disueltos durante 10 s a 70 °C.

Obtención y lavado de la suspensión celular. Se lavaron las células repetidas veces con agua destilada estéril al pH de la muestra y luego con PBS 1X pH=7,0 descartando el sobrenadante por centrifugación a 5000 g durante 15 min. Finalmente, se resuspendieron las células en 0,5 mL del buffer, ajustando la concentración de bacterias en la suspensión, a valores de $10^8 - 10^9$ cel.mL⁻¹. Se extremaron los cuidados al lavar las células porque procedían de muestras naturales y/o cultivos de enriquecimiento con pH muy bajo y con gran cantidad de metales pesados.

Fijación de las células. Se agregaron 3 vol. del fijador frío (paraformaldehído al 4 % en PBS) a 1 vol. de muestra y se incubaron a 4 °C durante 2h agitando periódicamente los tubos. Se eliminó el fijador por sucesivos lavados con PBS1X frío y se centrifugó a 5000 g por 15 minutos. Las células se resuspendieron en PBS 1 X de manera que la concentración celular sea del orden de 10^8-10^9 cel.mL⁻¹. Se agregó un volumen de etanol frío y se mezcló.

Inmovilización y deshidratación. Se colocó 12 µL de muestra previamente fijada en cada área del portaobjetos. Se dejaron secar al aire y se deshidrataron durante 3 min por sucesivas inmersiones en tres soluciones de etanol (50 %, 70 % y 98 %). Se dejaron secar totalmente, inicialmente a temperatura ambiente y luego 15 min a 46 °C.

Hibridación y lavado (en oscuridad). Se vertió la mezcla de hibridación sobre el preparado y se colocó el portaobjeto en la cámara húmeda precalentada durante media

hora a 46 °C. Las muestras se dejaron hibridar en el horno de hibridación durante 2 h a 46 °C. Se enjuagaron con buffer de lavado (BL) precalentado a 48 °C y se incubaron a esa temperatura por 20 min. Finalmente, se enjuagaron con agua fría y se dejaron secar al aire.

Tinción con DAPI. Los portaobjetos con la muestra hibridada se cubrieron con 5 µL de DAPI 0,5 µg.mL⁻¹ (o 1 µg.mL⁻¹). Se incubaron de 3 a 5 min a temperatura ambiente. Se lavaron varias veces con etanol 80 %, enjuagaron con agua y dejaron secar al aire al lado del mechero. Se cubrió el portaobjeto con solución anti-desvanescente y cubreobjetos. Se guardaron en la heladera y observaron al microscopio preferentemente 12 h después.

Preparación de reactivos y sondas.

Suspensión de gelatina para portaobjetos. Se pesaron 55 mg de gelatina y 5 mg de alambre de plomo y se disolvieron en 50 mL de agua destilada a 70 °C.

Solución fijadora (PFA 4 %). Se midieron los volúmenes indicados en la Tabla 8 de acuerdo al volumen de fijador requerido. Se calentó agua bidestilada a 60 °C, se agregó PFA y una gota de NaOH 2M hasta lograr disolver completamente al paraformaldehído. Se retiró del calor, se agregó PBS 3X y se llevó pH a 7,2 con HCl 1:20. La solución se filtró por membrana de 0,2 µm y se mantuvo a 4 °C. Este reactivo debe ser preparado en el momento de ser usado.

Tabla 8. Solución fijadora (PFA 4 %)

Vol final (mL)	5	10	30
H₂O (mL)	3,2	6,7	20,0
PFA (g)	0,2	0,4	1,2
PBS 3X (mL)	1,6	3,3	10,0

Buffer de Hibridación (BH). Se preparó el buffer para un volumen final de 2 mL, de acuerdo a la sonda que se quisiera hibridar, como se detalla en el siguiente cuadro.

Tabla 9. Buffer de hibridación

	TF	THC	LF	ATT	NON	Arch915	SLbus	Fer656	Cc final
% Formamida	20	25	35	40	35	20	20	25	
NaCl (5M)	360	360	360	360	360	360	360	360	900 mM
Tris HCl	40	40	40	40	40	40	40	40	20 mM
(1M; pH 7,4)									
Formamida	400	500	700	800	700	400	400	400	
Agua	1200	1100	900	800	900	1200	1200	1100	
SDS (20%)	1	1	1	1	1	1	1	1	

Mezcla de hibridación. Se preparó la mezcla de hibridación con la siguiente relación para cada muestra (pocillo): 8 µL de B.H. más 1 µL de sonda (25 ng/µL).

Buffer de Lavado (BL). Se preparó el BL para un volumen final de 50 mL, de acuerdo a la sonda que se quiere hibridar, como se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10. Buffer de lavado

	TF	THC	LF	ATT	NON	Arch915	SLbus	Fer656
% Formamida	20	25	35	40	35	20	20	25
Tris HCl (1M pH 7,4)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
NaCl (5M)	2150	1490	700	460	700	2150	2150	1490
EDTA (0.5M pH8)	500	500	500	500	500	500	500	500
Agua	Cantidad suficiente para completar 50 mL de volumen final							
SDS	25	25	25	25	25	25	25	25

Sondas. El grupo de sondas específicas utilizadas para las reacciones de hibridación, se detallan en la Tabla 11. Las mismas fueron preparadas con el fluorocromo Cy3 y purificadas por cromatografía de alta presión (HPLC).

Tabla 11. Sondas específicas utilizadas en las reacciones de hibridación

Sonda	Secuencia	Especificidad	Referencia
EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Dominio <i>Eubacteria</i>	Amann y col., 1990
NON338	ACATCCTACGGGAGGC	Control negativo	Wallner y col., 1993
LEP636	CCAGCCTGCCGAGTCTCTT	<i>Leptospirillum</i> <i>ferrooxidans</i>	González Toril y col., 2003
THIO1	GCGCTTTCTGGGGTC TGC	Genero <i>Acidithiobacillus</i>	Stoffels, Datos no publicados.
SUL 228	TAATGGGCCGCGAGCTCCC	<i>Sulfobacillus</i> <i>thermosulfidooxidans</i>	Bond y Bandfield, 2001
ACM1160	CCTCCGAATTA ACTCCGG	<i>Acidimicrobium spp.</i>	González Toril y col., 2003
ARCH915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Dominio <i>Archaea</i>	Amann y col., 1995
SLbus	ACCTCCTCTCCGCGAGTC	Género <i>Sulfolobus</i>	González Toril, Datos no publicados
FER 656	CGTTTAACCTCACCGATC	<i>Ferroplasma spp.</i>	Edwards y col., 2000

ANEXO V

Extracción, amplificación por PCT y electroforesis de fragmentos de ADN

Extracción de ADN

Para extraer el ADN de las muestras provenientes de los cultivos de enriquecimiento, se utilizó la técnica de extracción por fenol modificada (Rawlings, 1995) según los protocolos que se describen a continuación.

Preparación de la masa celular

Se partió de un cultivo con abundante cantidad de células y se realizó el recuento celular para estimar la biomasa. Se filtró con papel banda azul para retener los sólidos. Se centrifugó por 5 min a 13000 rpm. Se realizaron dos o tres lavados con agua pH=1,5-2,0 para eliminar hierro, volviendo a centrifugar entre lavado y lavado. Se resuspendieron las células en 1,0 mL de buffer TE pH=8,0 en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Se almacenaron hasta su utilización a -20 °C.

Extracción del ADN

Se retiró del freezer el tubo Eppendorf, proveniente de la etapa anterior, y se centrifugaron las células por 5 min a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 250 µL de TE pH=8,0 conteniendo 10 % de sacarosa, se llevó el tubo Eppendorf 5 min a -20 °C. Se adicionaron 50 µL de proteasa K (Promega) y se incubó por 60 min a 37 °C. Se agregaron 50 µL de SDS 10%. Se incubó durante 30 min a 50 °C. Se adicionaron 35 µL acetato de sodio 3M pH=3,4 y 350 µL Fenol-Tris. Se centrifugó 15 min a 13500 rpm y se extrajo la fase acuosa con 100 µL de cloroformo. Se centrifugó por 15 min a 13500 rpm y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. Se repitió la extracción con 100 µL de cloroformo. Se centrifugó 15 min a 13500 rpm y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf. Se midió el volumen y se agregó la misma cantidad de isopropanol frío para precipitar el ADN. Se centrifugó 15 min a 13500 rpm y se descartó con cuidado el sobrenadante. Se lavó con etanol 70 % frío. Se centrifugó 15 min a 13500 rpm, se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se secó. Se resuspendió en un volumen de 20 a 50 µL de agua bidestilada en función de la cantidad de ADN. Se dejó 24 hs a -20 °C para amplificar.

Preparación de reactivos

Buffer TE pH=8,0. Para 100 mL de mezcla: se pesaron 121,0 mg de TRIS y 37,23 mg de EDTA, se reguló el pH hasta un valor final de 8 con solución concentrada de HCl y se llevó a volumen con agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min.

- 10,0 mM TRIS (tris-hidroximetilaminometano, $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)
- 1,0 mM EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético dihidratada, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Acetato de sodio 3,0 M pH=5,4. Se mezclaron 4 volúmenes de acetato de sodio 5,0 M con 1 volumen de ácido acético 10,0 M.

- 5,0 M acetato de sodio (NaCOOCH_3)
- 10,0 M ácido acético (HCOOCH_3)

Fenol-TRIS. Se midieron aproximadamente 10,0 mL de TRIS sólido y se disolvieron en 120,0 mL de agua destilada. Se agregó 70,0 mL de fenol fundido a 41 °C. Se mezclaron vigorosamente y se esperó a que las fases se separaran. Se conservó la solución en frío para retardar la oxidación del fenol. Para la extracción y purificación de ADN se usó la fase fenólica.

- TRIS sólido
- Fenol sólido ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)

Buffer TE-Sacarosa (10 %) pH=8,0. Para 100 mL de mezcla se pesaron 121,0 mg de TRIS y 37,2 mg de EDTA; se reguló el pH hasta un valor final de 8 con solución concentrada de HCl. Se agregaron 10,0 g de sacarosa y se llevó a volumen con agua destilada. Se esterilizó por filtración.

- 10,0 mM TRIS
- 1,0 mM EDTA
- Sacarosa sólida ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)

Proteasa K. Se preparó una solución de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de proteasa K utilizando como disolvente una solución de 50,0 mM TRIS en HCl a pH=8,0 y 10,0 mM de CaCl_2 . Se guardó a -20 °C.

Electroforesis

Para realizar la corrida electroforética se preparó un gel de agarosa (0,8 %) en buffer TBE. Se sembraron aproximadamente de 7 a 10 μL de ADN habiéndolo mezclado previamente con 2 μL de una solución de colorante Azul de Coomassie. Se realizó la electroforesis utilizando como parámetros para efectuar la corrida, un potencial de 90 V, una corriente de 2 A y un tiempo de 60 min. Finalizada la corrida electroforética, se reveló el gel en solución de bromuro de etidio ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) durante 30 min, se lavó con agua destilada por 10 minutos y se observaron las bandas de ADN en un transiluminador equipado con luz ultravioleta.

Preparación de Reactivos

Buffer TBE 1X pH=8,0. Se pesaron 11,8 g de TRIS, 5,50 g de ácido bórico y 0,75 g de EDTA disolviendo los reactivos en 800 mL de agua destilada, y se llevó el volumen a 1L.

- 89,0 mM TRIS
- 89,0 mM ácido bórico (H_3BO_3)
- 2,0 mM EDTA

Buffer TBE 5X pH=8,0. Se pesaron 54,0 g de TRIS, 27,5 g de ácido bórico y 3,7 g de EDTA; se disolvieron los reactivos en 800 mL de agua destilada y se llevó a 1 L.

- 445mM TRIS
- 445 mM ácido bórico
- 10,0 mM EDTA

Síntesis de moléculas de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se preparó la solución PRE-MIX según se indica en la Tabla 12.

Tabla 12. Solución PRE-MIX

PRE-MIX		(V _{final} =100 µL)		
		µL		µL
Cebador R	5µM	10,0	Albúmina	2,0
Cebador F	5µM	10,0	H ₂ O MilliQ	47,6
dNTP*		8,0	GoTaq [®] DNA**	0,2
Buffer 5X		20,0		
Molde		Volumen		
AND		2,0 µL		

*dNTP: mezcla de cuatro desoxirribonucleótidostrifosfato dATP, dCTP, dGTP y dTTP.

Se consideraron los controles positivo y negativo. Las reacciones de amplificación se realizaron en termocicladores, Mastercycler Eppendorf, según el programa descrito en la Tabla 13.

Tabla 13. Programa de amplificación en el termociclador

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Cantidad de Ciclos	Sub-programa
1	94*	4 min	1	5
2a	94*	30 s	10	6
	62**	45 s	10	
	72***	1 min	10	
2b	94*	30 s	25	7
	57**	45 s	25	
	72***	1 min	25	
3	72***	10 min	1	8

Etapas: * desnaturalización; ** anillado; ***extensión.

Preparación de reactivos y cebadores

A los efectos de realizar las reacciones de amplificación (PCR) de fragmentos del gen que codifica el ácido ribonucleótido ribosomal de la subunidad 16S (ARNr 16S), se utilizaron cebadores específicos para arqueas y eubacterias con clamp GC en un extremo 5'.

Tabla 14. Cebadores utilizados en la amplificación

Cebador específico^a	Sitio Blanco^b	Secuencia (5' a 3')	Especificidad	Referencia
341F-GC ^c	341-357	CCTACGGGAGGCAGCAG	mayoría de las bacterias	Muyzer y col., 1996
907RM	907-926	CCGTCAATTCMTTGTGAGTTT	mayoría de los organismos conocidos	Muyzer y col., 1996
ARC344F-GC ^c	344-363	ACGGGGYGCAGCAGGCGCGA	mayoría de las arqueas	Raskin y col., 1994
ARC915R	915-944	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	mayoría de las arqueas	Stahl y Amann, 1991

^a F (directo) y R (reverso), indican la orientación de los cebadores en relación al rRNA.

^b *Escherichia coli* numeración de Brosius y col., 1981.

^c La secuencia GC es 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC-3'.

Electroforesis para verificar presencia de ADN amplificado

Se preparó un gel de agarosa (1,2 %) pesando 0,84 g de agarosa por cada 70 mL de buffer TBE 1X. Se sembraron las muestras y un marcador de peso molecular apropiado para verificar el tamaño de los fragmentos amplificados. Se realizó la electroforesis a 90V y 2A durante 60 min. Se tiñó y reveló el gel según el protocolo detallado más arriba.

ANEXO VI

Electroforesis en gel desnaturalizante en gradiente de urea-formamida (DGGE)

La DGGE fue realizada en un equipo CBS Scientific Company Inc. Modelo 2401, de acuerdo a modificaciones de la técnica base descripta por Muyzer y col., 1996.

Los productos amplificados por PCR, utilizando cebadores con clamp CG, fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 6 % con gradiente lineal desnaturalizante. Los geles se prepararon a partir de una solución stock de acrilamida (acrilamida-N, N'-metilen bis acrilamida, 37,5:1) y con las cantidades adecuadas de urea y formamida para conseguir el gradiente adecuado (100 % desnaturalizante corresponde a la mezcla de urea 7M y formamida 40 %). La electroforesis se realizó en buffer TAE 1X precalentado (60 °C) y se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 16 h para la corrida. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó durante 1 h en bromuro de etidio o SYBR-Green a fin de evidenciar los resultados obtenidos.

Preparación de Reactivos

Buffer TAE 1X pH=7,4. Se pesaron 5,12 g de TRIS, 3,28 g de ácido acético y 0,37 g de EDTA; se disolvieron los reactivos en 800 mL de agua destilada. Se reguló el pH hasta el valor requerido y se llevó a 1 L.

- 40 mM TRIS
- 40 mM acetato de sodio
- 1,0 mM EDTA

Buffer TAE 20X pH=7,4. Se pesaron 102,4 g de TRIS, 65,6 g de ácido acético y 7,4 g de EDTA; se disolvieron los reactivos en 800 mL de agua destilada. Se ajustó el pH hasta el valor requerido y se llevó a 1 L.

- 800 mM TRIS
- 800 mM ácido acético
- 20,0 mM EDTA
-

Soluciones Acrilamida/Urea-formamida para formar el gradiente desnaturalizante

Solución A: 6% Acrilamida/ 0% Urea-formamida

- 30 g de acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$) **
- 0,81 g de bisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) agente estructurante
- 12,5 mL de buffer TAE 20X
- Agua bidestilada estéril hasta completar 500 mL

Las soluciones se almacenaron en ambiente oscuro a 4 °C hasta ser utilizadas.

** La acrilamida en polvo y en solución es neurotóxica.

Solución B: 6 % Acrilamida/ 80 % Urea-formamida

- 30 g de acrilamida
- 0,81 g de bisacilamida
- 12,5 mL de buffer TAE 20X
- 168 g de urea ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$)
- 160 mL formamida deionizada (HCONH_2)
- Agua bidestilada estéril hasta completar 500 mL

Las soluciones se almacenaron en ambiente oscuro a 4 °C hasta ser utilizadas.

Solución 10 % persulfato de amonio (PSA). Se pesaron 0,1 g de PSA ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), se mezclaron con 1 mL de agua bidestilada estéril y se guardaron en ambiente oscuro y a 4 °C. El persulfato aporta radicales libres para iniciar la polimerización.

Solución N,N,N',N'-tetrametiletildiamino (TEMED). Esta solución stock de TEMED ($(\text{CH}_3)_2\text{CHNHCH}(\text{CH}_3)_2$) se guarda en ambiente oscuro y a 4 °C. Se utiliza como catalizador en la polimerización del gel.

Protocolos para la preparación de geles

Los vidrios y portageles se limpiaron con agua y etanol y se armaron de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Se prepararon 2 soluciones de igual volumen y de concentración acorde a los gradientes que se quieran ensayar, se añadieron TEMED y PSA a cada solución y se homogeneizaron (Tabla 15).

Tabla 15. Preparación de geles DGGE

Reactivos	Gradiente		Gradiente	
	30 %	70 %	40 %	70 %
Solución A (0%)	7,19 mL	1,44 mL	5,25 mL	1,44 mL
Solución B (80%)	4,31 mL	10,06 mL	5,25 mL	10,06 mL
TEMED	16,4 µL	16,4 µL	16,4 µL	16,4 µL
PSA	72,0 µL	72,0 µL	72,0 µL	72,0 µL

Se colocaron las soluciones que constituirán el gradiente desnaturalizante en el dispositivo de premezcla y se vertió el líquido en el portagel. Se dejaron en reposo alrededor de 120 min hasta lograr la solidificación del gel.

Protocolos para la DGGE de DNA amplificado

Se sumergió el marco con el gel en el contenedor del baño termostatzado a 60 °C conteniendo buffer TAE 1x y se ajustó el volumen de tampón hasta el nivel de los pocillos. Se conectó el termostato para pre-correr el gel durante unos 30 minutos a 60 voltios (50 mA). Se añadió la solución de carga del gel a las muestras (un volumen final <10 µL puede originar bandas muy finas). Se desarrollaron las corridas de DGGE durante unas 16 h a 100 V (50 mA). Finalizada la electroforesis, se tiñó el gel durante 20 a 30 min en 250 mL de TAE 1x, conteniendo 0,5 µg.mL⁻¹ de bromuro de etidio o SYBR-green. Se examinó el gel bajo luz ultravioleta (254 nm).

Extracción del DNA amplificado a partir de las bandas de DGGE

La extracción del ADN a partir de las bandas obtenidas por DGGE permitió obtener información más precisa acerca de los microorganismos que componían la muestra estudiada. Cada banda fue cuidadosamente cortada sobre el transiluminador UV. La porción escindida fue depositada en un Eppendorf, triturada para facilitar la difusión de las moléculas de ADN y sumergida en 50 µL de buffer TE pH=7,0 manteniéndose 2 a 3 días en refrigerador a 4 °C. Si la elusión no fue suficiente, se dejó una noche incubando a 37 °C (González Toril y col., 2006). Como la cantidad de ADN

a partir de la banda eluída no fue suficiente para la secuenciación de la misma, una nueva amplificación por PCR debió ser realizada bajo las mismas condiciones detalladas. Para asegurarse que el ADN extraído correspondía a la misma banda que le dio origen, se realizó una nueva DGGE. Luego se procedió a realizar la amplificación del ADN extraído de cada banda de la primera DGGE con los mismos cebadores pero sin la secuencia rica en GC en el extremo 5'.

ANEXO VII

Clonación y secuenciación de las bandas de ADN a partir del gel DGGE

Para obtener la secuencia de bases que componen cada fragmento de ADN, fue necesario en primer lugar purificar el ADN y luego clonar esos fragmentos según se detallará a continuación.

Purificación de los fragmentos de ADN amplificado

Para obtener los fragmentos de ADN libres de cebadores, restos de nucleótidos u otros subproductos indeseables producidos durante la reacción de PCR, se utilizó un kit para purificación de ADN de QIAGEN denominado QIAquick® PCR purification KIT (catálogo 28104). Se siguió el protocolo estipulado por el fabricante para ser usado en una microcentrífuga. El ADN purificado fue eluido en un volumen final de 32 µL y mantenido a -20 °C hasta su utilización.

Clonación de los fragmentos de ADN

Para obtener los clones con los fragmentos de ADN para ser secuenciados, fue necesario introducir ese fragmento de ADN en un vector de clonación y transformar un cultivo de células de *E. coli* competentes, de acuerdo al protocolo que se detallará a continuación.

Protocolo para obtener un cultivo competente de células de E. coli DH5α

Se inocularon 100 mL de medio LB con 1 mL de inóculo de *E. coli* DH5α y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Se diluyó 1 mL del cultivo anterior en 100 mL de medio LB fresco y se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600 nm. Las células se fraccionaron en alícuotas de 1 mL. Se centrifugaron 2 min a 4000 rpm y resuspendieron en 0,5 mL de solución *PI* para iniciar el proceso de permeación de la pared y membrana celular. Se centrifugaron 2 min a 4000 rpm, se volvieron a suspender en 0,5 mL de *PI* y se incubó 15 min en hielo; luego se centrifugó 2 min a 4000 rpm. Se resuspendieron en 0,1 mL de solución de *PII* para profundizar el proceso

de permeación. Se mantuvo en hielo entre 30 a 60 min y se guardó en glicerol a -80°C hasta su utilización.

Preparación de Reactivos

Solución stock IPTG (0,1M). Se pesaron 1,2 g de IPTG y se disolvieron en un volumen final de 50,0 mL de agua destilada. Se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C .

Solución de X-Gal (2 mL). Se pesaron 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-idolil- β -D-galactósido. Se disolvieron en 2,0 mL de N-N-dimetilformamida. Se cubrió con papel de aluminio y se almacenó a -20°C .

Medio LB (1L). Se pesaron 10,0 g de tristona, 5,0 g de extracto de levadura y 5,0 g de NaCl. Se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH a 7,0 con NaOH. Se esterilizó en autoclave.

Placas con medio LB y Ampicilina. Se agregaron 15,0 g de agar a 1 L de medio LB. Se esterilizó en autoclave. Se permitió que el medio se enfríe a 50°C antes de agregar la ampicilina a una concentración final de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$. Se vertieron 30-35 mL de medio dentro de las placas de Petri de 85 mm de diámetro. Se dejó solidificar el agar. Las placas se almacenaron a 4°C .

Placas con medio LB y Ampicilina/IPTG/X-Gal. Se prepararon las placas de Petri con ampicilina, tal como se describió arriba. Luego se suplementaron con 0,5mM de IPTG y $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de X-Gal. Se esparció en la placa. Alternativamente, se agregaron 100 μL de 100 mM IPTG y 20 μL de $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de X-Gal sobre la placa de Petri con medio LB ampicilina solidificado y se permitió que se adsorba durante 30 min previo a su utilización.

Medio de cultivo SOC (100mL). Se pesaron 2,0 g de triptona y 0,5 g de extracto de levadura. Se disolvieron las drogas en 97 mL de agua destilada, se agregaron 1 mL de NaCl 1M, 0,25 mL de KCl 1M, 1 mL de solución stock de Mg^{2+} 2M y 1 mL de glucosa 2M (habiendo sido estas dos soluciones esterilizadas previamente por filtración). Se filtró el medio por membrana $0,2\text{ }\mu\text{m}$. El pH final se ajustó a 7,0.

Solución stock de Mg^{2+} 2,0M. Se pesaron 20,33 g de $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 24,65 g de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Se agregó AD hasta 1 L. Se esterilizó por filtración.

Solución de PI (MOPS 10 mM pH=7 + KCl 10 mM). Para 50 mL finales de solución, se pesaron 0,1045 g de MOPS (ácido morfolin-propanosulfónico) y midieron 0,5 mL de una solución stock de KCl 1 M.

Solución de PII: MOPS (100 mM pH=7 + KCl 10 mM + CaCl₂ 1M). Para 50 mL finales de solución, se pesaron 1,045 g de MOPS y 5,5 g de CaCl₂ y se midieron 0,5 mL de una solución stock de KCl 1M.

El pH de ambas soluciones de permeación se ajustó a 7,0 con KOH y se esterilizó en autoclave 20 min a 121 °C.

Reacción de ligación del Vector - DNA

Para clonar los productos PCR obtenidos, se utilizó como vector de clonación un plásmido provisto por un producto comercial denominado pGEM[®] T-Easy Vector systems de marca Promega. El fabricante provee el vector cortado con la enzima EcoRV y con la adición de un nucleótido de timidina a ambos terminales 3'. Este procedimiento mejora sustancialmente la eficiencia de ligazón del inserto y evita la recircularización del plásmido sobre sí mismo (Mezei y Store, 1994; Robles y Doers, 1994).

Una gran cantidad de copias del vector pGEM[®] T-Easy contiene los sitios de los promotores T7 y SP6 para la RNA polimerasa flanqueando un sitio múltiple de clonado (MSC) dentro de la región codificante del α -péptido de la enzima β -galactosidasa. Cuando el inserto de DNA se ubica correctamente se provoca la inactivación de la expresión de la β -galactosidasa y las colonias de los clones recombinantes desarrolladas sobre placas pueden ser fácilmente identificadas por el color blanco.

Figura 3. Secuencias del promotor y del sitio de múltiple clonado

Para permitir la selección de los clones frente a cualquier otra fuente de contaminación por parte de cepas de *E. coli*, el plásmido cuenta con el gen de resistencia a ampicilina. Adicionalmente, el sitio múltiple de clonado (MSC) de los dos vectores incluye sitios de restricción para diversas enzimas (*Eco*RI, *Bst*Z, *Not* I, etc.) ubicados de manera conveniente que permiten que sean utilizados para diversas estrategias en pos de obtener la secuenciación o identificación de genes como se muestra en la Figura 3.

El vector pGEM[®] T-Easy es un plásmido de 3018 pares de bases. En la Figura 4 se presenta un esquema del mapa circular del plásmido. Se observa en detalle la interrupción del gen *lacZ* y los promotores T7 y SP6 con los sitios de corte para las correspondientes enzimas y los principales puntos de referencia y su ubicación

Figura 4. Mapa circular del vector pGEM® T-Easy

Protocolo para ligar Vector y DNA

Se prepararon las mezclas indicadas en la Tabla 16 y se incubaron 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C. Concentración del vector: 1,0 µL = 50 ng.

Protocolo de clonación

Se descongelaron las células competentes en hielo. Se adicionaron 125 µL de suspensión de células competentes a 5 µL de mezcla de ligación y se incubaron 1 h en hielo, luego 45-60 segundos a 42 °C y por último 2 min nuevamente en hielo. Se adicionaron 875 µL de SOC a temperatura ambiente. Se incubaron 1 h a 37 °C con agitación (150 rpm); se centrifugaron 2 min a 4000 rpm, se resuspendieron en la última gota y se plaquearon en medio LB-Amp-Iptg-XGal. Se incubaron las placas durante 12h a 37 °C o hasta visualización macroscópica de las colonias y luego se conservaron a 4 °C.

Tabla 16. Mezclas de reacción para el ensayo de clonación

	Muestra (μL)	Control (+) (μL)	Control (-) (μL)
Buffer 2X	2,5	2,5	2,5
Vector	0,5	0,5	0,5
Producto PCR	0,5	-----	-----
Inserto control	-----	1,0	-----
Ligasa DNA T4	0,5	0,5	0,5
Agua destilada	1,0	0,5	1,5

Identificación de colonias transformantes

Identificación macroscópica

Para evaluar las colonias transformantes, se observó su coloración luego de incubar las placas 12 hs a 37° C. Las células que contienen el plásmido sin el inserto expresan la enzima β-Galactosidasa, se identifican por una coloración azul producida por la actividad enzimática frente al sustrato incluido en el medio de cultivo - X-Gal -. Las células que contienen un inserto en el vector interrumpiendo la secuencia del gen *lacZ*, no expresan la enzima β-Galactosidasa y, por lo tanto, no se produce la reacción catalizada por la enzima y las colonias presentan coloración blanca.

Identificación por PCR de las colonias

Se resuspendieron las colonias blancas en 5 μL de medio LB/AMP, luego se tomó 1μL de la suspensión para diluir en 50 μL de H₂O estéril y se incubaron a 100 °C por 15 min. Luego se utilizó 1 μL como molde para la amplificación del inserto por PCR, con los cebadores específicos para arqueas y con los programas de termociclador correspondientes. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia del ADN inserto en los clones.

Secuenciación de ADN

Determinación de la secuencia de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN que fueron clonados e insertos en los plásmidos, se realizó a través de métodos automáticos, basados en la determinación de los deoxinucleótidos que componen las cadenas (Sanger y col., 1977), por el servicio de secuenciación de la empresa MacroGen, Korea. Se utilizó la técnica denominada SES (single extension service) que se basa en la secuenciación de una sola hebra de ADNc a partir del conjunto de cebadores aportados por el cliente. Los análisis se efectuaron con un secuenciador automático 3730xl de 6 canales. Los resultados fueron enviados por la empresa como archivos Abi (electroferogramas) y secuencias nucleotídicas en formato fasta.

Análisis de la secuencia

Se realizó una corrección visual A las secuencias obtenidas con el programa Chromas LITE version 2.01 (Technelysium Pty Ltd, EEUU) con el fin de resolver posibles ambigüedades que pueden surgir de la lectura de los cromatogramas por parte del programa del secuenciador. Posteriormente, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el algoritmo BLAST comparando con la base de datos del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Las comparaciones entre secuencias propias, alineamientos y análisis filogenético fueron realizadas con el programa MEGA 4.0 (Tamura y col., 2007). La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el método de análisis filogenético Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Las distancias entre las secuencias se determinaron utilizando el modelo *Kimura's two-parameter* (Kimura, 1980). Se evaluó la robustez de los árboles filogenéticos obtenidos con un análisis de *bootstrap* utilizando 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

ANEXO VIII

Medios sólidos para aislamiento

Medio 88/Ext.Lev/SAC + Gelrita

Se preparó medio M88 a pH a 2,0. El medio fue esterilizado y posteriormente suplementado con una solución estéril que contenía cantidades apropiadas de extracto de levadura y sacarosa para alcanzar concentraciones de 1,0 y 2,0 g.L⁻¹, respectivamente (Cardona y col., 2001). El agente gelificante Gelrita se agregó en una concentración de 1 % (Takayanagi y col., 1996) al medio líquido caliente, agitando vigorosamente para favorecer la disolución. Obtenida la mezcla homogénea, se vertió en placas de Petri que se mantuvieron en frío para favorecer la solidificación del medio de cultivo. Se sembraron las placas de Petri con un volumen adecuado de muestra; se distribuyó uniformemente el líquido sobre la placa y se dejó incubando a 70 °C hasta obtener crecimiento. El mayor inconveniente durante la incubación es la deshidratación de las placas por la alta temperatura por lo que se sellaron las placas de Petri y se mantuvo una atmósfera húmeda.

Medio 0K suplementado/Gelrita – Método de la doble capa

Como alternativa, y a los efectos de mejorar la eficiencia del crecimiento en medio sólido, se aplicó el método propuesto por Lindstrom y Sehlin (1989). En este método se realiza la siembra en placas que se construyen con dos capas gelificadas superpuestas con diferente concentración de Gelrita: para la capa densa, 0,8 % y para la capa ligera, 0,4 %. Las soluciones de Gelrita y el medio de cultivo utilizado denominado 0K Suplementado (0KSup) se prepararon según se especifica en la Tabla 17.

Se prepararon las soluciones A y B mezclando vigorosamente hasta disolución total del sólido. Posteriormente, las soluciones se esterilizaron durante 20 min. en autoclave a 121 °C y fueron mantenidas a 70 °C hasta su utilización. La solución A fue diluida con igual volumen de una solución precalentada a 70 °C de medio 0KSup (pH=2,0) de concentración doble.

La solución A de Gelrita se mantuvo en agitación continua y se vertió la solución C sobre la primera. Después del mezclado se vertieron aproximadamente 25 mL de la solución en cada placa de Petri.

Tabla 17. Medio sólido utilizado en el método de la doble capa

Solución A Capa densa (0,8%)	Solución B Capa Ligera (0,4%)	Solución C Medio OKSup			
		(g.L ⁻¹)		(g.L ⁻¹)	
1,6g de Gelrita en 100 mL agua destilada.	0,8g de Gelrita en 100 mL agua destilada.	(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0	K ₂ S ₄ O ₆	6,05
		KCl	0,2	NaCl	0,12
		K ₂ HPO ₄	1,0	Casamino ácido	2,00
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0	MgCl ₂	0,76
		Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,028	pH = 2,0	

El gel denso solidificó adquiriendo una apariencia prácticamente transparente. El pH final alcanzado se encontró en el rango 2-2,5. La solución B correspondiente al gel ligero de doble concentración, fue distribuida en tubos de vidrio vertiendo 2,5 mL en cada uno de ellos y luego almacenados a 70 °C hasta su uso. Previo a sembrar sobre la capa densa, se mezcló el gel ligero reservado en tubos con 2,5 mL de solución provenientes de los cultivos de enriquecimiento o de las respectivas diluciones. Una vez solidificadas ambas capas, las placas se sellaron y se incubaron en atmósfera húmeda 70 °C.

ANEXO IX

Ensayos de tolerancia

Los ensayos para evaluar la tolerancia a metales pesados fueron realizados en frascos agitados (150 rpm) y termostatizados (75 °C) inoculados con cultivos enriquecidos en medio OKSup. La variación de biomasa en el tiempo se evaluó mediante la determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 650 nm como se muestra en la curva típica de calibración de la Figura 5. Se prepararon soluciones stock de As^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} ; luego se adicionaron a los sistemas inoculados en rangos de concentraciones entre 0-60 mM, comparables con aquellos citados para *Metallosphaera sedula* (cepa tipo TH2 = ATCC51363 = DSM5348 = IFO (ahora NBRC) 15509 = JCM9185) por Schippers (2006). Los frascos se mantuvieron en agitación durante 48 h. Luego se determinó el porcentaje de inhibición por comparación cuantitativa de la biomasa expuesta a metales tóxicos respecto de la población desarrollada en un medio sin metales pesados.

Figura 5. Curva de calibración típica usada para cuantificar biomasa durante los ensayos de toxicidad realizados con cultivos de LMa.

ANEXO X

Extracción, amplificación, clonación y secuenciación de ADN_r-16S

Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el conjunto de soluciones comerciales que componen el E.Z.N.A.® Soil DNA Kit de Omega-Bio-Tech. Este kit está especialmente formulado para muestras de suelos o ambientes naturales que puedan contener altas concentraciones de metales u otros inhibidores de la Tac-polimerasa.

Amplificación por PCR del ADN_r-16S

La amplificación del ADN extraído se realizó utilizando los cebadores universales para arqueas cuya secuencia y sitio de inicio se describen a continuación:

-25F TCYGGTTGATCCYGCCRG

-1492R TACGGYTACCTTGTTACGACTT

Para la reacción de amplificación, se seleccionó el siguiente programa: 1 ciclo a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de la siguiente secuencia (94 °C por 1 min; 50 °C por 1 min; 72 °C por 3 min) para finalizar con un ciclo a 72 °C por 10 min.

Clonación del ADN_r-16S

Los productos de PCR purificados fueron clonados en el sistema pCR2.1-TOPO TA Cloning kit, (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, EEUU). Los plásmidos con el fragmento de interés fueron propagados en bacterias *E. coli* competentes químicamente.

Secuenciación del ADN_r-16S y clasificación filogenética

Se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado para los fragmentos de 600 pb eluidos del gel de DGGE según se detalló oportunamente.

ANEXO XI

Caracterización mineralógica de los residuos sólidos

Todas las muestras de minerales utilizadas en este trabajo de tesis fueron molidas a tamaño de partículas menores de 74 μm , secadas al aire y se preservaron de la humedad hasta su caracterización mineralógica.

Los residuos sólidos de los diferentes procesos de biolixiviación o biooxidación fueron recolectados por centrifugación y lavados con agua destilada para luego ser secados al aire y preservados para su caracterización.

La composición mineralógica fue evaluada mediante difracción de rayos X, en un difractómetro marca Rigaku modelo DII-Max $\text{CuK}\alpha$ con filtros de níquel. Para ello las muestras de mineral o residuos sólidos fueron nuevamente molidas en mortero de ágata y montadas en los portamuestras adecuados para ser analizadas por difracción de rayos usando radiación $\text{CuK}\alpha$. Los diagramas fueron obtenidos con rotación del goniómetro en el rango de 10° a $70^\circ 2\theta$ por pasos de $0,05^\circ \cdot \text{s}^{-1}$.

Caracterización de compuestos de hierro de baja cristalinidad

Se aplicó una técnica analítica que permitió la disolución selectiva de los precipitados para estudiar los compuestos de hierro poco cristalizados formados durante los ensayos de biodisolución de troilita (Bhatti y col., 1993; Schulze, 1994).

Se pesaron 0,5 g de los residuos sólidos preparados como se describió arriba, y fueron resuspendidos en 20 mL de una solución de oxalato de amonio (OA) 0,2 M $\text{pH}=3,0$. Se agitaron enérgicamente durante 15 min en oscuridad a 22°C . Posteriormente, los sólidos fueron recuperados por centrifugación, secados al aire y analizados por difracción de rayos X. Todos los especímenes fueron escaneados desde 10° a $70^\circ 2\theta$ por pasos de $0,05^\circ \cdot \text{s}^{-1}$.

Un diagrama diferencial de difracción de rayos X (DRXD-OA) fue obtenido por sustracción del patrón de difracción de rayos X, obtenido después de haberse disuelto parte de los precipitados en la solución de oxalato de amonio, respecto del difractograma original total (DRX-Total) obtenido con los residuos de biolixiviación sin tratamiento.

Posteriormente se realizó una disolución más vigorosa sobre los residuos de biolixiviación. Para ellos se resuspendieron 0,5 g de residuos del proceso de biodisolución convenientemente acondicionados en 20 mL de una solución de HCl 5M. Se agitaron enérgicamente durante 15 min en oscuridad a 22 °C. Posteriormente, los sólidos fueron recuperados por centrifugación, secados al aire y analizados por difracción de rayos X. Se obtuvieron los respectivos difractogramas correspondientes al tratamiento y el diferencial (DRX-HCl y DRXD-HCl).