



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

Interacción de una arquea termófila con la superficie mineral y su influencia en la biolixiviación de minerales

Camila Castro

Director: Dr. Edgardo Donati

Año 2016

Este trabajo de Tesis Doctoral es presentado para optar al grado de
Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

Fue realizado en CINDEFI (CCT La Plata-CONICET, UNLP)



Reconocimientos

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por concederme las becas que posibilitaron el desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme utilizar sus instalaciones y equipamiento para la realización de este Trabajo de Tesis Doctoral.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por el financiamiento otorgado que permitió el desarrollo de esta investigación científica.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación Argentina (MINCyT) y al Ministerio Federal para la Educación y la Investigación de la República Federal de Alemania (BMBF), por el financiamiento otorgado que permitió la realización de estancias de investigación para realizar parte de los experimentos de este Trabajo de Tesis Doctoral.

Al Biofilm Centre, Fakultät für Chemie, Universität Duisburg-Essen, Alemania, por permitirme llevar a cabo tres estancias de investigación en sus instalaciones a lo largo de este Trabajo de Tesis Doctoral.

A la Dra. Alejandra Giaveno y a su grupo de investigación pertenecientes al IDEPA (CONICET, UNCo), por gentilmente proveer la cepa *Acidianus* sp. DSM 29038 utilizada en este Trabajo de Tesis Doctoral.

Agradecimientos

A mi director Dr. Edgardo Donati, por la posibilidad de comenzar junto a él mi experiencia en el mundo de la Ciencia y la Investigación. Por guiarme y confiar en mi trabajo. Por darme la oportunidad de viajar, formarme y permitirme trabajar con libertad. Por la paciencia a mis errores y alentarme en todos mis proyectos.

Al Dr. Wolfgang Sand por hacerme sentir cómoda y bienvenida en su grupo del Biofilm Centre de la Universidad de Duisburg-Essen; por su generosidad y la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Mario Vera, por su colaboración, interés y sugerencias. Por transmitirme sus conocimientos, brindarme su comprensión, buena predisposición y ayuda siempre que lo necesité, tanto dentro como fuera del laboratorio. Por hacer mis viajes experiencias mucho más agradables y enriquecedoras.

A la Dra. Alejandra Giaveno, por su buena predisposición a responder mis dudas y problemas con el *Acidianus*. Por la organización y su gran ayuda durante las campañas de muestreo.

A Sören y Ruiyong por su importante colaboración experimental y ayuda en mis luchas con los microscopios; por los buenos momentos en Essen que hicieron mis estadías mucho más gratas.

A mis compañeros de laboratorio, a los de hoy y a los que estuvieron durante todos estos años. A Pato, Gra y Sara por compartir nuestros primeros pasos y tropiezos juntos, por disfrutar los logros y aliviar las dificultades, por las risas y complicidades. A Ceci y Marce por su calidez humana, consejos y ayuda recibida innumerables veces. Gracias a todos por ser grandes

compañeros, por ayudarme y contenerme, por los mates y los almuerzos compartidos.

A todos los integrantes del CINDEFI por su apoyo y camaradería durante estos años.

A mis amigos por las alegrías y penas que hemos vivido juntos; por siempre tener palabras de ánimo y apoyo.

Agradezco especialmente a mi familia, mis papás, Raquel y Alfredo, y mi hermano Mateo por su amor, comprensión, cuidados y esfuerzos. Gracias por acompañarme de manera incondicional en cada etapa de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	5
Primer capítulo: Introducción	6
1.1. Uso y consumo de metales en el mundo	7
1.2. Tratamiento de minerales metalíferos.....	9
1.2.1. Pirometalurgia.....	10
1.2.2. Hidrometalurgia	13
1.3. Biominería como alternativa	15
1.3.1. Aplicaciones comerciales de biolixiviación.....	16
1.4. Microorganismos en biolixiviación.....	18
1.4.1. Género <i>Acidithiobacillus</i>	20
1.4.2. Género <i>Leptospirillum</i>	20
1.4.3. Género <i>Sulfobacillus</i>	21
1.4.4. Género <i>Ferroplasma</i>	21
1.4.5. Género <i>Sulfolobus</i>	22
1.4.6. Género <i>Metallosphaera</i>	22
1.4.7. Género <i>Acidianus</i>	23
1.5. Mecanismos de biolixiviación	23
1.6. Rol de la adhesión microbiana.....	28
1.7. Mejoramiento de los procesos de biolixiviación	31
1.8. <i>Acidianus copahuensis</i> . Características generales	33
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	35
Segundo capítulo: Interacción con la superficie mineral	37
2.1. Introducción	39
2.2. Materiales y métodos.....	43
2.2.1. Superficies.....	43
2.2.1.1. Cupones de azufre	43
2.2.1.2. Pirita.....	43
2.2.1.3. Concentrado de Bajo La Alumbraera	46
2.2.1.4. Mineral de Hualilán	48

2.2.2. Microorganismos y medio de cultivo	49
2.2.3. Cinéticas de crecimiento	50
2.2.4. Análisis morfológico.....	51
2.2.5. Caracterización de la superficie celular	51
2.2.5.1. Hidrofobicidad.....	51
2.2.5.2. Potencial zeta	53
2.2.6. Exopolímeros	53
2.2.6.1. Extracción de exopolímeros.....	53
2.2.6.2. Caracterización de los exopolímeros	55
Caracterización bioquímica	55
Análisis por FTIR	57
Caracterización con lectinas fluorescentes	57
2.2.7. Adhesión inicial sobre diferentes minerales	59
2.2.8. Colonización y formación de biofilms	60
2.3. Resultados y discusión	62
2.3.1. Cinéticas de crecimiento	62
2.3.2. Características morfológicas.....	71
2.3.3. Características de la superficie celular	82
2.3.4. Producción y composición de los EPS	87
2.3.5. Adhesión inicial sobre diferentes minerales	105
2.3.6. Colonización y formación de biofilms	109
2.4. Conclusiones generales del capítulo.....	121
Tercer capítulo: Los biofilms y la biolixiviación	123
3.1. Introducción	125
3.2. Materiales y métodos	128
3.2.1. Minerales	128
3.2.2. Microorganismos y medios de cultivo.....	128
3.2.3. Los biofilms y la actividad biolixivante	128
3.2.4. Influencia de la separación de la población planctónica y sésil de <i>A. copahuensis</i> en la biolixiviación de pirita.....	129
3.2.5. Efecto de diversos factores en la formación de biofilms y biolixiviación	130
3.2.5.1. Ensayos en limitación de fosfato.....	130

3.2.5.2. Ensayos con L-cisteína	130
3.2.5.3. Interacciones entre <i>A. copahuensis</i> y <i>S. metallicus</i>	131
Cultivos mixtos	131
Ensayos de pre-colonización.....	132
3.3. Resultados y discusión	133
3.3.1. Los biofilms y la actividad biolixivante	133
3.3.2. Influencia de las poblaciones planctónica y sésil de <i>A. copahuensis</i> en la biolixiviación de pirita.....	138
3.3.3. Efecto de diversos factores en la formación de biofilms y biolixiviación	144
3.3.3.1. Efecto de la limitación de fosfato.....	144
3.3.3.2. Efecto de la adición de L-cisteína	148
3.3.3.3. Interacciones entre <i>A. copahuensis</i> y <i>S. metallicus</i>	152
Cultivos mixtos	152
Efecto de la pre-colonización.....	167
3.4. Conclusiones generales del capítulo.....	178
Cuarto capítulo: Recuperación de metales por biolixiviación	179
4.1. Biolixiviación de un mineral de cinc	181
4.1.1. Introducción	181
4.1.2. Materiales y métodos	186
4.1.2.1. Mineral.....	186
4.1.2.2. Microorganismos y medios de cultivo	186
4.1.2.3. Ensayos de biolixiviación	186
4.1.3. Resultados y discusión.....	189
4.1.4. Conclusiones.....	203
4.2. Biolixiviación de un concentrado de cobre	204
4.2.1. Introducción	204
4.2.2. Materiales y métodos	208
4.2.2.1. Mineral.....	208
4.2.2.2. Microorganismos y medio de cultivo	208
4.2.2.3. Ensayos de biolixiviación	208
4.2.3. Resultados y discusión.....	211
4.2.4. Conclusiones.....	223

4.3. Conclusiones generales del capítulo.....	224
Conclusiones generales y perspectivas futuras.....	226
Conclusiones generales.....	227
Perspectivas futuras	230
Producción científica.....	232
Anexos	234
Anexo I.....	235
Anexo II.....	237
Anexo III.....	242
Bibliografía	245

RESUMEN

La biolixiviación es el proceso de solubilización de metales asociados a sulfuros, utilizando la acción catalítica de ciertos microorganismos. Este proceso tiene aplicaciones comerciales a gran escala para la obtención de cobre pero también se ha aplicado con éxito en los casos de cobalto, zinc y níquel. Se ha demostrado que esta actividad es más significativa en el microambiente de los biofilms que los microorganismos producen sobre la superficie de los minerales luego de colonizarla. El conocimiento sobre las interacciones entre los microorganismos y las superficies minerales, permitiría el diseño de estrategias tendientes a favorecer (en el caso de las tecnologías biomineras) la biolixiviación de sulfuros metálicos. Al respecto, existe una bibliografía relativamente abundante y reciente específicamente para el caso de bacterias mesófilas hierro y azufre oxidantes, que son las más ampliamente estudiadas dentro de las comunidades que están implicadas en estos fenómenos. No obstante, hay poca información sobre estos aspectos en el caso de otras especies microbianas; en particular, para las arqueas, cuya acción suele ser más importante en condiciones más extremas de temperatura y pH, la información es prácticamente inexistente.

Precisamente, este Trabajo de Tesis Doctoral está dirigido al estudio de estos fenómenos de adhesión y biolixiviación, para una especie microbiana aislada por nuestro grupo de la zona geotermal de Caviahue-Copahue. *Acidianus copahuensis* es una especie de arqueas termófila, caracterizada fisiológica y genéticamente en nuestro laboratorio, y que no ha sido reportada en ningún otro lugar.

Primer capítulo

Introducción

1.1. Uso y consumo de metales en el mundo

Los metales son los materiales de más antigua y mayor utilidad para los seres humanos. Constituyen parte de las herramientas, utensilios y enseres que se utilizan en la vida común y en el trabajo. También son la materia prima de la industria química en sectores como la medicina, la cosmética y la petroquímica, en los que se utilizan en infinidad de aplicaciones.

Los metales presentan ciertas propiedades características (brillo, dureza, tenacidad, ductilidad, maleabilidad y son excelentes conductores del calor y de la electricidad) que los diferencia del resto de las sustancias sólidas. Sus cualidades de uso más estimables son su larga vida útil, su resistencia mecánica y su fácil conformación. Las menos apreciables, su precio muy variable según la clase de metal, su alta densidad, que no los afecta de forma general, ya que un grupo importante de ellos (como el aluminio, el magnesio, etc.), tienen densidades similares a otros materiales competitivos, y su tendencia a la corrosión, que es en gran medida evitable a través de la protección superficial.

Entre los metales de mayor uso comercial se destaca el hierro (utilizado principalmente en forma de aceros), representando el 95% en peso de la producción mundial de metal. El aluminio ocupa un distante segundo lugar, seguido por cantidades considerablemente más pequeñas de cobre y cinc. Estos dos últimos metales serán foco de estudio en este trabajo; en las secciones 4.1.1 y 4.2.1 se analizará con mayor detalle la producción y el consumo de estos metales tanto a nivel mundial como nacional.

En la actualidad, la demanda de metales se está incrementando como consecuencia de la aceleración del crecimiento mundial y de la rápida

expansión del ingreso y de la producción industrial en países como China que, por su enorme población, tienen una fuerte influencia en el mercado. En 2008, se produjeron en el mundo más de 1,4 miles de millones de toneladas de metales que es el doble de la cantidad de finales de 1970 y más de siete veces la producción en 1950. La media de uso de metales per cápita ha aumentado de 77 kilogramos en 1950 a 165 kilogramos en 1975 y 213 kilogramos en 2008. A pesar de ello, estos promedios globales ocultan el hecho de que el consumo de los metales está muy concentrado en un pequeño número de países. Por ejemplo, en Estados Unidos el consumo per cápita en 2008 (380 kilogramos) fue de aproximadamente nueve veces mayor que en China y 15 veces mayor que en India.

Los principales países productores de metales son México, Chile, China y Australia. Latinoamérica y Caribe se caracterizan por poseer una gran variedad y cantidad de recursos mineros. Durante la década de 1990 la reforma del marco normativo de la actividad minera, llevada a cabo por los distintos países de la región, aceleró la inserción de América Latina en el mapa mundial de inversiones mineras. El endurecimiento de las reglamentaciones medioambientales en los países centrales, junto con el agotamiento de distintos yacimientos mineros y la generalización de nuevas tecnologías de explotación, incrementaron el interés por los recursos minerales de la región. Este marco conllevó a la apertura de diversos yacimientos en exploración y explotación de minerales metalíferos y, con ellos, el inicio de una nueva rama de actividad en el país.

En Argentina, las perspectivas indican que el aporte general de la minería será creciente en los próximos años. En cuanto a aportes económicos, el 70% del valor de la producción de la minería queda en el país, en términos de sueldos, contratación de proveedores de bienes y servicios locales y aportes fiscales y no fiscales a los Estados Provinciales y

Nacional. Por otro lado, la minería es fuente de trabajo para alrededor de 98.000 personas, de manera directa e indirecta. Además, la instalación de proyectos mineros en las distintas provincias potencia el desarrollo local y de la cadena de valor, dado que el 70% de lo comprado en bienes y servicios son nacionales. La minería es una de las mayores industrias aportantes de divisas al país. En 2014 aportó U\$S 3.905 millones a la economía nacional, lo que representa un 5,8% de las exportaciones totales (Cámara Argentina de empresarios mineros, 2016).

Dentro de la recaudación por el segmento metalífero se destacan en particular los aportes del cobre concentrado, el metal doré, que explican en conjunto un 90% de los ingresos por el segmento metalífero, y cerca del 77% del aporte total de la minería a nivel nacional. Si se observa la evolución durante el último quinquenio, el aporte de la actividad minera nacional se multiplicó por 3,7 entre 2006 y 2013, pasando de \$1.800 millones a \$6.745 millones (Cámara Argentina de empresarios mineros, 2016).

A partir de estos datos, resulta evidente que la minería y sus productos constituyen factores de suma importancia para el desarrollo económico y social de los países y regiones donde se lleva a cabo esta actividad.

1.2. Tratamiento de minerales metalíferos

Sólo unos pocos metales se encuentran en la naturaleza en estado libre o nativo (oro, plata, mercurio, platino y cobre, aunque no es el estado más usual). La mayor parte se encuentra combinado con otros elementos, formando óxidos, sulfuros, carbonatos, silicatos, sulfatos, fosfatos, etc., constituyendo los minerales.

Los minerales extraídos en una operación minera están compuestos por diversas especies, algunas de ellas de valor comercial -usualmente las menos abundantes- y otras de menor valor o sin valor relativo. El procesamiento de los minerales consiste en un conjunto de operaciones que involucra principalmente la liberación o separación de los minerales valiosos de la ganga y la concentración de esos valores.

La metalurgia extractiva corresponde al conjunto de procesos que se llevan a cabo para obtener selectivamente el metal de interés. En términos generales se puede subdividir en tres grandes áreas: procesos hidrometalúrgicos, procesos pirometalúrgicos y procesos electrometalúrgicos. La pirometalurgia es la técnica más antigua empleada para la extracción de metales, mientras que la hidrometalurgia tiene unos cuatro siglos de antigüedad. La electrometalurgia es la tecnología más reciente y existe desde mediados del siglo XIX; generalmente se utiliza como complemento en las técnicas mineras anteriormente mencionadas. Cada una de estas vías presenta ciertas condiciones que deben ser analizadas al momento de su aplicación con el fin de determinar la rentabilidad y la eficiencia del proceso a implementar. Además, estas áreas enfrentan desafíos de complejidad creciente como consecuencia de la disminución sostenida de las leyes en los yacimientos, aparición de elementos penalizados y regulaciones medioambientales cada vez más exigentes.

1.2.1. Pirometalurgia

La pirometalurgia es una técnica metalúrgica tradicional que, a través de un conjunto de procesos químicos y operaciones físicas realizadas a elevadas temperaturas (mayores a 950 °C), permiten que el metal en estado

nativo o como componente de uno o varios compuestos en un mineral, pueda obtenerse en estado metálico o formando un compuesto con pureza y/o forma adecuada para su utilización posterior. Incluye una combinación de procesos tales como la tostación, fusión y conversión.

Dentro de estos últimos, el método más utilizado en el mundo es la calcinación, debido a su versatilidad en el tratamiento de casi cualquier tipo de mineral. Sin embargo, los problemas ocasionados debido a las emisiones de SO_2 a la atmósfera y las reglamentaciones ambientales actuales, han impedido su uso. Aunque la adición de algunos compuestos y/o la modificación de la línea de procesos permiten la retención de gases sulfurosos, los costos generados son muy altos impidiendo la generalización de su uso.

Las técnicas pirometalúrgicas se utilizan para diversos procesos destacándose la obtención del cobre. Actualmente, se estima que cerca del 90% de la producción mundial de este metal se realiza mediante este tipo de tratamiento. La tostación es también la técnica que tradicionalmente se utiliza para el tratamiento de menas refractarias conteniendo metales como oro, plata, molibdeno, cinc, entre otros.

La calcopirita, sulfuro doble de cobre y hierro (CuFeS_2), es el mineral más abundante entre todos los minerales de cobre. Su tratamiento metalúrgico se realiza, principalmente, utilizando la vía pirometalúrgica después de una necesaria concentración por flotación del propio mineral previamente chancado y molido. Sin embargo, el tratamiento de este sulfuro por métodos hidrometalúrgicos tropieza con el problema de su refractariedad a temperatura ambiente frente a los reactivos lixiviantes más comúnmente utilizados, lo que dificulta obtener altos niveles de recuperación de cobre en tiempos razonables y alcanzar una economía

aceptable del proceso. Las razones de este comportamiento se centra en las transformaciones superficiales que sufre el mineral al ser atacado químicamente en medios oxidantes, debido a la formación de productos intermedios de reacción muy estables en condiciones de trabajo. El carácter refractario de la calcopirita disminuye substancialmente en la medida que se aumenta la temperatura; por esa razón, la mayor parte de las rutas de obtención de cobre a partir de calcopirita plantean operar a temperaturas elevadas.

A continuación se enumeraran las principales ventajas y desventajas de las técnicas pirometalúrgicas:

Ventajas:

- ✓ Altas velocidades de reacción
- ✓ Altas producciones en reactores relativamente pequeños
- ✓ Permite el tratamiento de minerales complejos
- ✓ Eficaz en alimentaciones heterogéneas formadas por minerales de diversas procedencias

Desventajas:

- ✓ No es aplicable a minerales de baja ley
- ✓ Relativamente mala selectividad y poca eficacia en reacciones químicas de separación
- ✓ Procesos que frecuentemente transcurren en varias etapas
- ✓ Problemas medioambientales con los residuos gaseosos y el ruido

1.2.2. Hidrometalurgia

La hidrometalurgia, a diferencia de la pirometalurgia, es una técnica extractiva mucho más moderna, que consiste principalmente en el tratamiento de minerales, concentrados y otros materiales metálicos a través de métodos húmedos que producen la disolución de alguno de sus componentes y su posterior recuperación a partir de la disolución. Normalmente se realiza en un intervalo de temperaturas comprendido entre 25 y 250 °C. La lixiviación es la técnica más utilizada entre los métodos alternativos cuando el proceso pirometalúrgico no es rentable para la explotación de menas.

La lixiviación es la primera etapa de cualquier proceso hidrometalúrgico. Este es el término aplicado a la recuperación o disolución química de un metal a partir de un mineral utilizando el disolvente adecuado. Generalmente el agente lixivante se encuentra disuelto en una solución acuosa y el ataque químico al mineral puede proceder mediante una reacción ácido-base, redox o complejante. Este proceso puede realizarse en diferentes condiciones de presión (en vacío o a más de 5000 kPa) y temperatura (desde 0 °C hasta 250 °C), manteniendo siempre el requisito de desarrollarse en medio acuoso.

En la actualidad, la hidrometalurgia es aplicada a minerales sulfurados y oxidados. El inconveniente es que para los minerales sulfurados la cinética de disolución es mucho más lenta que la de minerales oxidados.

En el caso particular del cobre, la hidrometalurgia facilita la recuperación de este metal a partir de minerales oxidados. Generalmente, la concentración de cobre en este tipo de menas suele ser muy baja (leyes inferiores al 0,5%) impidiendo el uso de técnicas pirometalúrgicas para su

recuperación. A su vez, la mayoría de los minerales oxidados presentan bajas eficiencias en la concentración por flotación, la hidrometalurgia resulta ser la técnica más conveniente en estos casos.

Alrededor del 95% del cinc producido mundialmente proviene de la esfalerita (ZnS). Por siglos, el cinc metálico fue producido tostando la esfalerita para conseguir el óxido de cinc, que luego era reducido a altas temperaturas para lograr el metal. Este proceso es muy costoso debido a los altos requerimientos energéticos. En la actualidad sólo se realiza en China, India, Japón y Polonia. Los conceptos hidro y electrometalúrgicos fueron aplicados para desarrollar un nuevo proceso que compitió con la vieja tecnología. Actualmente, el concentrado de cinc es tostado a temperaturas mayores a 900 °C para convertir el sulfuro de cinc en óxido de cinc que es una especie más reactiva. El óxido de cinc es lixiviado del resto de las cenizas utilizando ácido sulfúrico. El cinc es disuelto mientras que el resto de los compuestos permanecen en estado sólido. La solución obtenida contiene algunas impurezas que son eliminadas mediante procesos electroquímicos para obtener un producto con alto grado de pureza. Finalmente, el cinc es precipitado electrolíticamente (International Zinc Association, 2016).

A continuación se presentan las principales ventajas y desventajas que tiene la implementación de los procesos hidrometalúrgicos:

Ventajas:

- ✓ Permite el tratamiento de minerales de baja ley
- ✓ Alta selectividad y alto grado de separación en las reacciones químicas
- ✓ Alta pureza de los productos

- ✓ Fácil control y optimización
- ✓ Ausencia de polución por gases

Desventajas:

- ✓ Lentas velocidades de reacción
- ✓ Poca producción por reactor
- ✓ Sensible a variaciones en la composición de la alimentación
- ✓ Problemas en la eliminación y almacenamiento de los residuos sólidos generados
- ✓ Problemas con las aguas residuales

1.3. Biominería como alternativa

Biominería es el término genérico utilizado para describir tecnologías que utilizan sistemas biológicos (principalmente microorganismos procariotas) para facilitar la extracción y recuperación de metales a partir de minerales y materiales de desecho (Johnson, 2014). Dentro de estas tecnologías se encuentran la remediación ambiental, la recuperación de metales (biolixiviación) y el pretratamiento de minerales para facilitar la posterior recuperación de metales (biooxidación). Este trabajo de tesis se focalizará en procesos de recuperación de metales, particularmente a través de biolixiviación.

La biolixiviación puede definirse como la conversión de compuestos metálicos insolubles en elementos solubles mediante acción directa (a través de actividad metabólica) o indirecta (a través de productos metabólicos) de ciertos microorganismos (principalmente bacterias y

arqueas). En el caso de la lixiviación de sulfuros metálicos, el sulfuro es oxidado generando iones metálicos y sulfato a través de la acción de microorganismos acidófilos hierro y/o azufre oxidantes (Donati y Sand, 2007). Mediante esta tecnología pueden recuperarse metales como cobre, cobalto, zinc, níquel, molibdeno, uranio, etc. (Schippers y col., 2014). En la biooxidación los microorganismos son utilizados para remover minerales que ocluyen el metal o especie de interés, que es luego solubilizada en un segundo paso (por ejemplo, mediante el tratamiento con cianuro o tiosulfato) (Johnson, 2014). Es aplicada principalmente para la recuperación de oro y plata que, en general, se encuentran ocluidos en matrices de sulfuros metálicos como piritita o arsenopiritita.

Estas metodologías extractivas presentan 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 (Donati y Sand, 2007; Schippers y col., 2014; Watling, 2006). Hoy en día la biominería es una biotecnología establecida y aplicada mundialmente. Los progresos realizados en la construcción de plantas de lixiviación, en la construcción y manejo operacional de tanques de biolixiviación, así también como en su diseño llevaron a que esta tecnología sea difundida mundialmente (Schippers y col., 2014). Las aplicaciones de estas metodologías a escala comercial (tanto en pilas de lixiviación como en tanques agitados) se utilizan principalmente para la extracción de cobre, oro y uranio.

1.3.1. Aplicaciones comerciales de biolixiviación

La primera aplicación comercial fue diseñada para la obtención de cobre en pilas de lixiviación. Hoy en día, esta tecnología se encuentra

establecida y se aplica en el tratamiento de menas secundarias de sulfuros de cobre. La lixiviación convencional de los minerales oxidados de cobre mediante el tratamiento con ácido sulfúrico diluido está siendo sustituida por la biolixiviación de minerales sulfurados de cobre. Una importante razón que condujo a este cambio, es la disminución de las reservas de minerales de cobre oxidados en comparación con los minerales sulfurados (Schippers y col., 2014). Por ejemplo, en Chile, principal productor de cobre a nivel mundial, se estima que entre 10.000 a 40.000 toneladas de minerales son tratadas diariamente mediante procesos de biolixiviación para producir entre 10.000 a 200.000 toneladas de cobre anuales (Jerez, 2011). En la Tabla 1.1 se describen las principales operaciones comerciales de biolixiviación de cobre.

En comparación con la recuperación de cobre, la biolixiviación de otros metales como níquel, cobalto y cinc continúa en etapa de desarrollo. La biolixiviación de estos metales sólo es utilizada cuando las condiciones impiden el procesamiento convencional del mineral (Schippers y col., 2014). La mina Talvivaara, localizada en Finlandia, produce níquel, zinc, cobre, cobalto y uranio a partir del mineral polimetálico utilizando biolixiviación en pilas. La planta BROGIM®, localizada en Uganda, procesa un concentrado de pirita con cobalto. El cinc, cobre y níquel también presentes en el concentrado son lixiviados por bacterias y recuperados luego de varias etapas de procesamiento (Brierley y Brierley, 2013).

Tabla 1.1. Operaciones comerciales de biolixiviación de cobre (Brierley y Brierley, 2013)

Planta y ubicación/propietario	Producción de cobre (t/año)	Estado de operación
Los Aguirres, Chile/Sociedad Minera Prudahel	15.000	1980-1996 (mena agotada)
Mount Gordon (anteriormente Gunpowder), Australia/Aditya Birla	33.000	1991-2008 (en mantenimiento)
Lince II, Chile/Antofagasta plc	27.000	1991-2009 (costos elevados)
Mt. Leyshon, Australia (anteriormente Normandy Poseidon)	750	1992-1995 (agotada)
Cerro Colorado, Chile/BHP-Billiton	115.000	1993-actualidad
Girilambone, Australia/Straits Resources and Nord Pacific	14.000	1993-2003 (agotada)
Ivan-Zar, Chile/Compañía Minera Milpro	10.000-12.000	1994-actualidad
Punta del Cobre, Chile/Sociedad Punta del Cobre	7.000-8.000	1994-actualidad
Quebrada Blanca, Chile/Teck Resources	75.000	1994-actualidad
Andacollo Cobre, Chile/Teck Resources	21.000	1996-actualidad
Dos Amigos, Chile/CEMIN	10.000	1996-actualidad
Skouriotissa Copper, Cyprus/Hellenic Copper	8.000	1996-actualidad
Cerro Verde, Peru/Freeport McMoran	542.000	1997-actualidad
Zaldivar, Chile/Barric Gold	150.000	1998-actualidad
Lomas Bayas, Chile/Xstrata	60.000	1998-actualidad
Monywa, Myanmar/Myanmar No. 1 Mining Enterprise	40.000	1998-actualidad
Nifty Copper, Australia/Aditya Birla	16.000	1998-actualidad
Equatorial Tonopah, Nevada/Equatorial Tonopah, Inc.	25.000	2000-2001
Morenci, Arizona/Freeport McMoran	380.000	2001-actualidad
Zijinshan Copper, China/Zijin Mining Group	20.000	2005-actualidad
Lisbon Valley Mining Company, Utah	10.000	2006-actualidad
Jinchuan Copper, China/Zijin Mining Group	10.000	2006-2009
Whim Creek and Mons Cupri, Australia/Straite Resources	17.000	2006-actualidad
Spence, Chile/BHP Billiton	200.000	2007-actualidad
Tres Valles, Chile/Vale SA	18.500	2010-actualidad

1.4. Microorganismos en biolixiviación

Las condiciones físico-químicas extremas de las operaciones biomineras, bajo pH, elevadas concentraciones de metales (tóxicos), metaloides y otros solutos, y los potenciales redox muy elevados, resultan altamente tóxicas para la mayoría de los seres vivos. Sin embargo, existen microorganismos capaces de tolerar y vivir en dichas condiciones. Estos microorganismos presentan algunas características comunes:

- ✓ Son acidófilos
- ✓ Toleran altas concentraciones de metales
- ✓ Son quimiolitotrofos, es decir, utilizan compuestos inorgánicos para su crecimiento, además de fijar CO₂

Los microorganismos hierro oxidantes, obtienen energía a través de la oxidación de hierro(II) a hierro(III) mediante la siguiente ecuación:



Los microorganismos azufre oxidantes, oxidan los compuestos intermediarios de azufre, generando sulfato y protones. La reacción más relevante es la oxidación de azufre elemental a sulfato, permitiendo que esta reacción ocurra a velocidades mensurables, cuando abióticamente es extremadamente lenta en las condiciones de biolixiviación.



El rol de los microorganismos en los procesos de biolixiviación es oxidar los productos generados en la oxidación química del sulfuro metálico (hierro(II) y compuestos reducidos de azufre), para regenerar iones hierro(III) y proveer protones, que son los principales agentes que atacan al sulfuro. Además, la producción de protones favorece que el pH se mantenga bajo permitiendo que el hierro permanezca en solución.

De acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos, se pueden distinguir tres grandes grupos: microorganismos mesófilos (temperaturas óptimas entre 25-40 °C), microorganismos termófilos moderados (40-55 °C) y microorganismos termófilos extremos (55-85 °C). Las arqueas suelen ser las dominantes en las condiciones más extremas, mientras que las bacterias lo hacen en condiciones más moderadas.

A continuación se presentan los distintos géneros de microorganismos hierro y/o azufre oxidantes de mayor relevancia en este tipo de procesos.

1.4.1. Género *Acidithiobacillus*

El género *Acidithiobacillus* engloba un gran número de especies de bacterias acidófilas obligadas (pH óptimo <4) y a una temperatura comprendida entre 20 y 43 °C, Gram-negativas, de forma bacilar y móviles. La mayoría de las especies son quimiolitótrofas y aeróbicas obligadas. Obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos reducidos de azufre y algunas especies son capaces de oxidar hierro(II). Todas fijan CO₂ mediante el ciclo de Calvin-Benson.

En 1947, Colmer y Hinckle describieron por primera vez una bacteria mesófila capaz de obtener energía de la oxidación de hierro(II). Estudios posteriores indicaron que la acidez en las aguas de drenajes ácidos de minas de carbón era debida a la actividad de bacterias azufre oxidante. En 1951 esta bacteria fue denominada *Thiobacillus ferrooxidans*, y posteriormente renombrada como *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Esta bacteria ha sido extensamente estudiada en relación directa con los procesos biomineros.

El género *Acidithiobacillus* también incluye las especies *At. thiooxidans*, *At. caldus*, *At. albertensis*, *At. cuprithermicus*, *At. ferridurans* y *At. ferrivorans*.

1.4.2. Género *Leptospirillum*

Filogenéticamente, este género pertenece al filo Nitrospira e incluye a las especies *L. ferrooxidans*, *L. ferriphilium*, *L. ferrodiazotrophum* y *L. thermoferrooxidans*.

Son microorganismos acidófilos obligados (pH óptimo <4) y aerobios. Las células son Gram-negativas, vibrios móviles o espirilos, pero también pueden presentar forma de coco o pseudococo. Son quimiolitótrofos

obligados y obtienen energía únicamente a partir de la oxidación del hierro(II). Fijan CO₂ a través del ciclo de Benson-Calvin (Donati y Sand, 2007).

1.4.3. Género *Sulfobacillus*

Las especies del género *Sulfobacillus* son capaces de crecer en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas. En condiciones litótrofas pueden crecer a expensas de la oxidación de compuestos de hierro(II) y/o azufre. Las células son Gram-positivas, móviles y pueden presentarse como vibrios, espirilos, cocos. Además, durante su crecimiento pueden formar endoesporas. Son bacterias mesófilas o termófilas moderadas y han sido aisladas de pilas de sulfuros o bien de zonas termales.

1.4.4. Género *Ferroplasma*

Las especies pertenecientes a este género son arqueas acidófilas capaces de oxidar iones de hierro(II). Las células carecen de pared celular y son pleomorfas (cocos irregulares, morfologías diversas que van desde esféricas a filamentosas, presentándose también de a pares). Inicialmente fueron descritos como aerobios y quimiolitótrofos obligados; sin embargo, pueden crecer en forma mixotrófica u organotrófica y comportarse como anaerobios facultativos a través de la reducción del hierro(III) (Dopson y col., 2004).

Estos microorganismos son ubicuos en ambientes ácidos de mina y en operaciones de biolixiviación (Golyshina y Timmis, 2005; Johnson y Hallberg, 2003).

Las especies pertenecientes a este género son *F. acidiphilium*, *F. acidarmanus*, *F. thermophilum* y *F. cupricumulans*.

1.4.5. Género *Sulfolobus*

El género de arqueas *Sulfolobus* fue definido en 1972 cuando la primera especie, *Sulfolobus acidocaldarius*, fue aislada en el parque Nacional Yellowstone, USA (Brock y col., 1972). Este género se encuentra distribuido globalmente y son especies típicamente aisladas de sistemas geotermales ácidos. Las especies de *Sulfolobus* son aerobias estrictas, pueden tener metabolismo heterotrófico o quimiolitotrófico obligado. *S. metallicus* se distingue entre los miembros de este género debido a su incapacidad de crecer utilizando fuentes de carbono orgánico, exhibiendo metabolismo quimiolitotrófico obligado. Algunas especies como *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus*, *S. tengchogensis*, *S. tokodaii* y *S. shibatae* parecen ser móviles, mientras que *S. metallicus* y *S. yangmingensis* no lo son (Wheaton y col., 2015). Otros miembros de este género son las especies *S. neozealandicus* y *S. islandicus*.

1.4.6. Género *Metallosphaera*

La especie tipo de este género de arqueas, *Metallosphaera sedula*, fue aislada de un pozo termal en Pisciarelli Solfatara (Italia) (Huber y col., 1989). Este género incluye cinco especies con fisiología variada. Todas son aerobias obligadas, utilizan oxígeno como el único aceptor terminal de electrones y son capaces de crecer facultativamente en condiciones quimiolitotróficas con varios sustratos inorgánicos. *M. cuprina* es el único miembro capaz de crecer utilizando una gran variedad de azúcares (Liu y col., 2011). La movilidad es una característica compartida por *M.*

cuprina, *M. sedula*, *M. prunae*, pero no por *M. hakonensis*; la movilidad aún no ha sido determinada para *M. yellowstonensis*.

1.4.7. Género *Acidianus*

Nueve especies integran este género de arqueas, todas anaerobias facultativas, capaces de crecer en condiciones quimiolitotótrofas y, en algunos casos son autótrofas facultativas. La característica en común de estas especies es la capacidad de oxidar o reducir azufre elemental, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno (Wheaton y col., 2015). La única excepción es *A. manzaensis* (NA-1) que no puede utilizar azufre elemental como aceptor final durante la respiración anaeróbica. Otra característica de las especies *Acidianus* es que pueden usar H₂ como donador de electrones en la respiración aeróbica, excepto *A. sulfidivorans*. Otros miembros de este género son las especies *A. hospitalis*, candidato *A. copahuensis*, *A. infernus*, *A. ambivalens*, *A. brierleyi*, *A. techongensis* y *A. manzaensis* (YN25).

1.5. Mecanismos de biolixiviación

Se han propuesto dos mecanismos para describir los procesos de lixiviación microbianos. El mecanismo directo es aquel que está mediado por la acción microbiana y en donde las reacciones químicas son catalizadas enzimáticamente; esta opción, además, supone el contacto físico de los microorganismos con el mineral. Por otro lado, se entiende como mecanismo indirecto aquel en el que toman parte reacciones químicas, enzimáticas o no enzimáticas, no habiendo contacto físico entre los microorganismos y el mineral, aunque aquellos juegan un papel central en la formación de reactivos químicos que pueden tomar parte en el

proceso (Ballester, 2005). Estos términos pueden ser útiles para describir el estado físico de las células involucradas en biolixiviación, pero no dicen nada acerca de los mecanismos químicos de biolixiviación.

El mecanismo indirecto es el más aceptado, y puede describirse como un ataque oxidativo de iones férrico y protones sobre el mineral. La disolución de sulfuros metálicos puede ser descrita mediante dos vías; de acuerdo al principal compuesto de azufre intermediario se denominan: mecanismo del tiosulfato y mecanismo del polisulfuro (Fig. 1.1). La formación de compuestos de azufre intermediarios en estas vías depende de la mineralogía del sulfuro metálico y las condiciones geoquímicas del ambiente, principalmente el pH y la presencia de diferentes oxidantes (Schippers y col., 2014).

La mayoría de los sulfuros metálicos son semiconductores. Según la teoría del orbital molecular y la del enlace, los orbitales, de átomos simples o moléculas, forman bandas electrónicas con diferentes niveles de energía. La banda con el mayor nivel energético es la banda de valencia. En el caso de la pirita, molibdenita y volframita, las bandas de valencia se forman por combinación de orbitales procedentes de átomos metálicos; sin embargo, las bandas de valencia de otros sulfuros metálicos se generan a partir de orbitales procedentes tanto del metal como del azufre del sulfuro. Consecuentemente, la banda de valencia de los tres sulfuros anteriormente mencionados no contribuyen al enlace entre la parte de metal y de azufre del sulfuro metálico. Este enlace, por tanto, sólo puede ser roto a través de varias etapas de oxidación con el ion férrico. En el caso de los otros sulfuros metálicos, además del hierro(III), los protones también pueden eliminar electrones de la banda de valencia causando la rotura de los enlaces entre el metal y el azufre del sulfuro. La consecuencia final es que estos sulfuros

son relativamente solubles en ácido mientras que los tres nombrados en primer lugar son insolubles (Ballester, 2005).

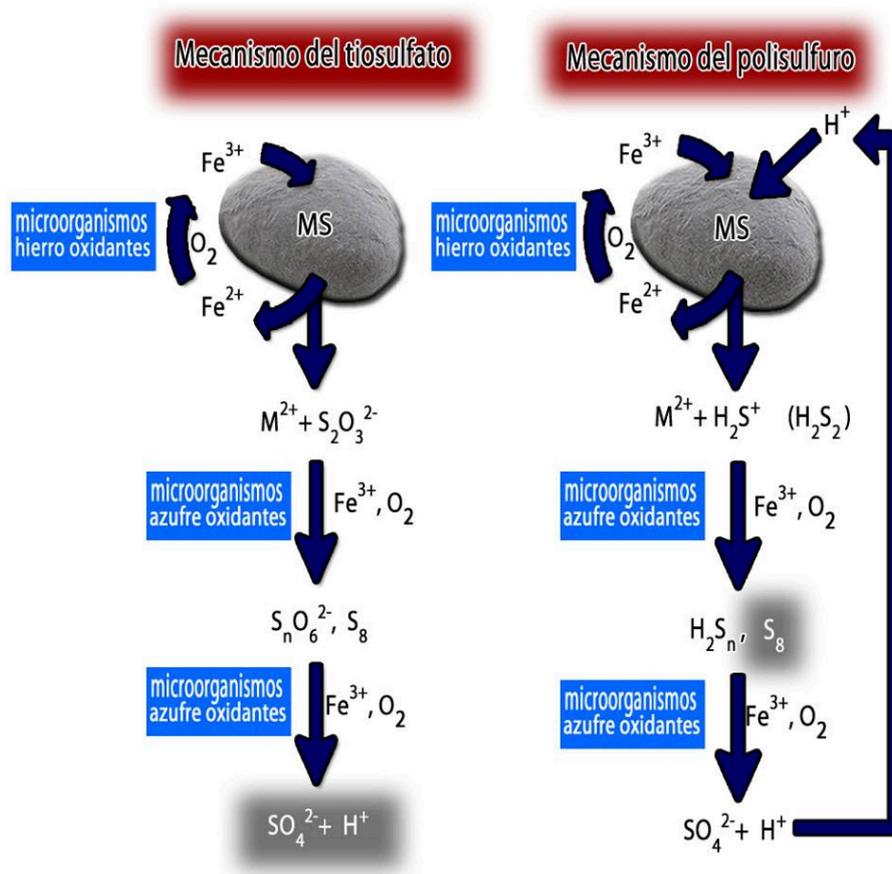


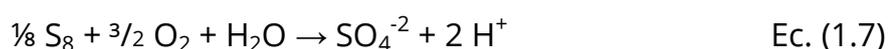
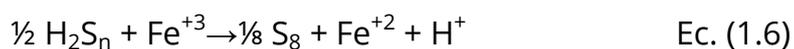
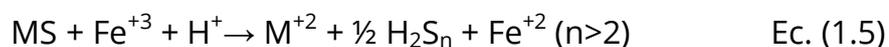
Figura 1.1. Esquema de los mecanismos de biolixiviación (modificado de Vera y col., 2013)

Los sulfuros metálicos insolubles en ácido, como la pirita, molibdenita y volframita, son oxidados mediante la vía del tiosulfato. Entre estos sulfuros, la oxidación de la pirita es la que ha sido mayormente estudiada. El proceso de oxidación se inicia mediante un ataque de iones férricos sobre el mineral, generando tiosulfato como el primer compuesto soluble de azufre intermediario. Se necesitan 6 pasos de oxidación para romper el enlace entre el metal y el azufre del sulfuro, generando hierro(II)

y tiosulfato (Ec. 1.3). Luego, el tiosulfato es oxidado a tetratiónato que posteriormente es degradado a varios compuestos de azufre, como tritiónato, pentatiónato, azufre elemental y sulfito. Estos compuestos de azufre son finalmente oxidados a sulfato mediante reacciones químicas y/o biológicas (Ec. 1.4) (Vera y col., 2013). La vía del tiosulfato aplicada a la disolución de pirita, puede ser resumida mediante las siguientes ecuaciones:



En contraste con la pirita, los enlaces metal-azufre de los sulfuros metálicos solubles en ácido pueden ser rotos antes que el azufre sea oxidado. Los sulfuros metálicos como la esfalerita, galena, arsenopirita, calcopirita, treolita, pirrotita, rejalgar, oropimente, pueden ser disueltos mediante la acción combinada de iones férricos y protones. En condiciones de bajo pH y presencia de hierro(III), el azufre del sulfuro metálico es oxidado principalmente a azufre metálico, mediante una vía que forma polisulfuros como compuestos intermediarios. El azufre elemental generado, es químicamente inerte en ambientes naturales, pero puede ser biológicamente oxidado a ácido sulfúrico. La vía del polisulfuro se puede resumir mediante las siguientes ecuaciones:



En ambas vías, el principal rol de los microorganismos es regenerar el hierro(III) (Ec. 1.1) que, como se mencionó anteriormente, es uno de los principales agentes oxidantes del sulfuro metálico. Por otro lado, los

microorganismos azufre oxidantes contribuyen en la transformación de compuestos de azufre intermediarios en ácido sulfúrico. En el caso del azufre elemental, su oxidación es exclusivamente llevada a cabo por microorganismos dado que esta especie de azufre es inerte a la oxidación abiótica en condiciones ácidas. La producción de ácido también es necesaria para regenerar los protones consumidos en la vía del polisulfuro.

Desde el punto de vista físico se han propuesto dos modelos de disolución biológica de sulfuros metálicos: el mecanismo de "contacto" y el mecanismo de "no contacto" (Fig. 1.2). El mecanismo de contacto postula la adhesión de los microorganismos a la superficie del sulfuro metálico. El espacio de reacción creado en la interface entre la superficie mineral y los microorganismos constituye la zona de reacción donde se producen los procesos electroquímicos que conducen a la disolución del mineral. Este espacio es llenado por exopolímeros (EPS) y es el sitio donde el hierro(III) es reducido sobre la superficie del mineral mientras que el producto, hierro(II), es oxidado por los microorganismos. El mecanismo de no contacto asume que los microorganismos oxidan el hierro(II) a hierro(III) en el seno de la solución; este último ion migra hacia la superficie donde oxida al sulfuro metálico.

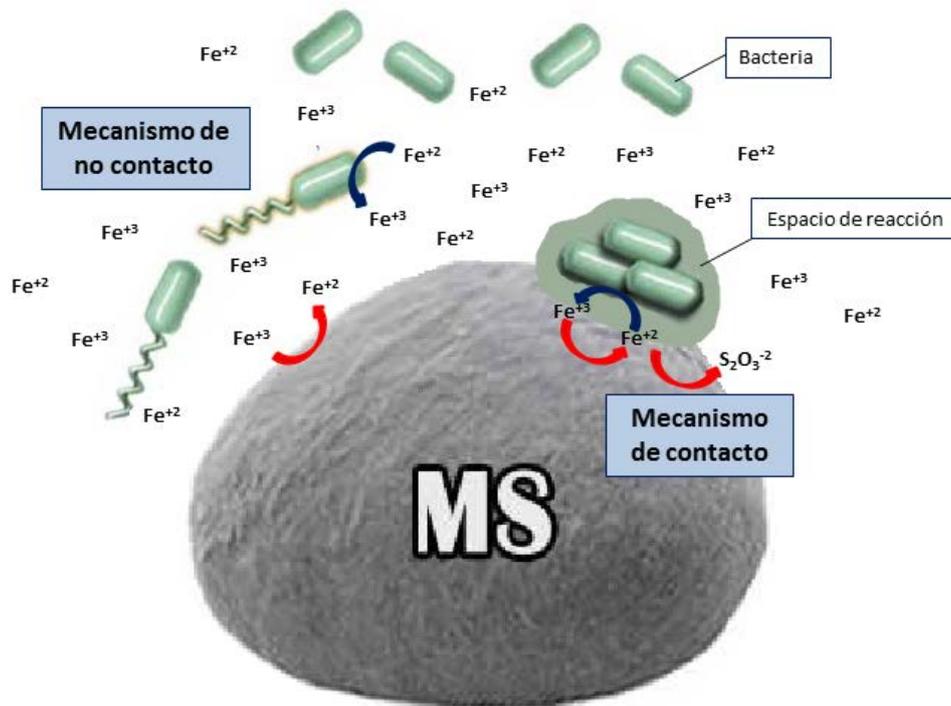


Figura 1.2. Representación de los mecanismos de contacto y no contacto.

1.6. Rol de la adhesión microbiana

La adhesión de los microorganismos a la superficie del sulfuro metálico es un pre-requisito para la disolución del mineral y está mediada por la presencia de EPS rodeando las células. Los microorganismos adaptan la composición y producción de EPS de acuerdo al sustrato y las condiciones de cultivo. En estudios previos realizados con algunas especies de bacterias se ha demostrado que las células planctónicas crecidas con hierro(II), no producen grandes cantidades de EPS; mientras que las células crecidas adheridas a la superficie de la piritita generan mayor cantidad de EPS (Vera y col., 2013). La composición de los EPS es variable, generalmente están compuestos por carbohidratos, proteínas, ácidos grasos, ácidos glucurónicos, ácidos nucleicos.

Una vez establecido el contacto entre las células y la superficie mineral, las células comienzan a multiplicarse y producir EPS, formando un

biofilm. En general, el proceso de formación de biofilms puede describirse en tres etapas: el transporte de las células a la superficie sólida, una adhesión inicial o primaria, y la colonización y formación de un biofilm continuo, incluyendo la dispersión de células (Fig. 1.3).

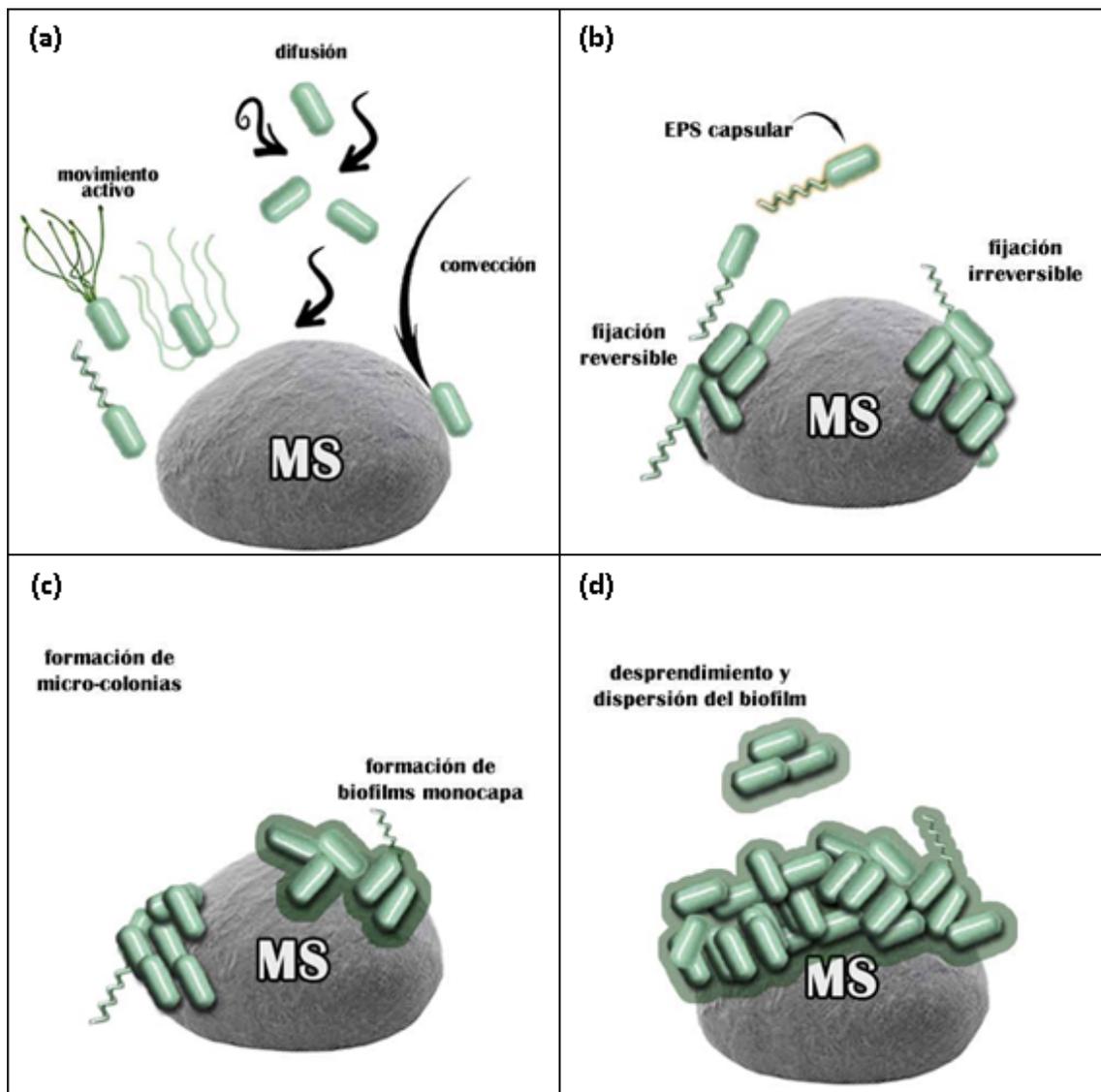


Figura 1.3. Etapas de la formación de un biofilm. **(a)** transporte de las células a la superficie del sulfuro metálico (MS); **(b)** adhesión primaria, reversible o irreversible; **(c)** formación de microcolonias y biofilm rodeados por EPS; **(d)** crecimiento del biofilm, desprendimiento y dispersión de partes del biofilm.

El transporte de las células a la superficie sólida ocurre mediante diferentes caminos: difusión, convección y/o movimiento activo. La difusión es el proceso más lento causado por el movimiento Browniano. En comparación, el movimiento convectivo es rápido y genera flujo de líquido. El movimiento activo requiere de la movilidad de los microorganismos usando apéndices locomotores, como flagelos y/o cilias.

El siguiente paso es la adhesión inicial o primaria de las células a la superficie sólida. Este proceso puede ser reversible o irreversible. En la adhesión reversible, las células pueden ser removidas fácilmente por fuerzas de cizallamientos suaves o movimiento activo; en cambio, en la adhesión irreversible se necesitan fuerzas de cizallamiento fuerte para poder desprender las células. En bacterias lixiviantes, la adhesión inicial sobre la superficie mineral está principalmente mediada por interacciones electroestáticas entre la superficie celular cargada positivamente con la superficie mineral cargada negativamente. La adhesión inicial sobre superficies hidrofóbicas como el azufre, parece estar mediada también por interacciones hidrofóbicas. Una vez establecido el contacto con la superficie mineral, las células incrementan la fuerza de adhesión mediante otros tipos de interacciones, que incluyen interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes. Además, el primer contacto físico entre las células y el mineral puede estar mediado por apéndices celulares como flagelos y/o pilis.

El último paso de la formación de biofilms se define como la colonización de la superficie. En esta etapa se producen EPS y se adhieren más células, incrementando la fuerza de adhesión y la superficie colonizada. Al mismo tiempo, las células adheridas comienzan a crecer y multiplicarse, resultando en la formación de microcolonias. A medida que continúa la división celular y la producción de EPS, se forman múltiples capas de células (matriz) donde además pueden quedar atrapados solutos

inorgánicos y/o precipitados. Esta estructura heterogénea de microcolonias entremezcladas con canales por donde circulan fluidos es usualmente conocida como biofilm. La producción de EPS y la formación de biofilms están probablemente reguladas por el sistema de quórum sensing (QS) de la comunidad microbiana.

1.7. Mejoramiento de los procesos de biolixiviación

El número de géneros y especies de microorganismos involucrados en la oxidación de sulfuros metálicos ha aumentado considerablemente a partir de 1970. Este incremento es atribuido a la gran cantidad de investigaciones sobre nuevos microorganismos y sus características fundamentales, estudios sobre los ambientes en donde naturalmente se encuentran como fuentes termales, áreas volcánicas y en sitios de operaciones mineras, y también debido al mejoramiento de metodologías, especialmente las técnicas de biología molecular, que han permitido detectar e identificar estos microorganismos (Brierley y Brierley, 2013).

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 lixiviante 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 lixiviación).

La utilización de microorganismos nativos es otra variante exitosa aplicada en los procesos de biolixiviación. Los microorganismos nativos y asociados a los minerales y/o a ambientes con condiciones similares a las encontradas en operaciones biomineras son generalmente más eficientes en los procesos de biolixiviación ya que están adaptados al ambiente y usualmente también a las eventuales especies tóxicas del mineral liberadas durante el proceso de biolixiviación. El uso de microorganismos modificados genéticamente para ser más resistentes y/o más eficientes no ha tenido gran éxito en las aplicaciones a campo ya que estos microorganismos suelen tener dificultades para instalarse en nichos habitados por microorganismos nativos ya adaptados a esas condiciones.

Los microorganismos termófilos pueden acelerar los procesos de biolixiviación dado que permiten el uso de temperaturas más elevadas con el consecuente aumento de las velocidades de reacción (Watling, 2006). Estos microorganismos también pueden incrementar las eficiencias de lixiviación de minerales refractarios como la molibdenita y calcopirita, que son difícilmente disueltos por microorganismos mesófilos. Dentro de este grupo de microorganismos se destacan las arqueas pertenecientes al género *Sulfolobus*, *Metallosphaera* y *Acidianus*.

Teniendo en cuenta los puntos anteriormente mencionados, se ha incrementado la búsqueda de microorganismos en ambientes extremos para su eventual uso en biominería. 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; precisamente en el Parque Nacional

Yellowstone (USA) se aislaron los primeros microorganismos termófilos para luego ser reportados en innumerables lugares y ambientes.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado búsquedas de este tipo de microorganismos en diversos lugares de Argentina propicios para su desarrollo (Chiacchiarini y col., 2010; Giaveno y col., 2013; Lavalle y col., 2008; Urbietta y col., 2012). En nuestro país, un área de gran interés para el aislamiento de microorganismos biolixiviantes y particularmente termófilos, es el sistema geotermal Caviahue-Copahue localizado al noreste de la provincia de Neuquén. Los cursos de agua de la zona presentan determinadas características que sugieren que la biodiversidad podría tener características metabólicas semejantes a los microorganismos lixiviantes; además, la presencia de elevadas concentraciones de aniones y cationes, habituales también en los ambientes de biolixiviación, sugiere que estos microorganismos han desarrollado mecanismos específicos de resistencia que los harían de mayor utilidad para la aplicación en procesos de biolixiviación.

1.8. *Acidianus copahuensis*. Características generales

Recientemente, y a partir de muestras tomadas en sistema geotermal Caviahue-Copahue, se aisló una nueva especie de arquea termoacidófila perteneciente al género *Acidianus*, (Giaveno y col., 2013).

El género *Acidianus* fue descrito por primera vez por Segerer y colaboradores en 1986. Se aislaron varias especies de arqueas termoacidófilas desde ambientes ácidos y termales; ellas fueron identificadas como *A. infernus*, *A. brierley*, *A. ambivalens*, *A. tengchongensis*, *A. manzaensis*, *A. hospitalis*, *A. sulfidivorans*, además de la recientemente aislada del sistema geotermal Caviahue-Copahue, *Acidianus* sp. ALE1 DSM

29038 (por simplicidad a lo largo de este trabajo de Tesis se la denominará *Acidianus copahuensis*).

Una de las características más llamativas de *A. copahuensis* es su mayor flexibilidad metabólica en comparación con las otras especies de *Acidianus*. Puede crecer en condiciones aeróbicas utilizando azufre, tetrionato, hierro(II), sulfuros metálicos o compuesto orgánicos como fuentes de energía; pero también puede desarrollarse en condiciones anaeróbicas utilizando hierro(III) o azufre como aceptores electrónicos y azufre o hidrógeno como donores electrónicos. Es capaz de desarrollarse en condiciones autotróficas, aunque crece mejor en condiciones mixotróficas cuando se adiciona extracto de levadura al medio de cultivo. Se desarrolla en un rango de pH entre 1-5, con un pH óptimo entre 2,5-3,0. Su temperatura óptima de crecimiento es 75 °C, con un rango de temperatura de crecimiento entre 55 °C y 85 °C (Giaveno y col., 2013).

Las características de *A. copahuensis* son muy valiosas para el uso de esta especie en procesos de biolixiviación y biooxidación. Su capacidad azufre y hierro oxidante podría potenciar la lixiviación de sulfuros metálicos; como microorganismo termófilo podría incrementar la velocidad de disolución de metales y también permitir la solubilización de minerales refractarios. La capacidad de sobrevivir y crecer en un amplio de temperatura y valores de pH, e incluso en condiciones anaeróbicas, podrían hacer que esta especie juegue un rol importante en los ambientes creados en las pilas de biolixiviación. Hasta el momento los estudios con *A. copahuensis* se han centrado esencialmente en sus características. En este trabajo de tesis se profundizará el estudio de esta nueva especie incluyendo su posible aplicación en bioprocesos como la biolixiviación.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

En función del estado del arte, la **hipótesis general** de este trabajo es que la arquea termoacidófila *Acidianus copahuensis* será eficiente en procesos de biolixiviación de minerales regionales incluyendo aquellos que poseen especies refractarias. De este modo, el **objetivo general** de este trabajo de tesis consiste en analizar la capacidad biolixivante de la arquea *Acidianus copahuensis*. Esto incluye el estudio de diferentes aspectos de su interacción con la superficie mineral y la evaluación de su eficiencia en procesos de biolixiviación de minerales regionales.

Los **objetivos específicos** se detallan a continuación:

- ✓ Caracterizar la fisiología y morfología celular de *A. copahuensis* cultivada con diferentes fuentes de energía
- ✓ Analizar la adhesión de *A. copahuensis* sobre distintas superficies minerales y en distintas condiciones metabólicas
- ✓ Estudiar la adhesión y colonización y formación de biofilms por *A. copahuensis* sobre superficies de pirita y azufre
- ✓ Relacionar los fenómenos de adhesión formación de biofilms con la actividad biolixivante de *A. copahuensis*, en distintas condiciones metabólicas
- ✓ Estudiar la producción y composición de los EPS producidos por *A. copahuensis* en distintas condiciones metabólicas
- ✓ Analizar la interacción entre dos especies de arqueas, *A. copahuensis* y *S. metallicus*, en la colonización de minerales y actividad biolixivante

- ✓ Utilizar *A. copahuensis* en la biolixiviación de un mineral sulfurado regional, para incrementar la recuperación de cinc
- ✓ Evaluar la biolixiviación de cobre por *A. copahuensis* a partir de un concentrado de cobre refractario

Segundo capítulo

Interacción con la superficie mineral

Dentro de este capítulo, se discutirán en primer lugar los ensayos destinados a estudiar la flexibilidad metabólica de *A. copahuensis*. Para ello, se describen las experiencias donde se analizan las características fisiológicas y morfológicas de los cultivos de *A. copahuensis* desarrollados bajo distintas condiciones metabólicas.

Además, se estudiará la influencia de diferentes fuentes de energía en el crecimiento de *A. copahuensis*, en la adhesión sobre diferentes superficies minerales, en la formación de biofilms y en la producción de EPS.

2.1. Introducción

Durante muchos años los cultivos líquidos han constituido la forma de estudiar las características fisiológicas de los microorganismos. No obstante, este tipo de crecimiento dista considerablemente de representar el modo de vida de dichos microorganismos, ya que aproximadamente el 99% de las células existen adherida a la superficie (células sésiles) formando biofilms, y tan sólo el 1% vive libremente en soluciones acuosas (estado planctónico). Los biofilms pueden ser definidos como comunidades de microorganismos asociadas a superficies. La mayoría de las células secretan una matriz de EPS que mantiene unidos a los microorganismos entre sí formando agregados celulares y que, además, contribuye a la formación de los biofilms (Donlan, 2002; Stewart y Franklin, 2008).

La adhesión microbiana y el desarrollo de biofilms tienen lugar en una amplia variedad de ambientes y es esencial en el desarrollo de muchos fenómenos microbianos. Tan sólo como ejemplos, se puede mencionar que los biofilms son causantes de muchas enfermedades infecciosas bacterianas como endocarditis, neumonías, otitis e infecciones asociadas a implantes de dispositivos médicos, y que también son responsables de varios problemas en la industria como, por ejemplo, la biocorrosión y la contaminación de alimentos. Al mismo tiempo, los biofilms juegan un rol destacado en muchos fenómenos microbianos con efectos positivos, como la formación de biofilms bacterianos sobre las raíces de las plantas que permiten la fijación de nitrógeno o la placa dental que protege frente a la colonización por otros patógenos.

Los biofilms pueden contener una o múltiples especies microbianas y formarse sobre una amplia variedad de superficies, ya que en general, tan sólo se requiere un medio hidratado y una mínima cantidad de nutrientes para su desarrollo (O'Toole y col., 2000).

Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles. En ellos el comportamiento y la fisiología de los microorganismos es usualmente muy diferente a la de los microorganismos que crecen en medio líquido. Algunos estudios han demostrado que para ciertas especies microbianas, las células asociadas a biofilms experimentan adaptaciones fisiológicas que les permiten adherirse y desarrollarse sobre superficies; estos cambios incluyen la producción de organelas extracelulares (pilis, flagelos, etc.), modificaciones en la producción de EPS y cambios morfológicos (Stewart y Franklin, 2008).

Los biofilms comienzan a formarse cuando células individuales se adhieren a una superficie. La capacidad de los microorganismos para ejecutar esta etapa depende de la presencia de ciertos factores de adherencia cuya expresión está condicionada por factores ambientales como temperatura, pH, fuerza iónica y condiciones nutricionales, como así también de las propiedades del sustrato.

La síntesis de EPS resulta de gran importancia para la maduración de la mayoría de los biofilms microbianos ya que son primordiales para el mantenimiento de la estructura y la función de los biofilms. Se ha comprobado que la composición de los EPS es específica para cada especie microbiana y a su vez puede variar dependiendo de las condiciones en las cuales se lo haya cultivado. En general, los EPS están compuestos por una gran variedad de sustancias orgánicas: polisacáridos, ADN, lípidos, proteínas y enzimas (Orell y col., 2013). Los EPS pueden subdividirse en dos tipos: "EPS capsulares" que están fuertemente unidos a las células y "EPS coloidales" que están débilmente unidos a las células y pueden desprenderse fácilmente de ellas mediante centrifugación o lavado (Aguilera y col., 2008).

En el caso específico de los procesos de biolixiviación, los biofilms juegan un papel clave en la interacción microorganismo-mineral. En la mayoría de las bacterias lixiviantes, la adhesión a la superficie mineral está mediada principalmente por los EPS que rodean las células (Vera y col., 2013). Algunas especies, como *At. caldus*, no se adhieren a superficies minerales y requieren ser cultivadas conjuntamente con otras especies acidófilas que produzcan EPS para poder adherirse a las superficies (Florian y col., 2011). Para comprender el rol de estos microorganismos en los procesos de biolixiviación, resulta determinante estudiar y visualizar su adhesión y distribución sobre superficies minerales, así como analizar los posibles cambios morfológicos junto con la producción y composición de los EPS. Los procesos de adhesión, producción de EPS y formación de biofilms sobre superficies minerales, han sido estudiados principalmente en microorganismos mesófilos (Afzal Ghauri y col., 2007; Barahona y col., 2014; Bellenberg y col., 2014; Diao y col., 2014; Dong y col., 2013; Harneit y col., 2006; Zhang y col., 2014). En cambio, son pocos los trabajos que aportan información sobre estos procesos en el caso de las arqueas, especialmente, para aquellas que se desarrollan en condiciones ácidas y a elevadas temperaturas.

Por esta última razón, este trabajo de Tesis incluye esos estudios para la nueva especie de arquea *A. copahuensis* que fuera aislada de la zona geotermal de Caviahue-Copahue (provincia de Neuquén, Argentina). Debido a que la fuente de energía sobre la que crece un microorganismo puede tener una influencia decisiva sobre la generación de EPS y, eventualmente, sobre la adhesión y colonización de diversas superficies, resulta indispensable analizar previamente el efecto que distintas fuentes de energía pueden tener sobre el crecimiento de *A. copahuensis*. Como se indicó en la sección 1.8, algunas de las características más llamativas de *A.*

copahuensis son su capacidad de vivir en condiciones extremas de temperatura y de acidez y su gran flexibilidad metabólica. Esta especie puede crecer bajo condiciones heterotróficas, mixotróficas y autotróficas, y utilizando variedad de sustratos. En condiciones aeróbicas, puede crecer a expensas de la oxidación de hierro(II) o de compuestos reducidos de azufre (azufre, tetrionato, etc), así como de sulfuros metálicos (Giaveno y col., 2013). Hasta el momento no se han estudiado con detalle los cambios fisiológicos y morfológicos que *A. copahuensis* sufre al crecer bajo estas diferentes condiciones metabólicas. Precisamente, eso se analizará en los estudios de la primera parte de este capítulo, comparando los parámetros de crecimiento y la morfología celular en las distintas condiciones y también con la información disponible para otros microorganismos pertenecientes al mismo género.

En la segunda parte del capítulo, se estudiará la adhesión inicial de *A. copahuensis* sobre distintos minerales y cómo influye sobre ella la historia previa de las células, en particular, la fuente de energía sobre la que crecieron previamente. Luego se analizará la colonización, producción y composición de los EPS generados por *A. copahuensis* en distintas condiciones.

En la última parte del capítulo, se investigará la influencia de diferentes fuentes de energía en la formación de biofilms de *A. copahuensis* sobre distintas superficies y bajo distintas condiciones.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Superficies

2.2.1.1. Cupones de azufre

Se fundió azufre elemental en polvo y se esparció sobre un molde de vidrio de modo de obtener una superficie plana. Una vez enfriado y solidificado, se cortaron pequeños cupones de aproximadamente 0,5-1 cm² de superficie (Fig. 2.1). Estos cupones se esterilizaron en autoclave a 110 °C durante 30 min.

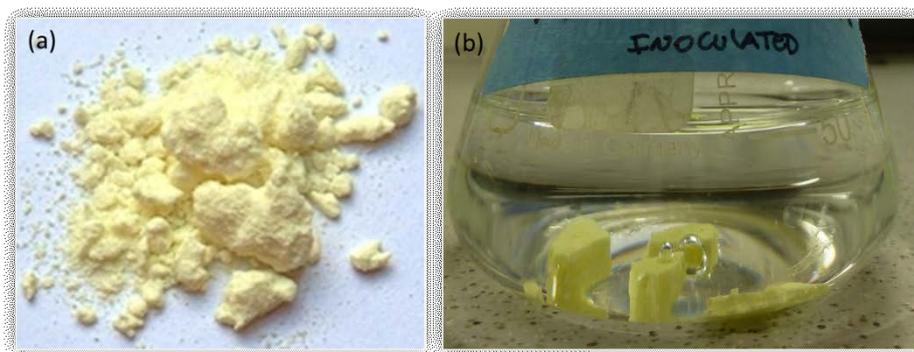


Figura 2.1. (a) azufre en polvo; (b) cupones de azufre dentro de los frascos utilizados en los experimentos.

2.2.1.2. Pirita

Mineral molido

Se utilizó una muestra de pirita proveniente de la mina Suior localizada en Maramures, Cavnic, Rumania (Fig. 2.2a). El mineral se redujo en tamaño mediante sucesivas etapas de molienda. Posteriormente fue tamizado para obtener una fracción de mineral con partículas entre 50-100

μm de diámetro (Fig. 2.2b). Mediante análisis BET se determinó un área específica del mineral de $0,201 \pm 0,002 \text{ m}^2/\text{g}$.

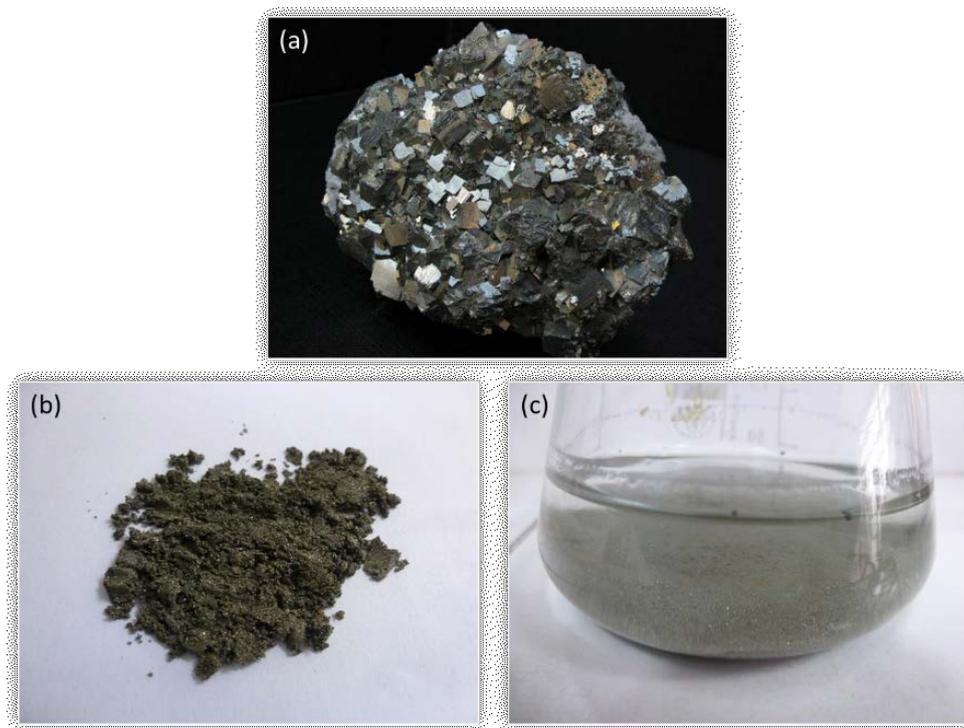


Figura 2.2. Pirita de la mina Suior (Maramures, Cavnic, Rumania). **(a)** pirita natural; **(b)** pirita molida (50-100 μm); **(c)** pirita molida dentro de los frascos utilizados en los experimentos.

Para eliminar los productos oxidados, la pirita fue sumergida en una solución de HCl 6M que se mantuvo en ebullición durante 30 minutos; posteriormente, fue enjuagada con agua destilada hasta neutralidad y lavada dos veces con acetona. Finalmente, se secó a 60 °C durante 10 minutos y se esterilizó durante 24 h a 120 °C. Se almacenó en atmósfera de nitrógeno hasta su utilización.

Cupones

Los cupones de pirita (aproximadamente 0,5 x 0,5 x 0,2 cm) se obtuvieron de cristales de pirita provenientes de la mina Victoria, localizada en Navajun, departamento de La Rioja, España (Fig. 2.3a). A partir de los cristales, se cortaron láminas delgadas de aproximadamente 1-2 mm de espesor utilizando un disco de diamante. Posteriormente, las láminas se seccionaron en trozos más pequeños, cupones (Fig. 2.3b), que se usaron en los ensayos (Fig. 2.3c). Los cupones se esterilizaron del mismo modo que la pirita molida (ver más arriba).

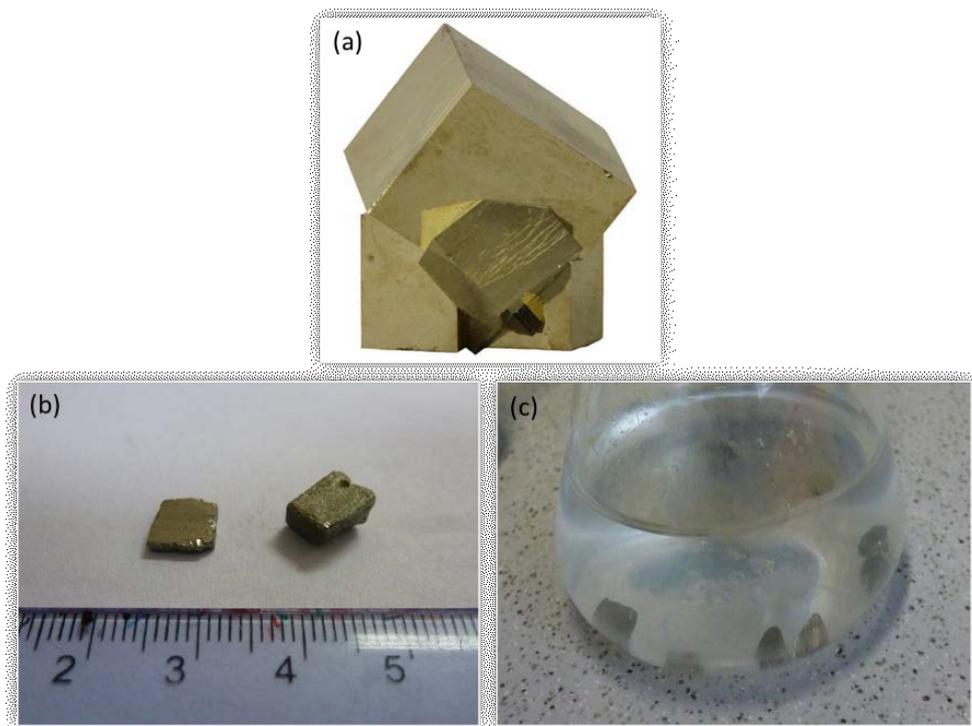


Figura 2.3. Pirita de la mina Victoria (Navajun, España) **(a)** cristales de pirita; **(b)** cupones de pirita; **(c)** cupones de pirita en los frascos utilizados en los experimentos.

2.2.1.3. Concentrado de Bajo La Alumbraera

Se utilizó muestra de mineral concentrado proveniente del yacimiento Bajo de la Alumbraera que explota Minera Alumbraera desde 1997 (Fig. 2.4). Este yacimiento se encuentra ubicado en el departamento de Belén, al noroeste de la provincia de Catamarca, Argentina, a una altura de 2600 m sobre el nivel del mar. El concentrado producido en la planta de tratamiento se caracteriza por ser refractario y presentar un alto contenido en cobre, oro y molibdeno.

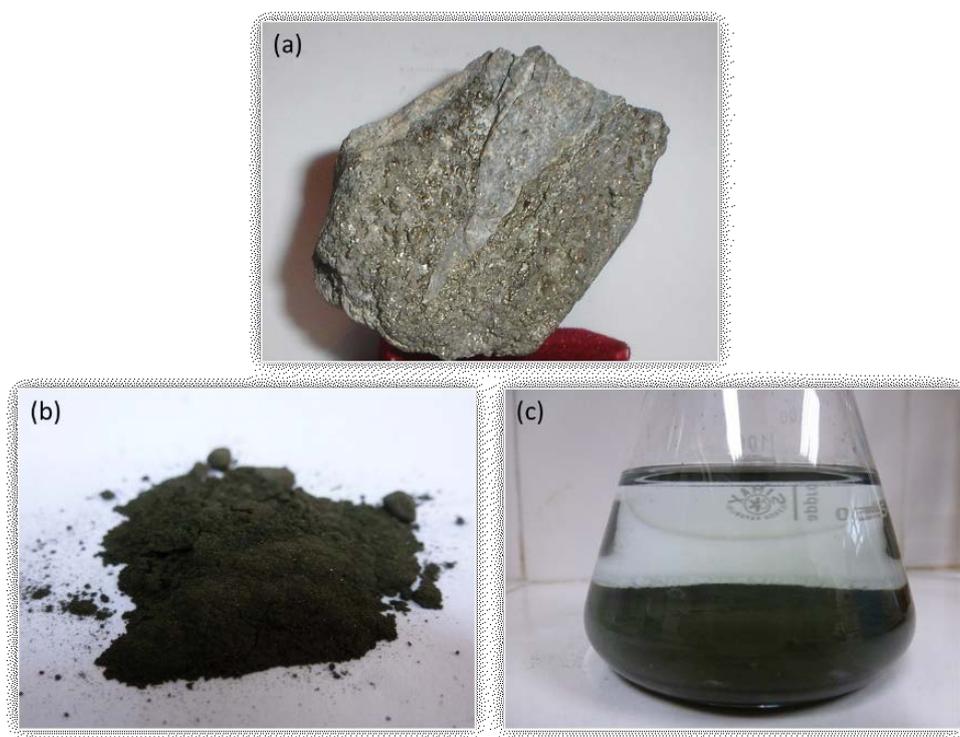


Figura 2.4. Mineral proveniente del yacimiento Bajo de la Alumbraera (Catamarca, Argentina) **(a)** mineral natural; **(b)** concentrado; **(c)** concentrado en los frascos utilizados en los experimentos.

Mediante un espectrofotómetro de emisión óptica asociada al plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se realizaron las determinaciones químicas de los principales elementos contenidos en esta muestra. En la Tabla 2.1 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 2.1. Composición química del concentrado de Bajo La Alumbraera

Au	Ag	Cu	Fe	Pb	Mo	Ni	Zn
%	%	%	%	%	%	%	%
0,002	0,02	24,20	31,15	0,26	0,76	0,002	0,56

Mediante difracción de rayos-X se determinó que los principales sulfuros presentes en el mineral son calcopirita, pirita, molibdenita y esfalerita. Se realizó la estimación cuantitativa del contenido de minerales presentes en la muestra mediante análisis Rietveld. En la Tabla 2.2 se muestra la composición mineralógica porcentual del concentrado.

Tabla 2.2. Composición mineralógica del concentrado de Bajo La Alumbraera

calcopirita	pirita	molibdenita	esfalerita
%	%	%	%
77,4	19,6	2,0	1,0

El diámetro de partículas del concentrado de fue menor a 62 μm . Mediante análisis BET se determinó un área específica del mineral de $5,36 \pm 0,03 \text{ m}^2/\text{g}$.

Previo a su utilización en los diferentes ensayos, el concentrado fue fraccionado en tubos de 2 mL estériles. Posteriormente se expuso tres veces consecutivas a pulsos de microondas durante 30 segundos.

2.2.1.4. Mineral de Hualilán

Se utilizaron muestras de mineral proveniente del yacimiento Hualilán, ubicado en el Departamento Ullum de la Provincia de San Juan (Argentina) y a 120 Km al nornoroeste de la ciudad de San Juan (Fig. 2.5).

Logan (2000) describió los principales componentes mineralógicos reconocidos en la zona primaria de este yacimiento: pirita aurífera, esfalerita, pirrotina, galena, calcopirita (escasa), electrum, magnetita, especularia, ilvaita y mackinawita; los piroxenos (hedembergita, cuarzo, calcita y granate) abundan en la ganga. En la zona de oxidación pueden encontrarse limonita aurífera, hematita, goethita, yeso, malaquita, escasa azurita, crisocola, smithsonita y pirolusita.

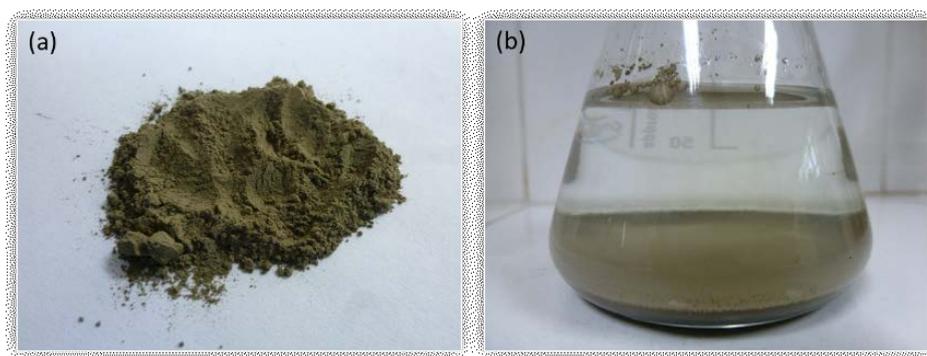


Figura 2.5. Mineral del yacimiento Hualilán, San Juan, Argentina. **(a)** mineral triturado, **(b)** mineral en los frascos utilizados en los experimentos.

Mediante ICP-OES se realizaron las determinaciones químicas de los principales elementos contenidos en la muestra con la que se realizaron los estudios descritos en este capítulo. En la Tabla 2.3 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 2.3. Composición química del mineral proveniente de Hualilán (San Juan, Argentina)

Au	Ag	As	Fe	Mn	Cd	Cu	Pb	S	Zn
ppm	ppm	ppm	%	%	ppm	ppm	ppm	%	%
25,6	190	95	8,1	1,3	476	1403	698	9,1	8,0

Las muestras de mineral se redujeron de tamaño en sucesivas etapas de trituración y molienda, hasta alcanzar un tamaño de partículas menor a 74 μm . Mediante análisis BET se determinó un área específica del mineral de $6,13 \pm 0,01 \text{ m}^2/\text{g}$.

Previo a su utilización en los ensayos de adhesión se realizó un curado ácido del mineral mediante el agregado de solución de H_2SO_4 0,5 M; este tratamiento es necesario para neutralizar los compuestos alcalinos que el mineral contiene y que incrementan significativamente el pH cuando el mineral es puesto en contacto con soluciones ácidas.

La esterilización se hizo de modo similar al utilizado con el concentrado de Bajo La Alumbraera.

2.2.2. Microorganismos y medio de cultivo

La cepa *A. copahuensis* ALE1 DSM 29038 (Giaveno y col., 2013) se mantuvo creciendo activamente en condiciones aeróbicas en medio de

cultivo MAC (Anexo I), bajo diferentes condiciones: autotróficas, mixotróficas y heterotróficas. En condiciones autotróficas el medio de cultivo se suplementó alternativamente con una de las siguientes fuentes de energía: 10 g/L de azufre elemental, 3 g/L de tetrionato de potasio, 6 g/L de hierro(II) (suplementado como sulfato ferroso) y 1 g/L de mineral (pirita, mineral de Hualilán o concentrado de Bajo La Alumbreira). En condiciones mixotróficas se utilizaron medios de cultivo con los mismos sustratos anteriormente mencionados, suplementados con 1 g/L de extracto de levadura. En condiciones heterotróficas, la cepa se mantuvo activa utilizando 1 g/L de glucosa o 1 g/L de extracto de levadura como fuentes de energía. El pH inicial del medio de cultivo se ajustó en un valor de 2,5 mediante el agregado de solución de H₂SO₄ 10 N; en el caso de los medios con mineral o hierro(II), para evitar precipitaciones inicialmente, se ajustó el pH en un valor de 1,5. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 65 °C y 150 rpm.

La conservación de los cultivos durante el período de trabajo se realizó mediante subcultivos seriados, resemebrando el microorganismo cada cierto tiempo en medio adecuado.

2.2.3. Cinéticas de crecimiento

Con el fin de analizar y estudiar el crecimiento de *A. copahuensis* bajo distintas condiciones metabólicas, se realizaron cinéticas de crecimiento en medio de cultivo líquido en las condiciones descritas en la sección 2.2. Los cultivos se inocularon al 10% con un cultivo de *A. copahuensis* en las mismas condiciones a evaluar. Cada condición se evaluó por duplicado.

Periódicamente, se tomaron alícuotas de 1 mL para monitorear el desarrollo de los cultivos. En cada muestra se determinó la población celular, a través de microscopía óptica, utilizando una cámara de recuento Thoma (Assistant, Alemania) (Anexo II), y el pH mediante el uso de un electrodo específico. En los cultivos suplementados con hierro(II) y pirita, se determinó la concentración de hierro(II) por el método espectrofotométrico de la *o*-fenantrolina (Anexo II) y la concentración de hierro total soluble a través de espectrofotometría de absorción atómica (Anexo II).

2.2.4. Análisis morfológico

Las estructuras celulares y características morfológicas de *A. copahuensis* se estudiaron mediante *microscopía electrónica de transmisión* (TEM) y *microscopía electrónica de barrido* (SEM). Los protocolos utilizados se describen en el Anexo III. Las dimensiones celulares se establecieron con el software ImageJ, utilizando, al menos, 10 imágenes de cada muestra.

2.2.5. Caracterización de la superficie celular

2.2.5.1. Hidrofobicidad

Las investigaciones que se han realizado sobre los mecanismos fundamentales que rigen el proceso de adhesión microbiana han demostrado que está mediado por las interacciones electrostáticas, las interacciones de van der Waals y las interacciones ácido-base de Lewis. Estas interacciones dependen en alguna medida de la hidrofobicidad de la superficie de las células.

La hidrofobicidad de la superficie celular de *A. copahuensis* en los distintos cultivos fue medida utilizando una variante de la técnica de

adhesión microbiana a solventes (Microbial Adhesion To Solvents, MATS) (Bellon-Fontaine y col., 1996; Rosenberg y col., 1980). Este método se basa en la comparación de la afinidad celular por un solvente monopolar/agua y un solvente apolar/agua; la condición es que ambos solventes tengan componentes de tensión superficial Lifshitz van der Waals similares. Para ello se eligieron cloroformo (un solvente ácido, aceptor de electrones) y hexadecano (un solvente no polar básico, donador de electrones).

Las suspensiones celulares se prepararon a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial. Los cultivos se filtraron y luego se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min. Las células fueron resuspendidas en buffer PUM (19,7 g /L K_2HPO_4 , 7,26 g/L KH_2PO_4 , 1,8 g/L H_2NCONH_2 , 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7) hasta obtener una suspensión celular de densidad óptica entre 0,3-0,4 a 400 nm. Posteriormente se mezclaron 1,2 mL de suspensión microbiana con 0,2 mL del solvente bajo estudio y se agitó vigorosamente en vórtex durante 90 s. La mezcla se dejó reposar durante 15 min para lograr la completa separación de las fases. Seguidamente se retiró cuidadosamente una muestra de la fase acuosa para medir la densidad óptica de la misma. El porcentaje de células adheridas al solvente se calculó teniendo en cuenta la disminución de la densidad óptica de la fase acuosa luego del tratamiento, comparada con el valor de la densidad óptica de la suspensión celular original. También se realizaron recuentos celulares antes y después del tratamiento con los solventes.

Las medidas se realizaron por triplicado empleando tres alícuotas de una misma suspensión microbiana para cada test de MATS y se hicieron controles empleando la solución PUM buffer.

2.2.5.2. Potencial zeta

La movilidad electroforética de las células de *A. copahuensis* se determinó a diferentes valores de pH con un equipo Brookhaven 90 Plus/Bi-MAS. Las medidas de potencial zeta se realizaron en suspensiones microbianas conteniendo 1×10^8 células/mL (previamente filtradas y lavadas con medio basal MAC) y 10^{-3} mol/L KCl.

2.2.6. Exopolímeros

2.2.6.1. Extracción de exopolímeros

La extracción de los EPS capsulares producidos por *A. copahuensis* se realizó a partir de cultivos batch de 500 mL. Para este ensayo se seleccionaron algunas de las condiciones de cultivo más representativas: medio suplementado alternativamente con tetrionato de potasio, glucosa, extracto de levadura, pirita o tetrionato de potasio y extracto de levadura. Las condiciones de cultivo se encuentran detalladas en la sección 2.2.1. Los cultivos en fase de crecimiento estacionaria se filtraron y luego centrifugaron a 5800 g durante 10 min. Se descartaron los sobrenadantes conteniendo EPS coloidal; la biomasa celular obtenida se resuspendió en 20 mL de buffer PBS (2 mM Na_3PO_4 , 4 mM NaH_2PO_4 , 9 mM NaCl, 1 mM KCl, pH 7). Estas suspensiones celulares, conteniendo la fracción de EPS capsulares, se incubaron con una resina de intercambio catiónico (CER) (DOWEX Marathon C, Sigma) previamente equilibrada en buffer PBS, durante 1 h a temperatura ambiente. Se utilizó una relación de volúmenes muestra/CER de aproximadamente 1:2 (Fig. 2.6a). Las células en PBS y la resina se mantuvieron agitadas a 100 rpm durante 4 h a 4 °C.

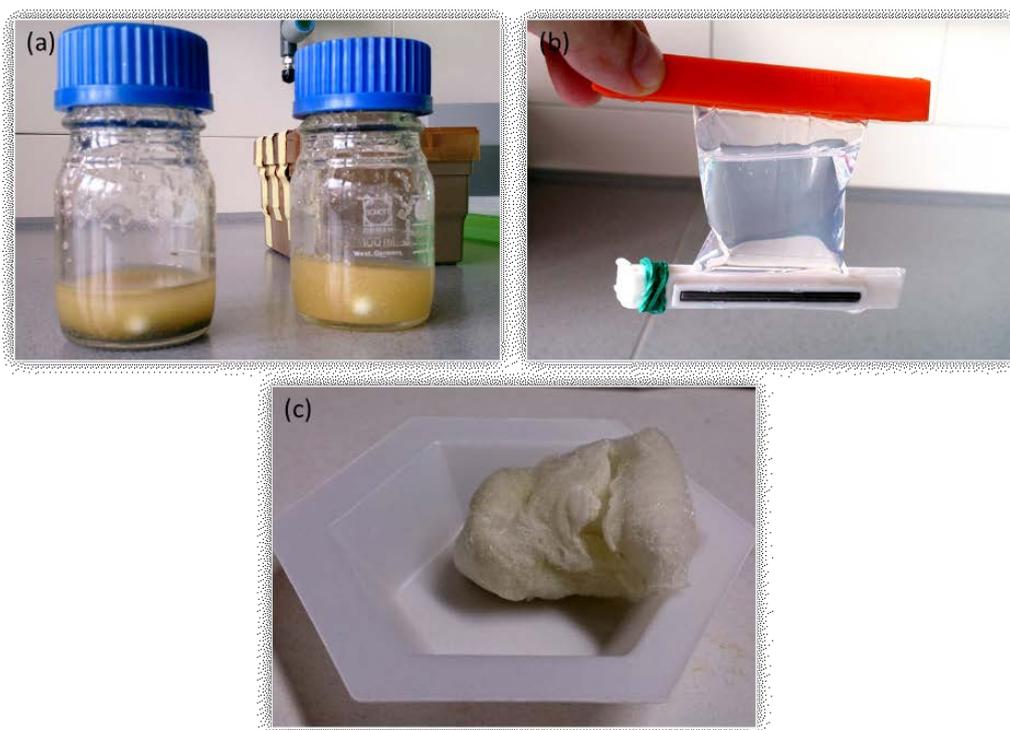


Figura 2.6. Extracción de EPS capsulares de *A. copahuensis*. **(a)** incubación de las suspensiones celulares con CER; **(b)** purificación de los extractos de EPS mediante diálisis; **(c)** EPS liofilizado.

Luego de la incubación se recuperó el extracto conteniendo EPS; la resina se lavó con 20 mL de PBS para incrementar la recuperación de EPS. EL PBS recuperado se centrifugó a 7500 g durante 10 min a 4 °C para eliminar los restos de resina y posteriormente se filtró a través de una membrana de 0,22 μm de diámetro de poro para eliminar las células remanentes. Finalmente, los extractos de EPS se purificaron mediante diálisis (3,5 KDa cutoff) realizada en 5 L de agua bidestilada durante 24 h a 4 °C (Fig. 2.6b). Las soluciones de EPS purificadas se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis. Todas las extracciones fueron realizadas por duplicado.

Las soluciones conteniendo EPS se liofilizaron para determinar el peso seco y analizar su composición (Fig. 2.6c).

2.2.6.2. Caracterización de los exopolímeros

Caracterización bioquímica

La caracterización de los EPS se realizó por triplicado utilizando reactivos de alto grado analítico. La composición bioquímica de los EPS se determinó mediante los siguientes métodos espectrofotométricos:

- ✓ El contenido de carbohidratos se determinó de acuerdo al método de Dubois (Dubois y col., 1956), utilizando glucosa como estándar. Las mezclas de reacción se prepararon en tubos de 1,5 mL mezclando 0,2 mL de muestra con 1 mL de ácido sulfúrico (98%). Luego, se adicionaron 0,2 mL de una solución acuosa de fenol 5% p/v a cada tubo y se agitó vigorosamente en vórtex durante 2 min. Se incubó a 30 °C durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 490 nm para determinar el contenido de carbohidratos.
- ✓ El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se mezclaron 0,1 mL de muestra con 1 mL del reactivo colorante Azul Brillante de Coomassie G-250. Se agitó en vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, se leyó la absorbancia a 595 nm, contrastando con un blanco de reactivos. La concentración de proteínas se calculó a partir de una curva patrón preparada con una solución de albúmina bovina sérica (BSA) de 1 a 10 mg/mL.
- ✓ El método Blumenkrantz y Absoe-Hansen (Blumenkrantz y Absoe-Hansen, 1973) se utilizó para determinar el contenido de ácidos urónicos en las muestras, usando ácido D-glucurónico como estándar. A 200 µL de muestra incubada en hielo se le adicionaron 1,2 mL de solución I (2,51 g/L de tetraborato de sodio en ácido

sulfúrico concentrado). Luego, se mezcló en vortex y se incubó a 100 °C durante 5 min. Las muestras se enfriaron en hielo y se agregaron 20 µL de solución II (1,5 mg/mL de β-hidroxibifenilo en hidróxido de sodio 0,5%). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min y finalmente se midió la absorbancia a 520 nm.

- ✓ La determinación de ácidos húmicos se realizó mediante un protocolo modificado del método de Lowry (Frolund y col., 1995), utilizando ácido húmico comercial (sigma-ALDRICH) como estándar. El reactivo de la reacción se preparó mezclado los siguientes compuestos en una relación 100:1:1, hidróxido de sodio (0,143 N) y carbonato de sodio (0,135 N) (solución A), tartrato de sodio (0,124 M) (solución B) y agua. Se mezclaron 0,5 mL de muestra con 0,7 mL del reactivo de reacción; luego, se incubó durante 20 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 0,1 mL de reactivo de Foulin diluido (1:2) y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 750 nm y sobre los valores obtenidos se realizaron las correcciones apropiadas debido a la interferencia de las proteínas.
- ✓ El DNA se midió utilizando un Nanodrop.
- ✓ La concentración de hierro se determinó mediante el método de o-fenantrolina.

Análisis por FTIR

Para caracterizar los grupos funcionales presentes en los EPS extraídos, 1 mg de cada muestra se mezcló y compactó con KBr para formar una pastilla. Las muestras se caracterizaron mediante Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) utilizando un espectrofotómetro Bruker IFS 66. Los espectros FTIR se realizaron entre un rango de número de onda entre 4000-300 cm^{-1} .

Caracterización con lectinas fluorescentes

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas capaces de unirse de forma específica y reversible a ciertos carbohidratos (libres o que formen parte de estructuras más complejas) sin alterar su estructura. Son herramientas útiles en el campo de la genética, biología e inmunología. Las lectinas han sido reportadas como sondas en estudios sobre biofilms microbianos (Castro y col., 2014; Neu y col., 2001; Peltola y col., 2008), incluso con microorganismos acidófilos (Africa y col., 2013; Bellenberg y col., 2012; Koerdt y col., 2010; Zhang y col., 2014). El uso de lectinas conjugadas con tetrametilrodamina (TRITC) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) permite la detección y visualización no destructiva de algunos de los componentes glicoconjugados presentes en los EPS producidos por los microorganismos.

Precisamente, se utilizaron diversas lectinas, cuyo origen y especificidad se encuentra en la Tabla 2.4, para analizar la composición de compuestos glicoconjugados presentes en los EPS producidos por células de *A. copahuensis*.

Las tinciones se realizaron en células planctónicas cultivadas mixotróficamente sobre azufre, hierro(II) y pirita, y también sobre células sésiles adheridas a cupones de pirita. Las células planctónicas de cultivos en fase de crecimiento exponencial se filtraron y retuvieron en membranas de 0,22 μm de diámetro de poro. Las membranas se cortaron en pequeños fragmentos que posteriormente se tiñeron con DAPI y con las diferentes lectinas fluorescentes como se describe en el Anexo III. De modo similar, la tinción de células sésiles de los cultivos sobre pirita se realizó utilizando cupones de pirita incubados durante 5 días. El procedimiento para la tinción de las células y los EPS con las diferentes lectinas fue el mismo que el utilizado para las células planctónicas. Finalmente las muestras se visualizaron mediante *microscopía de epifluorescencia* (EFM).

Tabla 2.4. Lectinas utilizadas para analizar la composición de EPS producidos por *A. copahuensis*

Lectina/sigla	Fuente	Especificidad
Concanavalina A ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -glucosa; α -manosa
Aglutinina <i>Erythrina cristagalli</i> ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	galactosa galactosil (β -1,4) N-acetilglucosamina
Aglutinina de maní PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -galactosa terminal
Hemaglutinina de lenteja LcH	<i>Lens culinaris</i>	α -manosa, α -glucosa, α -D-N-acetil-glucosa, maltosa
Aglutinina de germen de trigo WGA	<i>Triticum vulgare</i>	N-acetil-glucosamina
Aglutinina de soja SBA	<i>Glycine max</i>	α y β -N-acetilglucosamina, residuos galactopiranosil
Aglutinina de <i>Ulex europaeus</i> UEA I	<i>Ulex europaeus</i>	α -1,2 fucosa
Mitógeno de <i>Phytolacca americana</i> PWM	<i>Phytolacca americana</i>	GlcNAc (b1,4) GlcNAc, [Gal-(b1,4) GlcNAc] ₂
Isolectina de <i>Bondeiraea simplicifolia</i> BSI	<i>Bondeiraea simplicifolia</i>	residuos α -D-galactosil, residuos N-acetil- α -D-galactodaaminil
Aglutinina E de <i>Phaseolus vulgaris</i> PHA-E	<i>Phaseolus vulgaris</i>	N-acetil-galactosa

2.2.7. Adhesión inicial sobre diferentes minerales

Los inóculos para los ensayos de adhesión se prepararon a partir de cultivos de *A. copahuensis* creciendo bajo condiciones heterotróficas (glucosa) o mixotróficas sobre distintas fuentes de energía (hierro(II), azufre o tetratiónato de potasio, suplementados con extracto de levadura) mientras que el resto de las condiciones fueron aquellas descritas en la sección 2.2.2. Los cultivos se filtraron y las células fueron cosechadas por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min; posteriormente, las células fueron lavadas dos veces mediante el agregado de medio basal y centrifugación. El pellet de células se resuspendió en medio basal MAC sin fuente de energía y se usó directamente como inóculo para los ensayos.

En estos ensayos se estudió la adhesión de *A. copahuensis* sobre pirita, sobre mineral de Hualilán y sobre el concentrado de Bajo de la Alumbrera, que ya fueron descriptos en la sección 2.2.1.

Los experimentos de adhesión se realizaron en frascos Erlenmeyers de 100 mL que contenían 50 mL de medio basal MAC de pH 2 estéril y 5 g de mineral. Los frascos se inocularon de modo de alcanzar una población inicial de 5×10^8 células/mL. Los frascos se mantuvieron a 65 °C y en agitación a 150 rpm. Durante la experiencia se tomaron muestras de 1 mL de sobrenadante a los 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 240, 300, 360 y 420 min. Sobre estas muestras se realizaron recuentos de células planctónicas mediante microscopía de contraste de fases utilizando una cámara de recuento celular Thoma (Anexo II). La cantidad de células adheridas a la superficie mineral se calculó como la diferencia entre el número de células inicialmente inoculadas y el número de células planctónicas. Se realizaron controles inoculados pero sin mineral para determinar la adhesión inespecífica a las paredes de vidrio del recipiente. Cada condición se realizó por triplicado.

2.2.8. Colonización y formación de biofilms

Los inóculos para esta experiencia se obtuvieron a partir de cultivos de *A. copahuensis* creciendo bajo condiciones mixotróficas sobre distintas fuentes de energía (hierro(II), azufre, tetrionato de potasio o pirita, suplementados con extracto de levadura) en las condiciones descriptas en la sección 2.2.2. Los inóculos se prepararon del mismo modo que para los ensayos de adhesión inicial, detallados anteriormente en la sección 2.2.7.

La colonización y formación de biofilms de *A. copahuensis* se estudió sobre cupones de pirita y azufre (ver más detalles de la preparación de las superficies en la sección 2.2.1).

Los experimentos de colonización y formación de biofilms se realizaron en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo MAC pH 2 estéril (sin fuente de energía) y 6 cupones (de pirita o azufre). Los frascos se inocularon de modo de obtener una población microbiana inicial de aproximadamente 10^8 células/mL. Los frascos se incubaron a 65 °C y en agitación a 150 rpm. Los ensayos se realizaron por duplicado y se llevaron a cabo los correspondientes controles estériles, reemplazando el volumen de inóculo por medio de cultivo MAC estéril.

A diferentes tiempos (1, 3 y 6 días), se recolectaron dos cupones de cada frasco, se lavaron con agua destilada estéril libre de partículas (previamente filtrada con filtros de 0,22 μm de diámetro de poro y esterilizada) para remover las células planctónicas (no adheridas) que pudieran estar sobre la superficie y también para eliminar compuestos del medio que puedan interferir en la posterior tinción. Las células adheridas a la superficie de los cupones se tiñeron con DAPI y los EPS con la lectina ConA, siguiendo el protocolo descrito en el Anexo III. Los cupones se visualizaron mediante EFM.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Cinéticas de crecimiento

Las curvas de crecimiento de *A. copahuensis* en medios suplementados con azufre se muestran en la Figura 2.7. Tanto en condiciones autotróficas (Fig. 2.7a) como mixotróficas (Fig. 2.7b), *A. copahuensis* es capaz de crecer a expensas de la oxidación de azufre elemental. En presencia de azufre como única fuente de energía, *A. copahuensis* alcanzó una concentración celular de 5×10^8 células/mL; mientras que en condiciones mixotróficas la concentración celular lograda fue prácticamente el doble, $1,1 \times 10^9$ células/mL.

El crecimiento celular en presencia de azufre estuvo acompañado de un descenso de pH, debido a la generación de ácido sulfúrico por oxidación de azufre elemental (Ec. 2.1)



La adición de extracto de levadura permitió un mejor crecimiento de *A. copahuensis* y una cinética de biooxidación de azufre más rápida, alcanzándose incluso valores de pH más bajos.

La oxidación aeróbica de azufre es una característica común de las especies de arqueas pertenecientes al orden *Sulfolobales*, dentro del filo *Crenarchaeota*. La oxidación aeróbica de azufre elemental ha sido estudiada utilizando *A. ambivalens* como organismo modelo (Kletzin, 2008). En el paso inicial de la oxidación de azufre interviene una enzima azufre oxigenasa/reductasa citoplasmática (SOR), que cataliza la disrupción de azufre para producir sulfito y ácido sulfhídrico a expensas de oxígeno, tal cual muestra la ecuación 2.2. Luego, mediante una reacción no enzimática, el azufre y el sulfito se combinan para producir tiosulfato (Ec. 2.3).

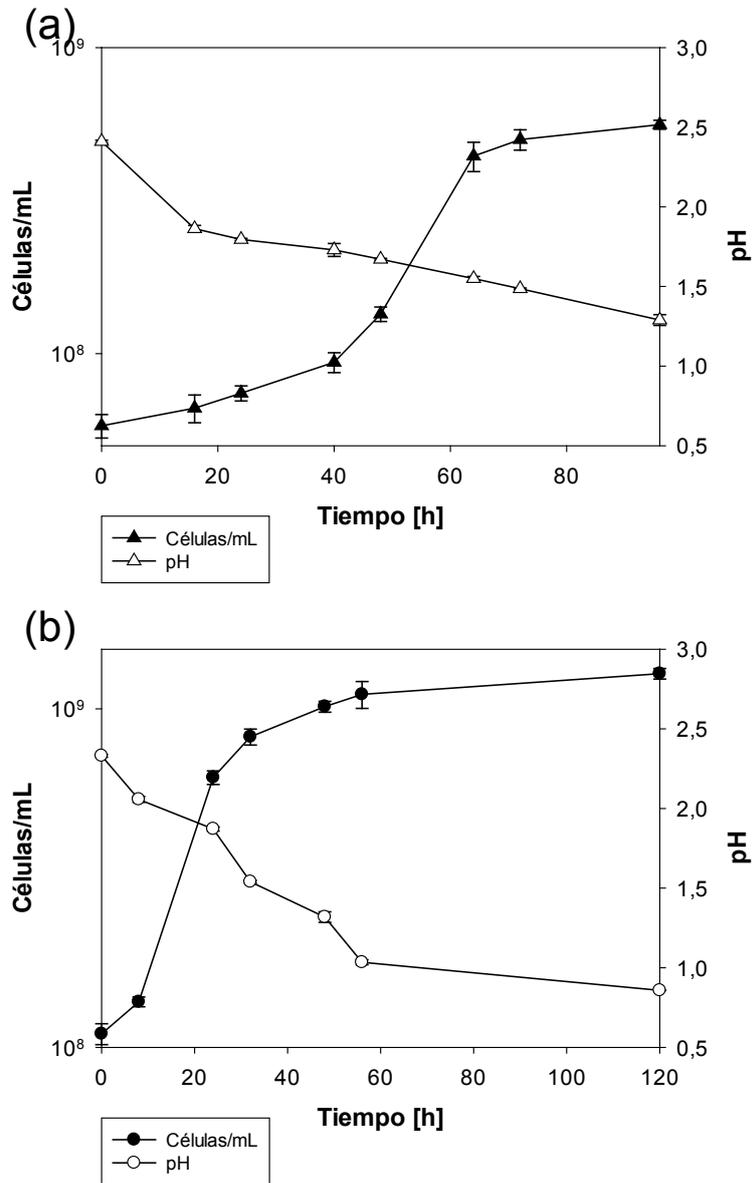
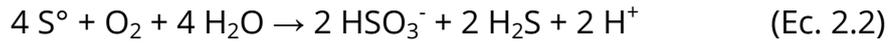


Figura 2.7. Cinética de crecimiento de *A. copahuensis* en medios suplementados con azufre bajo **(a)** condiciones autotróficas; **(b)** condiciones mixotróficas.

Los productos generados en el primer paso de oxidación (ácido sulfhídrico, sulfito y tiosulfato) son presumiblemente oxidados a sulfato (Kletzin, 2008), aunque sólo se ha caracterizado la vía de oxidación de tiosulfato a nivel molecular en *A. ambivalens*. Se conoce que en esta vía intervienen dos complejos enzimáticos de membrana. El primer complejo, tiosulfato quinona oxidoreductasa (TQO), cataliza la oxidación de tiosulfato a tetratiónato utilizando una quinona como aceptor electrónico (Müller y col., 2004). El segundo complejo de esta vía es el complejo quinol oxidasa terminal que transfiere los electrones a través de la cadena transportadora de electrones desde la quinona al oxígeno que actúa como aceptor final. Este complejo también interviene en la translocación de protones a través de la membrana citoplasmática (Liu y col., 2012).

Algunos genes de enzimas claves involucradas en las rutas de oxidación de azufre, como SOR y el complejo TQO, han sido detectados en el genoma de *A. copahuensis* (Urbieta y col., 2014). Algunas subunidades homólogas del complejo TQO también están presentes en genomas de otras especies de crenarchaeotas como *S. solfataricus*, *S. tokodaii*, *M. sedula*, *Acidilobus saccharovorans*, *Vulcanisaeta distributa* y *Vulcanisaeta moutnovskia*, en la euryarchaeota *Picrophilus torridus* y en la bacteria *At. ferrooxidans* (Liu y col., 2012).

En la Figura 2.8 se muestra la cinética de crecimiento de *A. copahuensis* utilizando tetratiónato como fuente de energía, bajo condiciones autotróficas y mixotróficas. El crecimiento de *A. copahuensis* sobre tetratiónato fue más lento que sobre azufre, principalmente bajo condiciones autotróficas.

Bajo condiciones autotróficas, la máxima concentración celular alcanzada fue aproximadamente 3×10^8 células/mL luego de 288 h de

incubación. En cambio, bajo condiciones mixotróficas, se alcanzó una mayor población celular (aproximadamente 7×10^8 células/mL) en un menor tiempo de incubación (168 h).

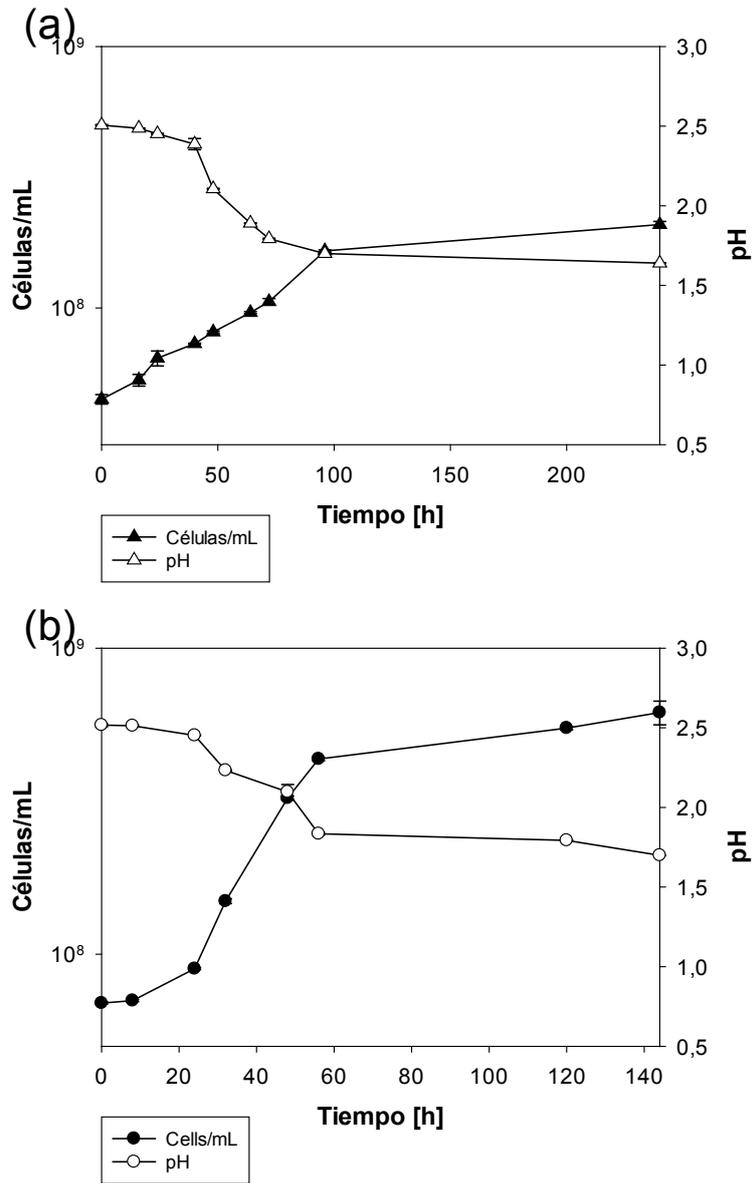
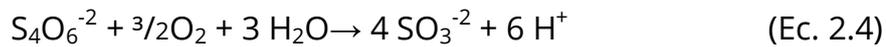


Figura 2.8. Cinética de crecimiento de *A. copahuensis* en medios suplementados con tetrionato bajo **(a)** condiciones autotróficas; **(b)** condiciones mixotróficas.

El crecimiento celular estuvo acompañado de una disminución del pH debido a la oxidación de tetrionato, que está representado por las ecuaciones 2.4 y 2.5. Los cultivos alcanzaron similares valores de pH (aproximadamente 1,6) aunque el crecimiento fue mucho más rápido bajo condiciones mixotróficas.



La vía metabólica de oxidación de tetrionato no ha sido completamente dilucidada. Protze y col (2011) reportaron la presencia de una tetrionato hidrolasa en *A. ambivalens* involucrada en el metabolismo de tetrionato. Esta enzima produce sulfato, tiosulfato y azufre elemental. En el mismo trabajo se indica que la enzima SOR cumple un rol importante cuando *A. ambivalens* crece en tetrionato, presumiblemente consumiendo el azufre generado por la acción de la tetrionato hidrolasa. Aunque hasta el momento no ha sido confirmado, es posible que *A. copahuensis* utilice un mecanismo similar que se refleja en la disminución de pH observada en sus cultivos sobre tetrionato.

A. copahuensis demostró su capacidad de crecer a expensas de la oxidación de hierro(II) (Fig. 2.9). Dentro del género *Acidianus*, esta característica es sólo compartida con algunas de las especies: *A. brierleyi*, *A. sulfidivorans* y *A. manzaensis* (Wheaton y col., 2015).

Los cultivos suplementados con hierro(II) bajo condiciones autotróficas no pudieron ser mantenidos más de tres repiques consecutivos; por esta razón sólo se estudió la cinética de crecimiento en condiciones mixotróficas. En estas condiciones el crecimiento celular estuvo acompañado por la disminución de la concentración de hierro(II) en solución debido a su oxidación representada por la siguiente ecuación



La oxidación de hierro(II) fue casi completa luego de 32 h de incubación, alcanzándose una población microbiana de aproximadamente 7×10^8 células/mL. Inicialmente se observó un aumento del pH debido al consumo de protones en el proceso de oxidación de hierro(II) a hierro(III). Luego, el pH descendió seguramente debido a la hidrólisis y precipitación de compuestos férricos.

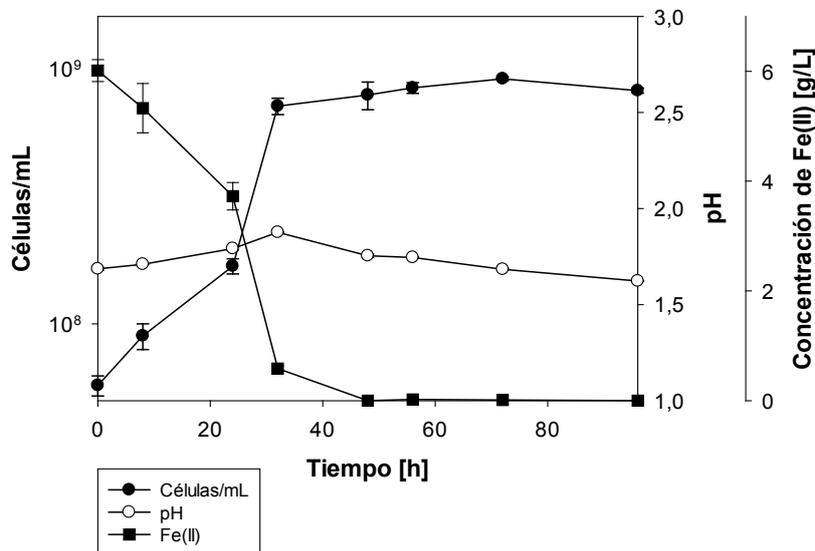


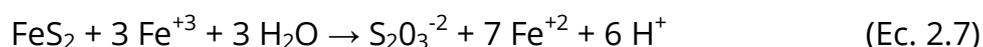
Figura 2.9. Cinética de crecimiento de *A. copahuensis* en medios suplementados con hierro(II) bajo condiciones autotróficas.

Las especies pertenecientes al orden *Sulfolobales* no poseen la misma vía de oxidación de hierro(II) que las bacterias mesófilas como *At. ferrooxidans*. Actualmente, sólo existen modelos hipotéticos de oxidación de hierro(II) para especies de arqueas pertenecientes al género *Metallosphaera*, basados en estudios de expresión, modelado y análisis genómico comparativo. Es probable que el grupo de genes *fox* esté involucrado

directamente en la oxidación de hierro(II) en sulfolobales (Wheaton y col., 2015). Precisamente, este grupo de genes se detectó en el genoma de *A. copahuensis* (Urbieta y col., 2014).

En la Figura 2.10 se muestra la cinética de crecimiento de *A. copahuensis* en medios suplementados con pirita. Durante las primeras 8 h de cultivo se observó una disminución del número de células en solución debido, seguramente, a la adhesión de los microorganismos sobre la superficie mineral. La multiplicación posterior justifica el aumento de células en la suspensión. Bajo condiciones mixotróficas, la fase de crecimiento exponencial se extendió hasta las 72 h de incubación, alcanzándose una población de 1×10^9 células/mL; bajo condiciones autotróficas las células continúan dividiéndose activamente hasta las 168 h de cultivo aunque alcanzando una población algo menor: 8×10^8 células/mL.

Durante el crecimiento sobre pirita, la concentración de hierro total en solución aumentó debido a la disolución de la pirita que está representada por la ecuación 2.7. En ambas condiciones, el crecimiento celular estuvo acompañado de una disminución de pH posiblemente debido a la oxidación de la pirita. Este descenso fue más rápido y levemente mayor bajo condiciones mixotróficas.



El crecimiento de *A. copahuensis* en medios suplementados con pirita fue favorecido con la adición de extracto de levadura al medio de cultivo. En estas condiciones se obtuvo un mayor y más rápido crecimiento que bajo condiciones autotróficas.

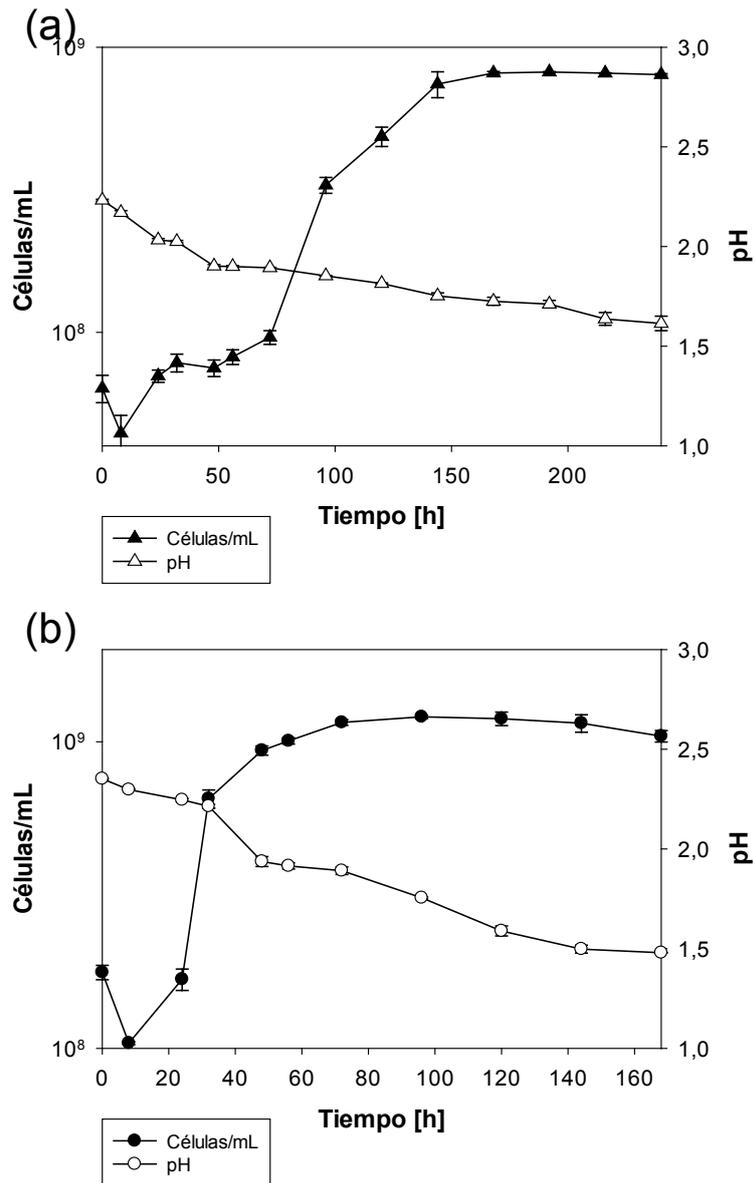


Figura 2.10. Cinética de crecimiento de *A. copahuensis* en medios suplementados con pirita en **(a)** condiciones autotróficas; **(b)** condiciones mixotróficas.

El crecimiento de *A. copahuensis* bajo condiciones heterotróficas se analizó utilizando medios de cultivos suplementados con extracto de levadura o glucosa. La Figura 2.11 muestra las cinéticas de crecimiento en estas condiciones.

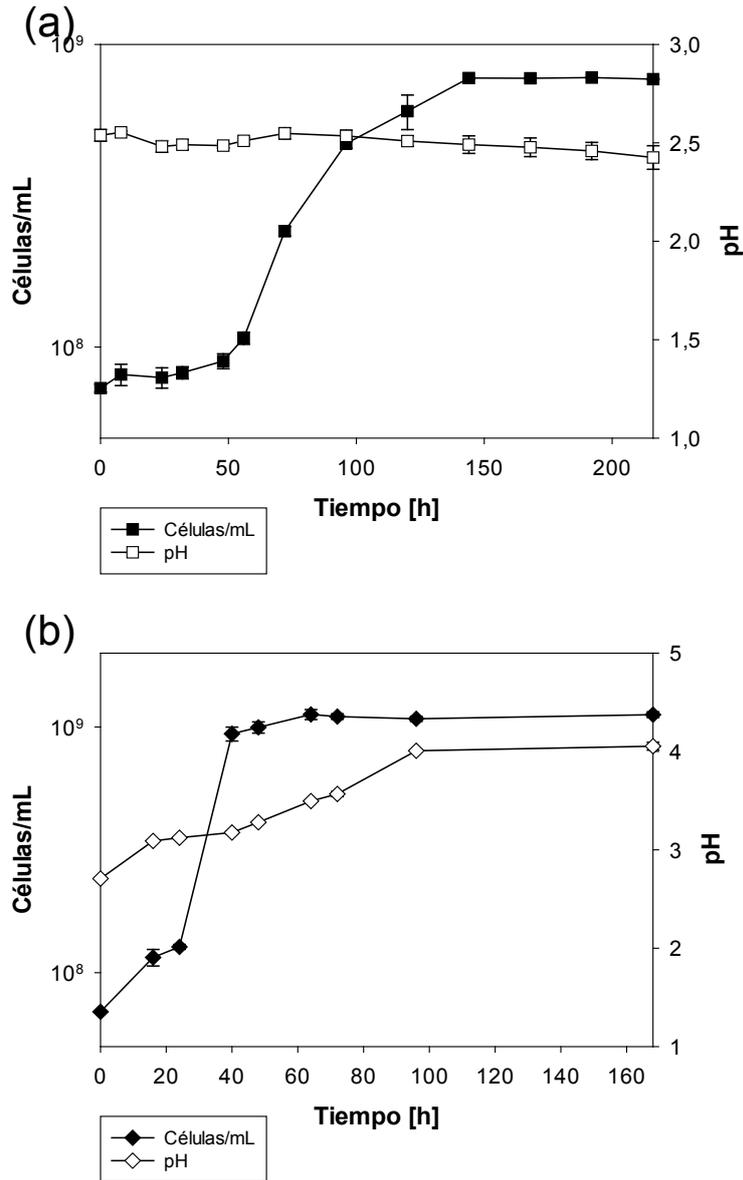


Figura 2.11. Cinética de crecimiento de *A. copahuensis* bajo condiciones heterotróficas en **(a)** medios suplementados con glucosa; **(b)** medios suplementados con extracto de levadura.

En presencia de glucosa se observó una fase lag de crecimiento de aproximadamente 48 h. Luego de 144 h de cultivo, se alcanzó la máxima concentración celular de $7,7 \times 10^8$ células/mL. En los medios suplementados

con extracto de levadura, no se observó fase de crecimiento lag, alcanzándose en 48 h una población microbiana de 1×10^9 células/mL.

2.3.2. Características morfológicas

Debido a las características pleomórficas que presenta *A. copahuensis*, se estudiaron los posibles efectos de la fuente de energía sobre la morfología celular. Usualmente el diámetro de las células de esta especie varía considerablemente en una misma muestra y la estimación del tamaño tomando como referencia dicho parámetro puede ser inexacta. Por este motivo, el tamaño de las células de *A. copahuensis* se comparó tomando como referencia el área celular. En la Tabla 2.5 se resumen las medidas celulares para células *A. copahuensis*, cultivadas sobre diferentes sustratos.

Tabla 2.5. Parámetros celulares de *A. copahuensis* bajo distintas condiciones metabólicas

Condición de crecimiento	Área celular total (μm^2)	Espesor de la envoltura (μm)	Área de la envoltura (μm^2)	Relación envoltura/Área celular (%)
Azufre	$1,4 \pm 0,5$	$0,076 \pm 0,008$	$0,26 \pm 0,09$	19 ± 3
Azufre y extracto de levadura	$0,8 \pm 0,1$	$0,039 \pm 0,002$	$0,12 \pm 0,02$	15 ± 1
Tetrationato	$1,3 \pm 0,5$	$0,045 \pm 0,005$	$0,16 \pm 0,05$	12 ± 2
Tetrationato y extracto de levadura	$1,2 \pm 0,3$	$0,034 \pm 0,003$	$0,14 \pm 0,04$	12 ± 2
Hierro(II) y extracto de levadura	$1,1 \pm 0,2$	$0,035 \pm 0,003$	$0,17 \pm 0,04$	15 ± 4
Pirita	$1,3 \pm 0,4$	$0,043 \pm 0,005$	$0,19 \pm 0,04$	15 ± 5
Pirita y extracto de levadura	$1,2 \pm 0,2$	$0,035 \pm 0,002$	$0,15 \pm 0,03$	13 ± 4
Glucosa	$0,9 \pm 0,3$	$0,039 \pm 0,005$	$0,12 \pm 0,04$	13 ± 1

Dentro de un mismo cultivo se observaron diferentes formas pleomórficas, que es bastante común para arqueas ya que tienen una membrana lipídica fluida y carecen de pared celular. En los cultivos autotróficos sobre azufre, las células mostraron una morfología más regular, de tipo ovalada (Fig. 2.12).

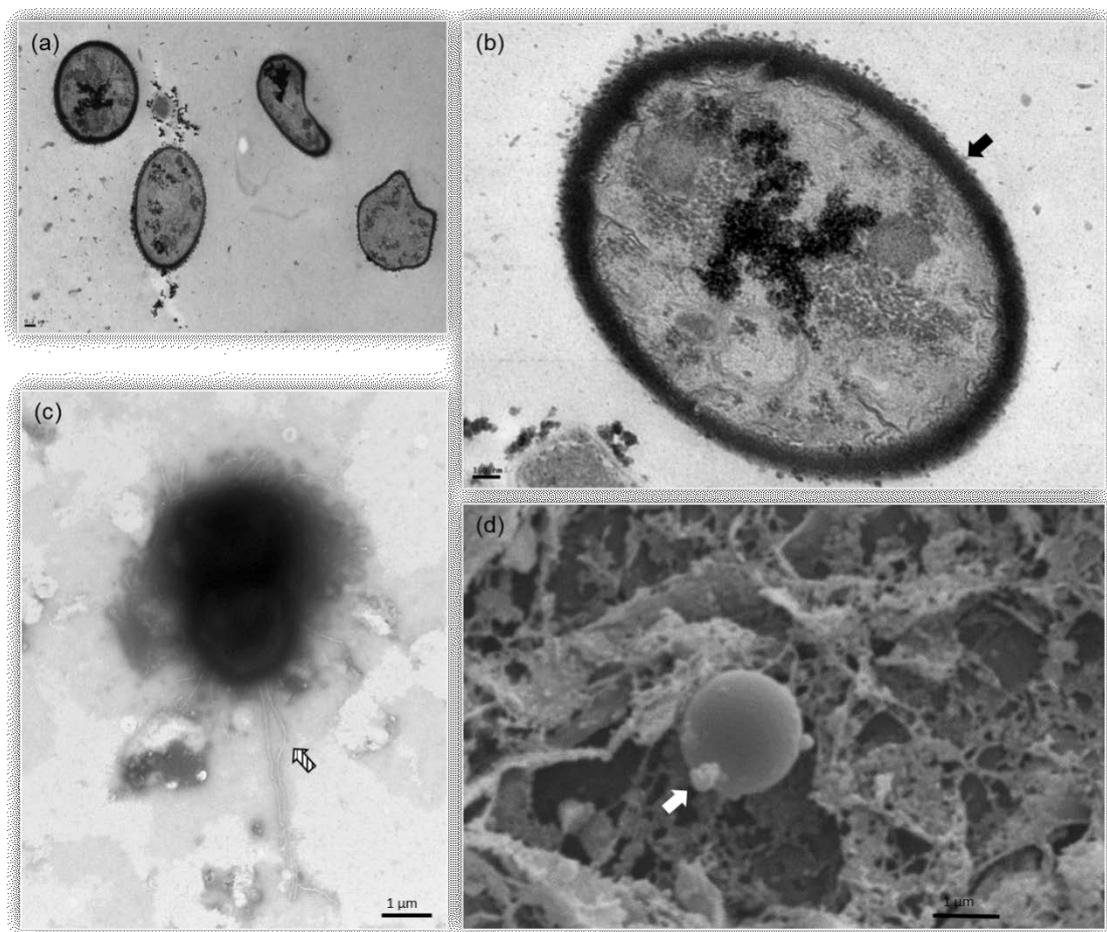


Figura 2.12. Células de *A. copahuensis* cultivadas bajo condiciones autotróficas con azufre. **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** tinción negativa; **(d)** imagen SEM. La envoltura celular, apéndices extracelulares y restos de EPS se señalan con flechas negra, rayada y blanca, respectivamente.

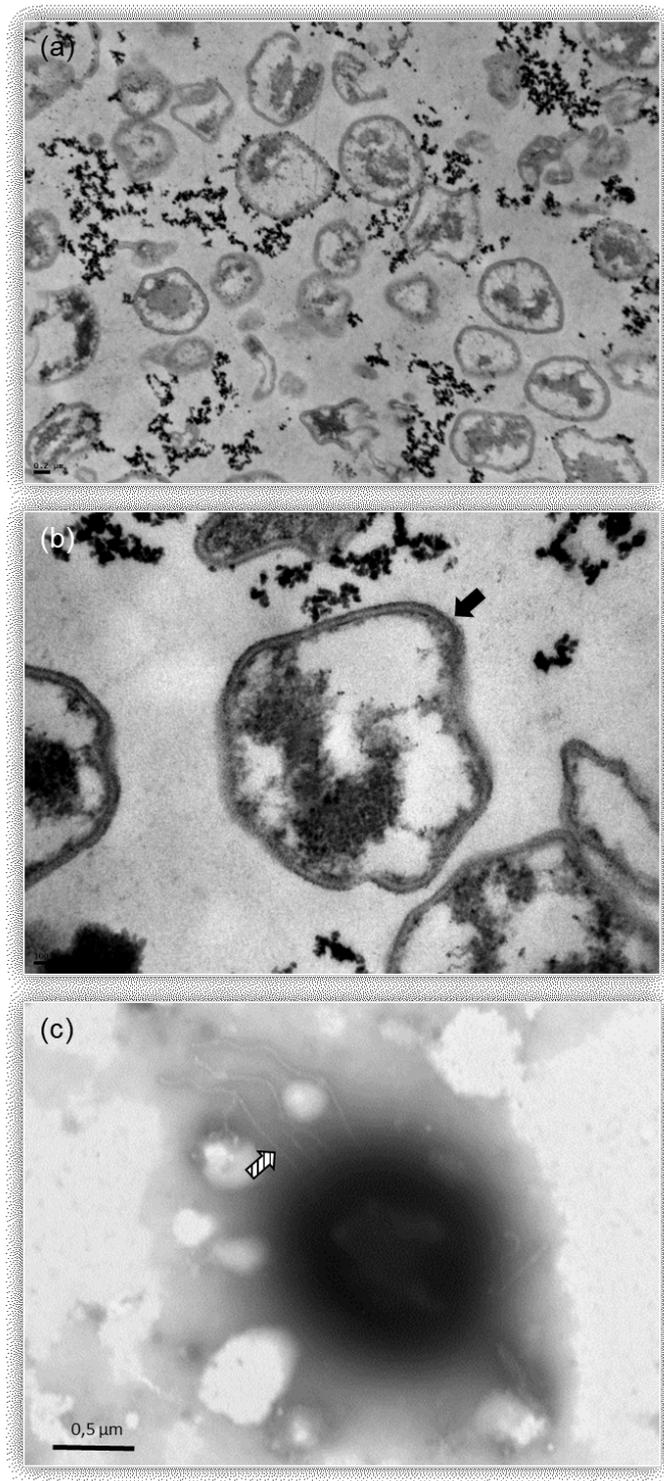


Figura 2.13. Células de *A. copahuensis* cultivadas bajo condiciones mixotróficas con azufre. **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** tinción negativa. La envoltura celular y apéndices extracelulares se señalan con flechas negra y rayada, respectivamente.

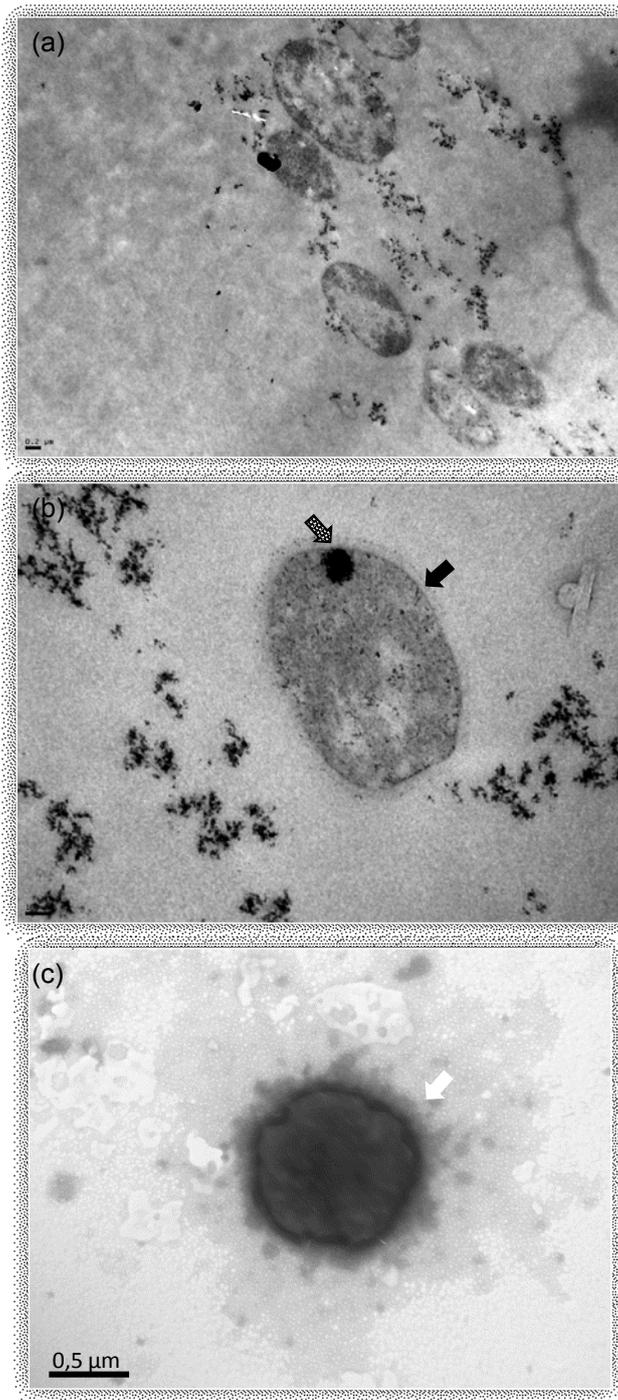


Figura 2.14. Células de *A. copahuensis* cultivadas bajo condiciones autotróficas con tetrionato. **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** tinción negativa. La envoltura celular, restos de EPS e inclusiones intracelulares se señalan con flechas negra, blanca y con lunares, respectivamente.

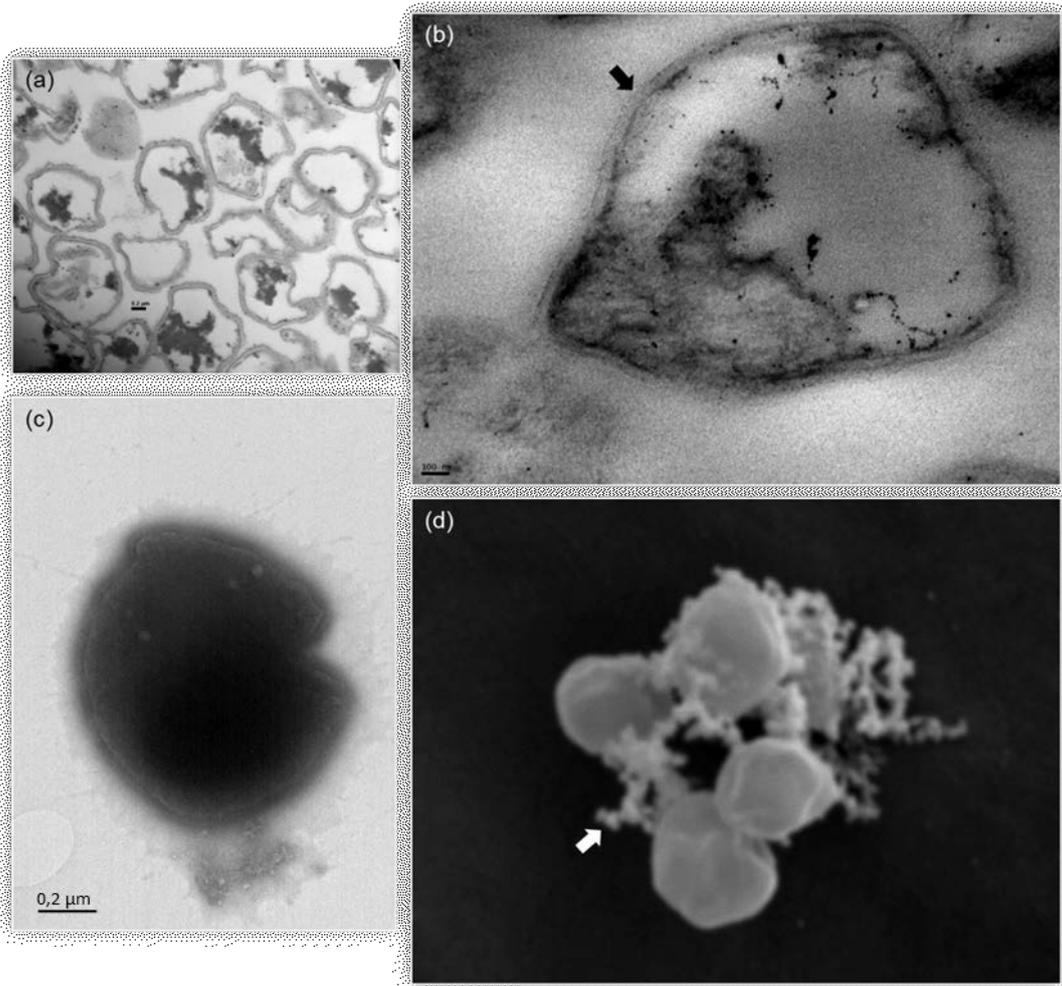


Figura 2.15. Células de *A. copahuensis* cultivadas bajo condiciones mixotróficas con tetrionato. **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** tinción negativa; **(d)** imagen SEM. La envoltura celular y restos de EPS se señalan con flechas negra y blanca, respectivamente.

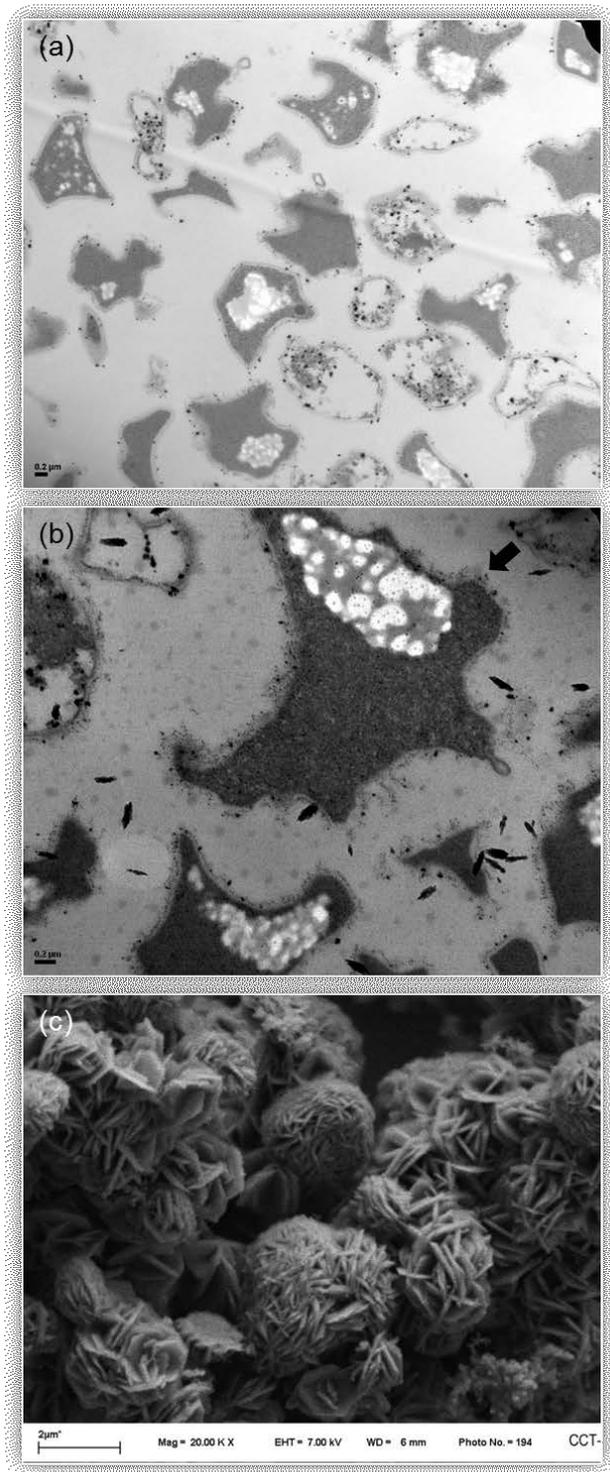


Figura 2.16. Células de *A. copahuensis* cultivadas bajo condiciones mixotróficas con hierro(II). **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** imagen SEM de precipitados de hierro. La flecha negra señala la envoltura celular.

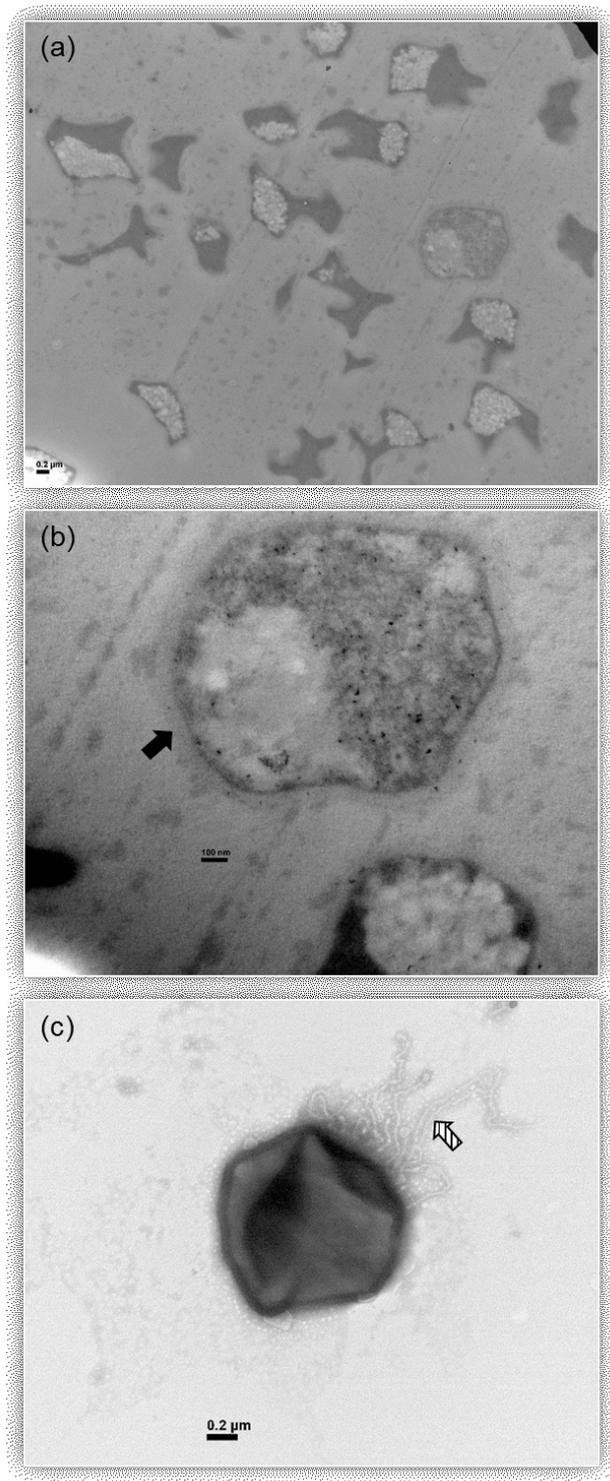


Figura 2.17. Células de *A. copahuensis* cultivadas en condiciones autotróficas con pirita. **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** tinción negativa. La envoltura celular y restos apéndices extracelulares se señalan con flechas negra y rayada, respectivamente.

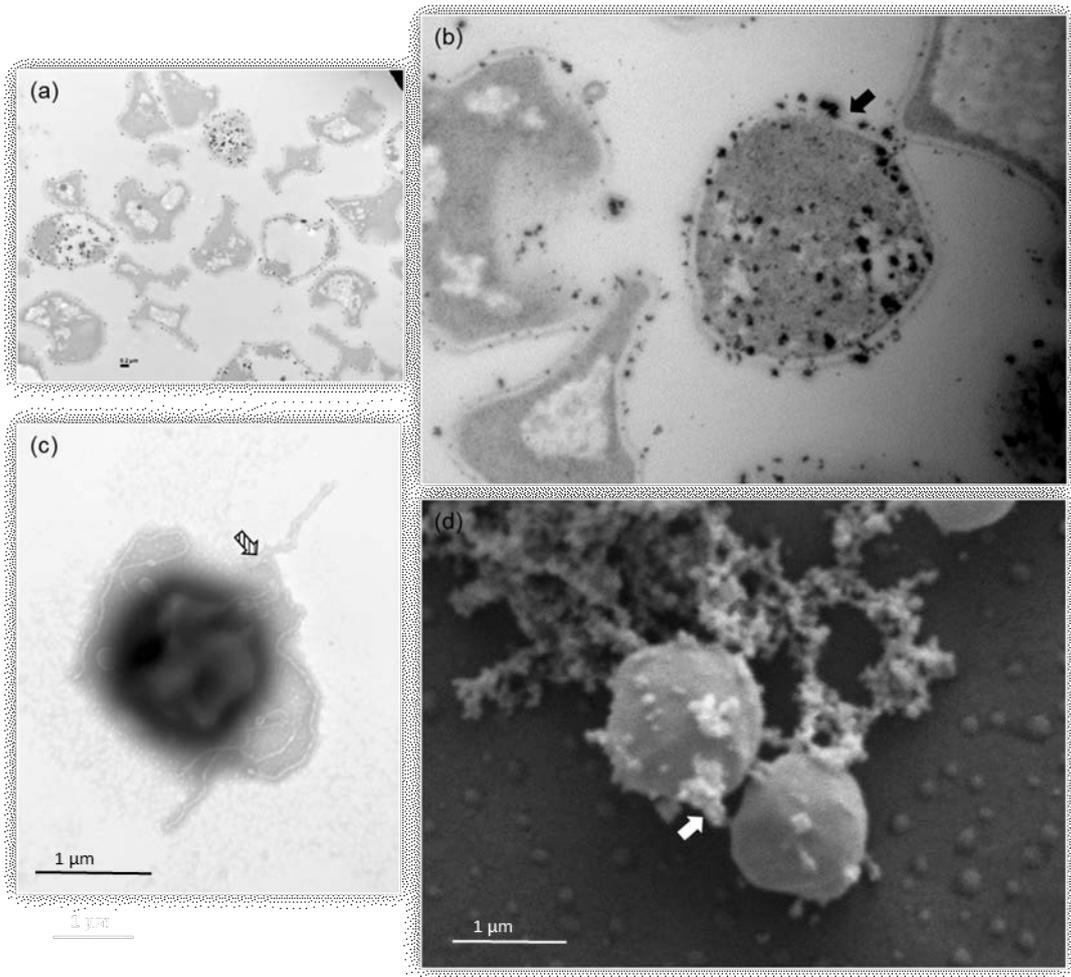


Figura 2.18. Células *A. copahuensis* cultivadas bajo condiciones mixotróficas con pirita. **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** tinción negativa; **(d)** imagen SEM. La envoltura celular, apéndices extracelulares y restos de EPS se señalan con flechas negra, rayada y blanca, respectivamente.

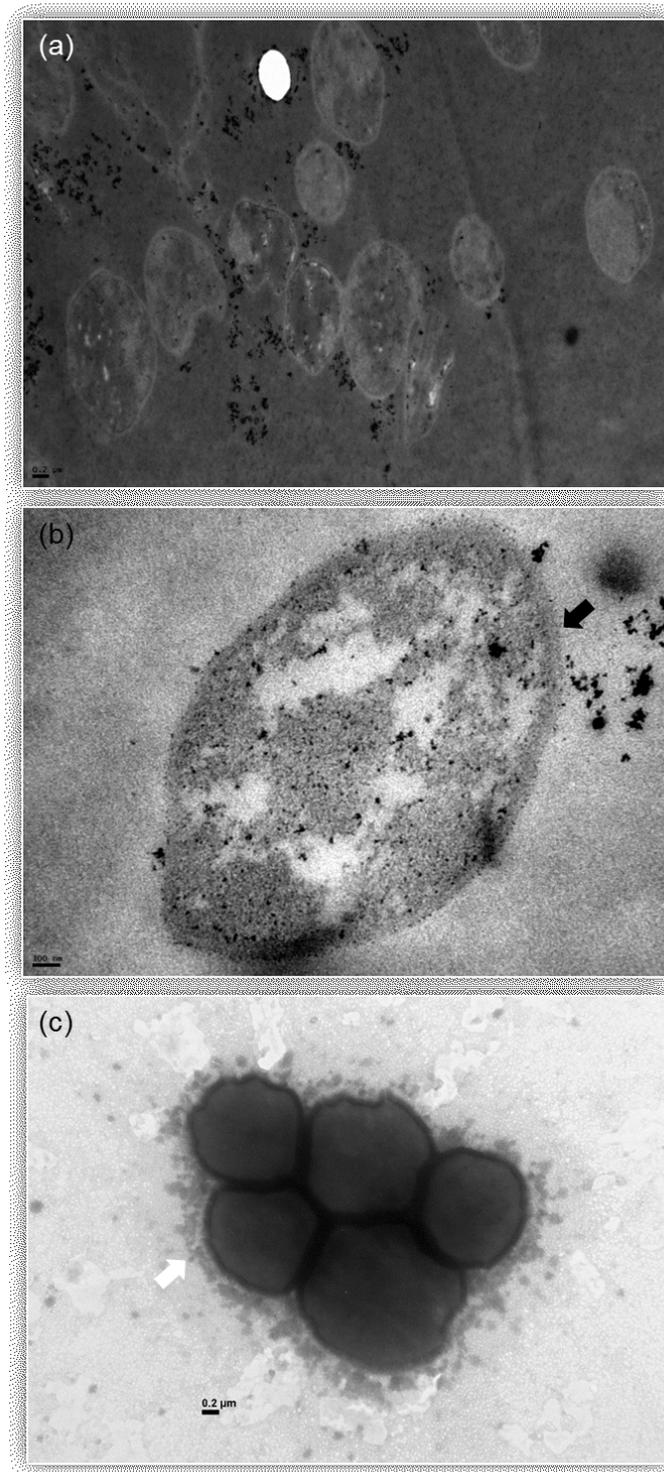


Figura 2.19. Células de *A. copahuensis* cultivadas en condiciones heterotróficas con glucosa. **(a)** y **(b)** cortes ultrafinos visualizados por TEM; **(c)** tinción negativa. La envoltura celular y restos de EPS se señalan con flechas negra y blanca, respectivamente.

En las micrografías TEM (Figuras 2.12-2.19) se pudieron observar detalles de la envoltura celular típica de arqueas, formada por una membrana y cubierta por una capa de glicoproteínas, conocida comúnmente como cápsula S (Giaveno y col., 2013). En todos los casos, las cápsulas de *A. copahuensis* se presentaron cubriendo uniformemente la superficie celular; pero entre ellas variaron en el espesor y la apariencia. Las cápsulas de las células fueron similares y con un espesor que varió entre 35 a 45 nm (Tabla 2.5), excepto en las células desarrolladas en condiciones autotróficas con azufre, que presentaron una diferencia significativa en la envoltura celular. Estas cápsulas fueron más gruesas, con un espesor de 76 ± 8 nm, una apariencia compacta y se observó un denso manto oscuro rodeando las células. Además, parecen contener partículas de azufre, tal como se ha observado para en otras especies creciendo en azufre elemental.

Mediante tinción negativa se detectaron apéndices extracelulares en las células cultivadas en medios suplementados con sustratos sólidos, como azufre o pirita (autotróficos y mixotróficos) (Figuras 2.12c, 2.13c, 2.17c, 2.18c). Estas estructuras no fueron observadas en presencia de fuentes de energía solubles. La naturaleza del sustrato parece afectar la producción de estas estructuras celulares. Estos apéndices podrían estar involucrados y facilitar la adhesión de las células a la superficie sólida, a la cual las células necesitan adherirse para obtener energía. Varios tipos de estructuras extracelulares han sido reportados en distintas especies de arqueas; entre ellas algunas en común con bacterias como flagelos y pilis (aunque con estructuras diferentes), y otras parecen ser únicas y características para este dominio como cánulas, hamis y bindosomas (Sandy y col., 2008). La mayoría de estas estructuras están involucradas en la adhesión de las células a superficies, contacto entre células, movilidad,

intercambio de DNA, nutrientes y toxinas (Albers y Meyer, 2011). Dentro de las especies pertenecientes al orden *Sulfolobales*, se reportó que la especie *S. solfataricus* posee un sistema de pili inducible por UV que resulta esencial en la adhesión de las células a la superficie (Zolghadr y col., 2010). Sin embargo, aún no se reportó la existencia de apéndices extracelulares en ninguna de las otras especies pertenecientes al género *Acidianus*.

En la Figura 2.14b se puede observar la presencia de vesículas intracelulares oscuras. La presencia de estas estructuras se observó exclusivamente cuando se suplementaron compuestos de azufre al medio de cultivo. En algunas imágenes se detectaron múltiples vesículas dentro de las células. Recientemente se ha reportado la existencia de vesículas similares en arqueas pertenecientes al orden *Thermococcales* (Gorlas y col., 2015). Los análisis revelaron que estas estructuras están compuestas por partículas de azufre. Varias bacterias forman reservas intra y/o extracelulares de azufre (denominados comúnmente glóbulos de azufre) a partir de compuestos de azufre como sulfuros, polisulfuros, tiosulfato, tetrionato, politionatos o azufre elemental. Los mecanismos de producción y la función de estas reservas difieren para las especies (Dahl y Prange, 2006). En algunos microorganismos la producción de estas reservas es temporario y son completamente degradadas luego de oxidar todo el azufre disponible (Franz y col., 2007); en cambio, en otros microorganismos estas reservas se producen para evitar la toxicidad del azufre, se acumula en vesículas y luego se liberan al medio extracelular (Eichinger y col., 2014). En *A. copahuensis*, la presencia de reservas de azufre podría estar vinculada con el almacenamiento de la fuente de energía para luego disponer de ella en condiciones deficientes de sustrato.

La producción de EPS se evidenció en células creciendo con sustratos solubles e insolubles. En las imágenes SEM pueden observarse agregados

sobre la superficie celular y también conectando las células entre sí (Fig. 2.12d, 2.15d y 2.18d). En las tinciones negativas, los EPS se presentaron como un material difuso rodeando células individuales o en grupos de células (Fig. 2.14c y 2.19c).

2.3.3. Características de la superficie celular

Los resultados obtenidos a partir de las medidas de MATS se muestran en la Tabla 2.6. Considerando los resultados obtenidos con los solventes estudiados, se puede sugerir que la mayor afinidad de *A. copahuensis* por el cloroformo, un solvente ácido, se debe a que las células bajo estudio presentan propiedades básicas o donoras de electrones en las condiciones de estudio

La hidrofobicidad celular de *A. copahuensis* mostró variaciones de acuerdo a las condiciones de cultivo de las células. Los resultados indicaron una mayor hidrofobicidad de las células cultivadas sobre sustratos sólidos (pirita y azufre) comparada con la de las células que crecieron utilizando el resto de los sustratos estudiados. Tendencias similares fueron reportadas en estudios realizados con otras especies de arqueas. Bronfield y col (2011) estudiaron la hidrofobicidad relativa de *M. hakonensis* cultivada en azufre, hierro(II) y calcopirita; las células adaptadas a crecer sobre calcopirita mostraron mayor hidrofobicidad que aquellas adaptadas a crecer sobre azufre o hierro(II). He y col (2008) demostraron que las células *A. manzaensis* adaptadas a crecer sobre pirita y calcopirita son más hidrofóbicas que las células cultivadas sobre azufre, mientras que las células adaptadas a crecer en hierro(II) son las más hidrofílicas. En nuestra experiencia, la adición de compuestos orgánicos como fuente de energía redujo la hidrofobicidad

celular, provocando probablemente una disminución de la afinidad de las células por el solvente orgánico.

Tabla 2.6. Porcentajes de afinidad de *A. copahuensis* a distintos solventes

Sustratos	% de afinidad a cloroformo	% de afinidad a hexadecano
Azufre	16 ± 6	-
Azufre y extracto de levadura	11 ± 1	-
Tetrationato	9 ± 2	3 ± 1
Tetrationato y extracto de levadura	6 ± 2	-
Hierro(II) y extracto de levadura	2 ± 1	-
Pirita	19 ± 2	-
Pirita y extracto de levadura	13 ± 1	-
Extracto de levadura	4 ± 1	-
Glucosa	4 ± 2	-

Los valores de potencial zeta de las células *A. copahuensis* cultivadas bajo condiciones mixotróficas, autotróficas y heterotróficas, utilizando distintos sustratos, y en función del pH, se muestran en la Figura 2.20.

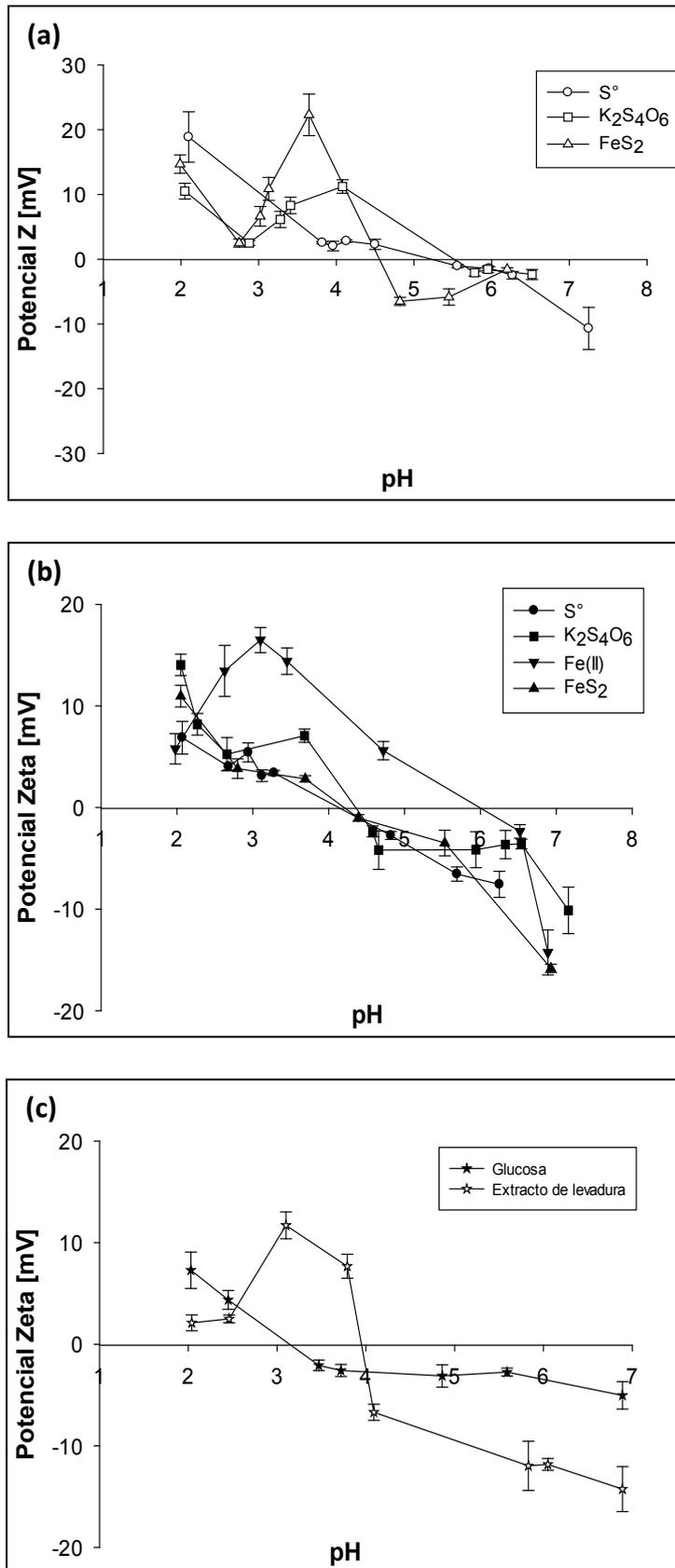


Figura 2.20. Potencial zeta de *A. copahuensis* bajo **(a)** condiciones autotróficas; **(b)** condiciones mixotróficas; **(c)** condiciones heterotróficas.

Los valores de potencial zeta y el comportamiento en función del pH fueron distintos para los diferentes cultivos. A valores de pH inferiores a 3, las células exhibieron carga neta positiva independientemente de las condiciones de cultivo. A pH superiores, las condiciones de cultivo influyeron significativamente en la carga neta superficial de las células. Estas observaciones coinciden con las reportadas para otros microorganismos hierro- y/o azufre-oxidantes, tales como *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *At. caldus*, *M. hakonensis* y *A. manzaensis* (Bromfield y col., 2011; Chen y col., 2008; He y col., 2008; Natarajan y Das, 2003; Sharma y col., 2003).

Los valores de potencial zeta a pH 2 (entendido como el pH óptimo de crecimiento) y el punto isoeléctrico de *A. copahuensis* en los distintos cultivos, se muestran en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Potencial zeta de cultivos de *A. copahuensis* a pH 2 y puntos isoeléctricos

Sustratos	Potencial zeta a pH 2 (mV)	Punto isoeléctrico
Azufre	19 ± 4	5,2
Azufre y extracto de levadura	7 ± 2	4,1
Tetrationato	11 ± 2	4,5
Tetrationato y extracto de levadura	14 ± 1	4,4
Hierro(II) y extracto de levadura	6 ± 1	4,2
Pirita	15 ± 1	5,5
Pirita y extracto de levadura	11 ± 1	6,0
Extracto de levadura	2 ± 1	4,0
Glucosa	7 ± 2	3,1

A pH 2 los cultivos mixotróficos mostraron mayores potenciales en comparación con el mismo sustrato pero bajo condiciones autotróficas. El punto isoeléctrico de las células cultivadas en glucosa fue el más bajo (pH 3), mientras que el resto de las células exhibieron puntos isoeléctricos en el rango entre 4 y 6. La diferencia entre los valores de puntos isoeléctricos indicaría la presencia de compuestos diferentes sobre la superficie de *A. copahuensis* en las distintas condiciones de cultivo estudiadas. Estudios previos sugieren que valores de puntos isoeléctricos entre pH 2,0 y 2,8 indican la predominancia de ácidos glucurónicos y de otros polisacáridos con grupos cargados negativamente (fosfatos o carboxílicos) en la composición de la superficie celular. En cambio, puntos isoeléctricos mayores o iguales a 3,2 indicarían que en la superficie celular prevalecen mayormente moléculas proteicas (con grupos amino) en comparación con polisacáridos (Rijnaarts y col., 1995; Sharma y col., 2003). Teniendo en cuenta esta información, la superficie celular de *A. copahuensis* tendría una fuerte composición proteica excepto para las células adaptadas a crecer en glucosa cuya superficie celular podría estar compuesta también por una cantidad considerable de ácidos glucurónicos o polisacáridos con grupos cargados negativamente. Esta diferencia podría deberse a que en presencia de glucosa, las células utilicen parte del sustrato para la síntesis de exopolisacáridos, tal cual se ha encontrado en estudios realizados para otros microorganismos como *At. ferrooxidans* y *F. acidiphilum* (Bellenberg y col., 2012; Zhang y col., 2014); en estos reportes se demostró que la adición externa de azúcares, como glucosa o galactosa, al medio de cultivo estimula la producción de polisacáridos capsulares, tal cual había sido propuesto previamente por Barreto y col (2005) quienes afirmaron que los microorganismos son capaces de incorporar monómeros de azúcares para la síntesis de polisacáridos capsulares.

2.3.4. Producción y composición de los EPS

La Figura 2.21 muestra la cantidad de EPS producidos por células de *A. copahuensis* cultivadas en distintas condiciones metabólicas. Las células cultivadas heterotróficamente (con glucosa o extracto de levadura) y autotróficamente con tetrionato, mostraron niveles de producción de EPS comparables: entre 0,02 y 0,03 pg-EPS/célula. En condiciones mixotróficas, la producción de EPS fue de 0,11 pg-EPS/células. La mayor producción de EPS se registró en células planctónicas cultivadas en pirita (0,28 pg-EPS/célula). En esta condición, las células producen más del doble de EPS comparado con el resto de las condiciones metabólicas estudiadas. Este incremento en la cantidad de EPS producido probablemente se deba a la presencia de una superficie sólida sobre la cual las células deben adherirse para obtener energía.

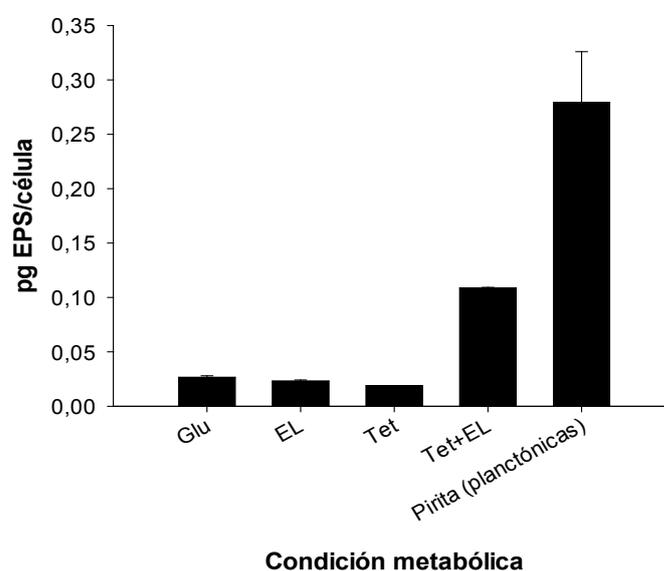


Figura 2.21. Producción de EPS en células planctónicas *A. copahuensis* cultivadas bajo distintas condiciones metabólicas: glucosa (Glu), extracto de levadura (EL), tetrionato de potasio (Tet), tetrionato de potasio y extracto de levadura (Tet+EL) y pirita.

Se ha demostrado en microorganismos como *At. ferrooxidans*, que el proceso de adhesión a la superficie mineral está principalmente mediado por los EPS que rodean las células y que la adhesión y/o contacto con la superficie sólida estimula la producción de EPS (Bellenberg y col., 2012; Vera y col., 2013). He y col (2014) estudiaron la producción y composición de los EPS producidos por varios microorganismos biolixivantes, entre ellos las arqueas *A. brierleyi*, *A. manzaensis*, *S. metallicus* y *M. sedula*. La mayor secreción de EPS se registró en las especies pertenecientes al género *Acidianus*, en comparación con los otros géneros de arqueas estudiadas. En todos los casos la producción de EPS fue significativamente mayor cuando las arqueas crecieron utilizando pirita, en comparación con la producción registrada cuando se cultivaron en azufre (40-60% menor). Estos resultados no pudieron ser comparados con los obtenidos para *A. copahuensis* debido a que los métodos de extracción de EPS utilizados fueron distintos y se ha demostrado que dependiendo del protocolo de extracción utilizado, la composición del EPS puede variar cualitativa y cuantitativamente (Comte y col., 2006).

En la Figura 2.22, se muestra la composición bioquímica de los EPS de células de *A. copahuensis* cultivadas bajo distintas condiciones metabólicas. Lamentablemente, la mayor proporción de compuestos que forma parte de los EPS no pudo determinarse; el porcentaje restante se distribuyó principalmente entre proteínas, polisacáridos, ácidos húmicos y urónicos.

Los análisis químicos mostraron diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de EPS producidos por células de *A. copahuensis* cultivadas bajo las distintas condiciones metabólicas estudiadas. La mayor variación se observó en la secreción de carbohidratos. Cuando las células crecieron utilizando glucosa como fuente de energía, los polisacáridos constituyeron más de la mitad del contenido del EPS; en el

resto de las condiciones, los polisacáridos no superaron el 10% siendo incluso no detectados en los EPS de células cultivadas autotróficamente con tetrionato. Cuando se cultivó *A. copahuensis* en glucosa, no se observó una mayor producción de EPS. No obstante, la mayor cantidad de polisacáridos detectados en los EPS de estas células, sugiere que parte del sustrato se utilizó para la síntesis de exopolisacáridos. Este resultado concuerda con el valor de potencial zeta registrado en estas mismas condiciones (desarrollado previamente en la sección 2.3.3), cuyo valor sugirió la presencia de una cantidad importante de polisacáridos cargados negativamente en la superficie de las células cultivadas con glucosa.

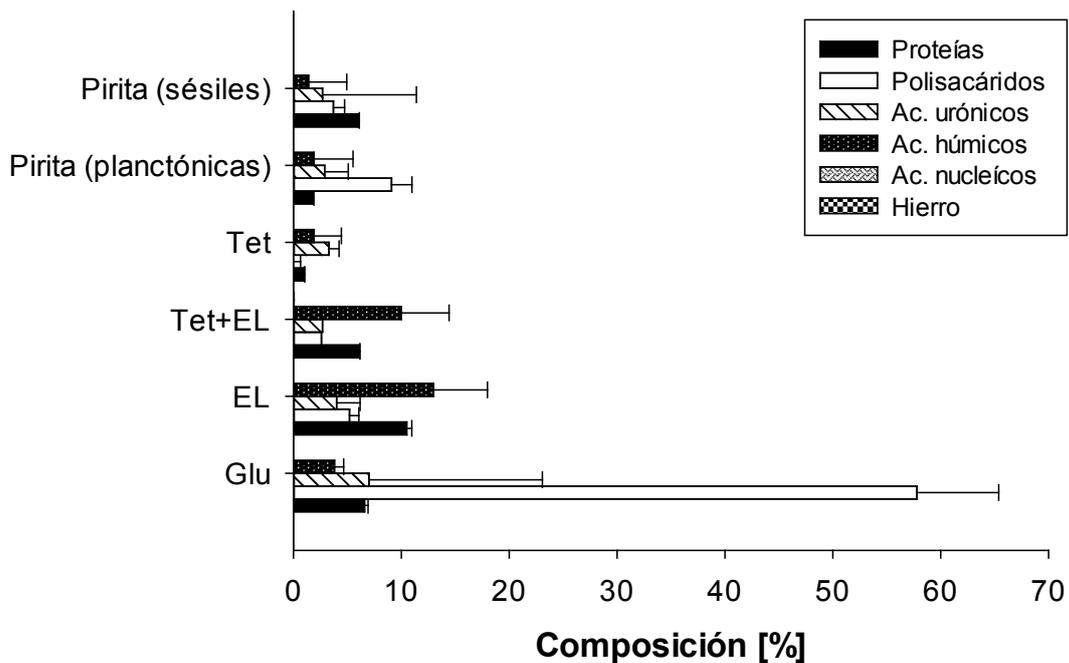


Figura 2.22. Composición bioquímica de los EPS extraídos de células de *A. copahuensis* cultivadas bajo distintas condiciones metabólicas: glucosa (Glu), extracto de levadura (EL), tetrionato de potasio y extracto de levadura (Tet+EL), tetrionato de potasio (Tet) y pirita (tanto las células planctónicas como sésiles).

En general, los polisacáridos se han encontrado en EPS capsulares de células formando parte de biofilms sobre superficies minerales; probablemente esto se deba a que están involucrados en la formación de la matriz estructural que le proporciona estabilidad al biofilm (Donlan y col., 2002; Stewart y col., 2008). En cultivos de *A. copahuensis* suplementados con glucosa se observó la formación de flóculos celulares (Fig. 2.19c); los polisacáridos presentes en los EPS de estas células podrían participar en la formación y mantenimiento de estas estructuras. La producción de exopolisacáridos en la arquea halófila *Haloferax mediterranei* se incrementó en presencia de glucosa comprobándose también una mayor tendencia a formar agregados (Orell y col., 2013).

La información sobre la composición de los EPS se muestra comparativamente en la Tabla 2.8.

Tabla 2.8. Composición química de EPS de células de *A. copahuensis*

Condición metabólica	Composición química de EPS en mg/g-peso seco de EPS					
	Proteínas	Polisacáridos	Ácidos urónicos	Ácidos húmicos	Ácidos nucleicos	Hierro
Glucosa	66±3	578±76	70±16	38±1	ND	ND
Extracto de levadura	105±5	52±9	40±2	130±5	ND	ND
Tetrationato y extracto de levadura	61,2±0,5	26±7	27±1	100±4	0,33±0,03	0,6±0,3
Tetrationato de potasio	10,0±0,5	ND	33±1	19±3	ND	ND
Pirita (células planctónicas)	18±1	91±19	29±2	19±4	ND	ND
Pirita (células sésiles)	6±1	37±10	27±8	14±4	ND	ND

ND: no detectado

El contenido de proteínas en los EPS fue variable, representando entre 1% al 10% del peso total. Las proteínas fueron el principal componente detectado en los EPS producidos por las células del biofilm sobre pirita. Llamativamente, el principal componente detectado en los EPS de las células planctónicas desarrolladas en las mismas condiciones fueron carbohidratos. Un resultado similar fue hallado por Zhang y col (2015) al estudiar la composición de los EPS coloidales y capsulares producidos por células planctónicas y sésiles de *S. metallicus* creciendo sobre azufre; en este estudio se comprobó que el principal contenido de los EPS capsulares producidos por células del biofilm sobre azufre fueron proteínas mientras que en las células planctónicas se detectaron cantidades similares de proteínas y carbohidratos. Tanto en *A. copahuensis* como *S. metallicus*, el aumento del contenido proteico en los EPS de las células adheridas a la superficie celular podría estar vinculado a la producción de proteínas estructurales que permitan la adhesión y formación de biofilms sobre la superficie sólida y a su vez generen mayor estabilidad en la estructura del biofilm. Las proteínas también podrían estar cumpliendo un rol funcional en la activación y transporte de azufre y polisulfuros para la subsiguiente oxidación, así también como proteínas involucradas en la oxidación de hierro(II).

En todos los EPS analizados se detectaron ácidos húmicos y urónicos. La mayor proporción de ácidos húmicos se detectó cuando las células se cultivaron en presencia de extracto de levadura. Los ácidos húmicos pueden formar compuestos de coordinación con varios metales, generando compuestos estables principalmente con hierro y cobre. Los ácidos urónicos se encontraron en cantidades comparables en las distintas condiciones (menor al 7%). Una de las posibles funciones de los ácidos urónicos en los EPS podría ser combinarse con cationes metálicos,

generando una carga neta positiva en las células, lo cual potencia la adhesión celular sobre superficies cargadas negativamente.

Los bajos niveles de ADN en los EPS extraídos es indicio de contaminación poco significativa con sustancias intracelulares liberadas por lisis celular. No obstante, es posible que el ADN extracelular tenga funciones relacionadas a la transferencia horizontal de genes, mantenimiento de microcolonias e incluso puede contribuir como adhesivo. El ADN extracelular sólo fue detectado cuando las células se desarrollaron en condiciones mixotróficas utilizando tetrionato como fuente de energía. También en esta condición se detectó hierro aunque en muy baja cantidad.

Los grupos funcionales de los EPS influyen de forma decisiva en la capacidad de interacción con otras sustancias. Para la identificación de los grupos funcionales en los EPS se utilizó FTIR. En la Figura 2.23 se muestran los espectros FTIR de las muestras de EPS extraídas de cultivos de *A. copahuensis* bajo distintas condiciones metabólicas.

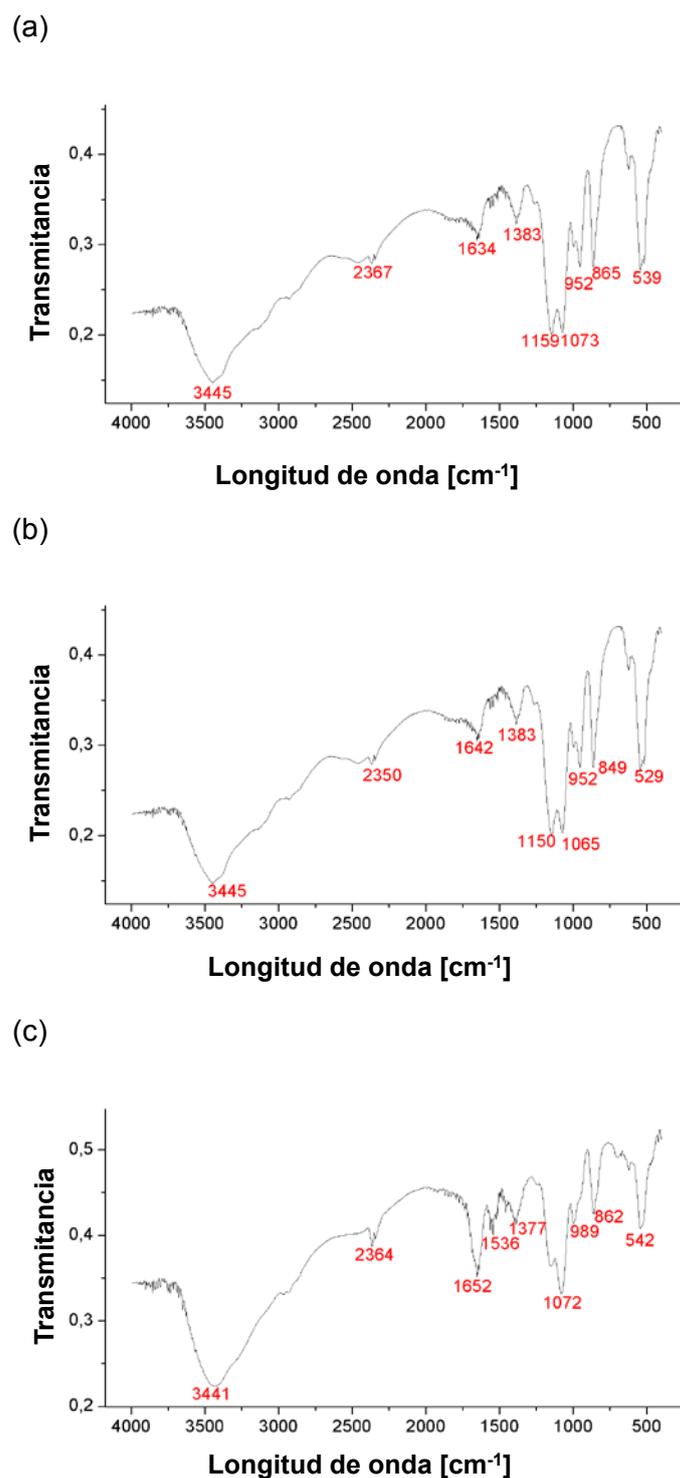
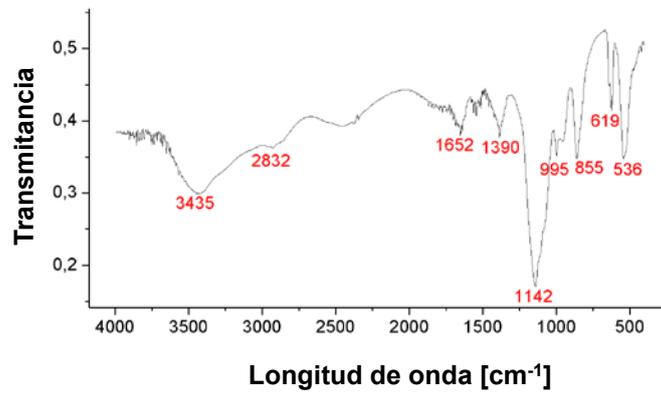
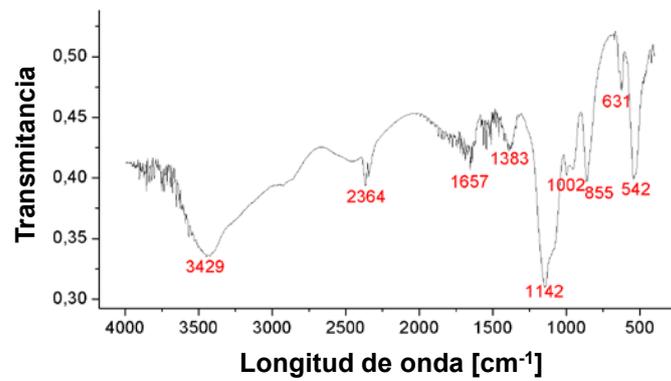


Figura 2.23a. Espectros FTIR de muestras de EPS capsular de células de *A. copahuensis* cultivadas bajo distintas condiciones: **(a)** tetrionato de potasio; **(b)** tetrionato de potasio y extracto de levadura; **(c)** extracto de levadura.

(d)



(e)



(f)

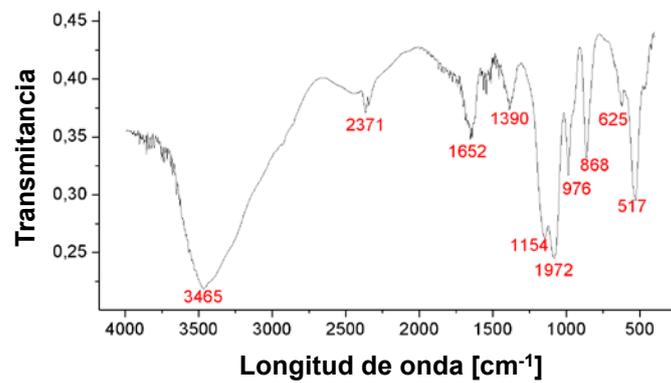


Figura 2.23b. Espectros FTIR de muestras de EPS capsular de células de *A. copahuensis* cultivadas bajo distintas condiciones: **(d)** glucosa; **(e)** pirita (células planctónicas); **(f)** pirita (células sésiles).

Los espectros mostraron picos coincidentes pero también muchas diferencias según las condiciones en las que fueron cultivadas las células. Se observa una primera banda en torno a 3400 cm^{-1} que puede atribuirse a la tensión simétrica O-H en compuestos poliméricos (Comte y col., 2006), aunque de igual manera podría corresponder a cierto contenido de agua residual o bien a humedad atmosférica captada durante el tratamiento de la muestra. En el espectro de los EPS extraídos de células cultivadas en glucosa se observó una banda a 2830 cm^{-1} (Fig. 2.23d), correspondiente a vibraciones simétricas de grupos C-H en cadenas hidrocarbonadas. Otra banda coincidente en todos los espectros se observó alrededor entre 1650 a 1630 cm^{-1} y es característica de las vibraciones simétricas de enlaces C=O y C-N presentes en los enlaces peptídicos de proteínas pertenecientes al grupo de amidas I. Las bandas alrededor de 1400 cm^{-1} podrían estar relacionadas con vibraciones simétricas del enlace C-O en el grupo carboxílico. Las bandas entre 1159 y 1072 cm^{-1} son típicas tanto de la vibración de tensión del grupo funcional C=O, propio del grupo carboxilato, como de la vibración de tensión del grupo O-H, correspondientes ambos a la presencia de los polisacáridos ya detectados en los análisis químicos (Comte y col., 2006).

Se detectaron varios glicoconjugados en los EPS producidos por las células de *A. copahuensis* a través de la utilización de lectinas con diferente especificidad. Los resultados de las tinciones con diferentes lectinas se muestran en las Figuras 2.24 a 2.27 y en la Tabla 2.9. Las lectinas ConA y PWM se unieron a la superficie celular en todas las condiciones testeadas mientras que la lectina ECA no produjo señal en ninguna de las condiciones. La señal de la lectina WGA sólo se observó en células en estado sésil (Fig. 2.27). El resto de las lectinas testeadas (PNA, SBA, LcH, UEA I, BS I y PHA-E) permiten diferenciar células cultivadas en distintas condiciones. *A.*

copahuensis expresó diferentes glicoconjugados en relación a la fuente de energía utilizada para cultivar las células y dependiendo si se encuentra en estado planctónico o sésil. En general, las células sésiles mostraron una mayor diversidad de glicoconjugados en sus EPS y señales más intensas en comparación con células planctónicas.

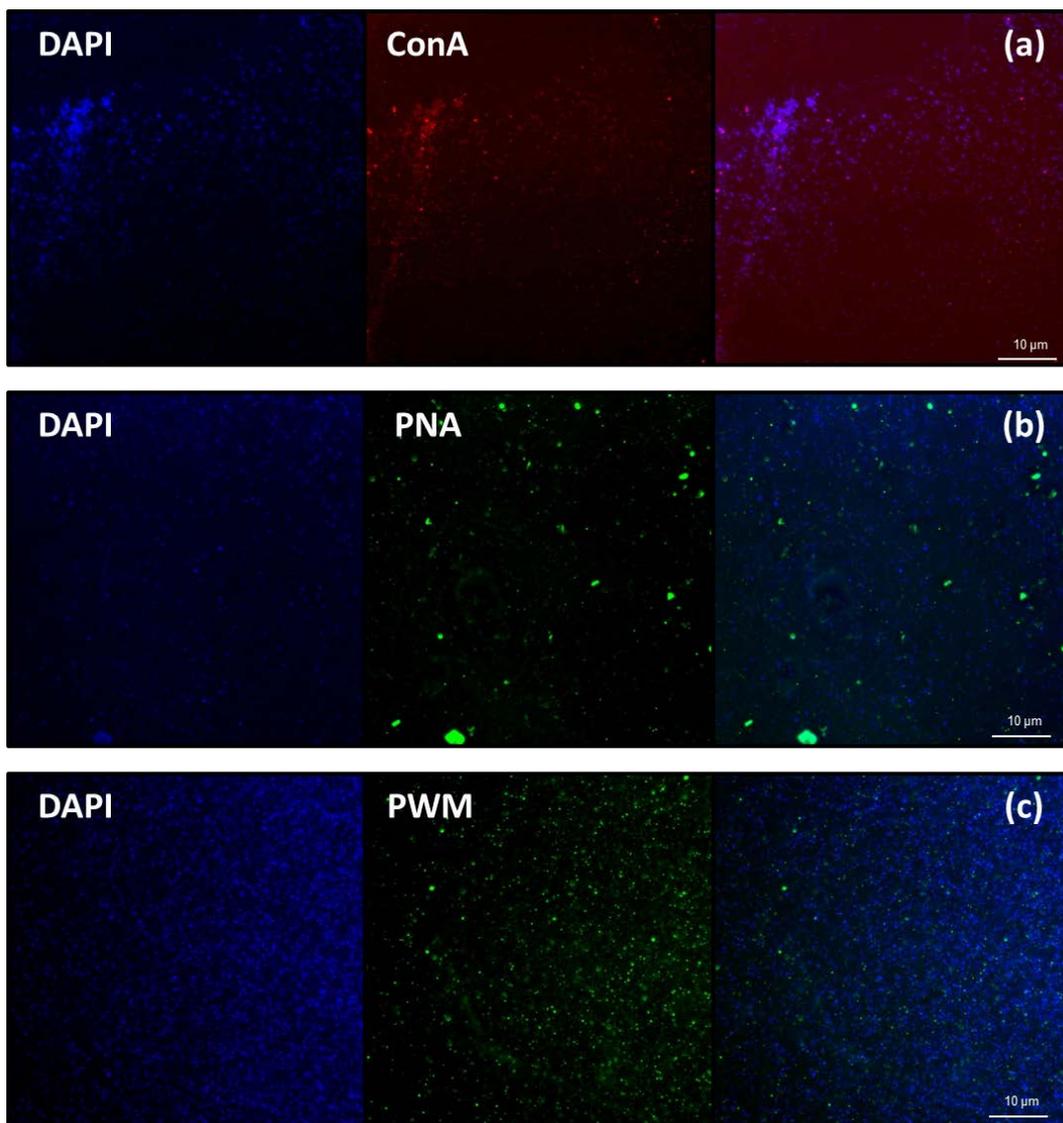


Figura 2.24. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* planctónicas cultivadas sobre azufre, teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(a)** ConA-TRITC; **(b)** PNA-FITC; **(c)** PWM-FITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

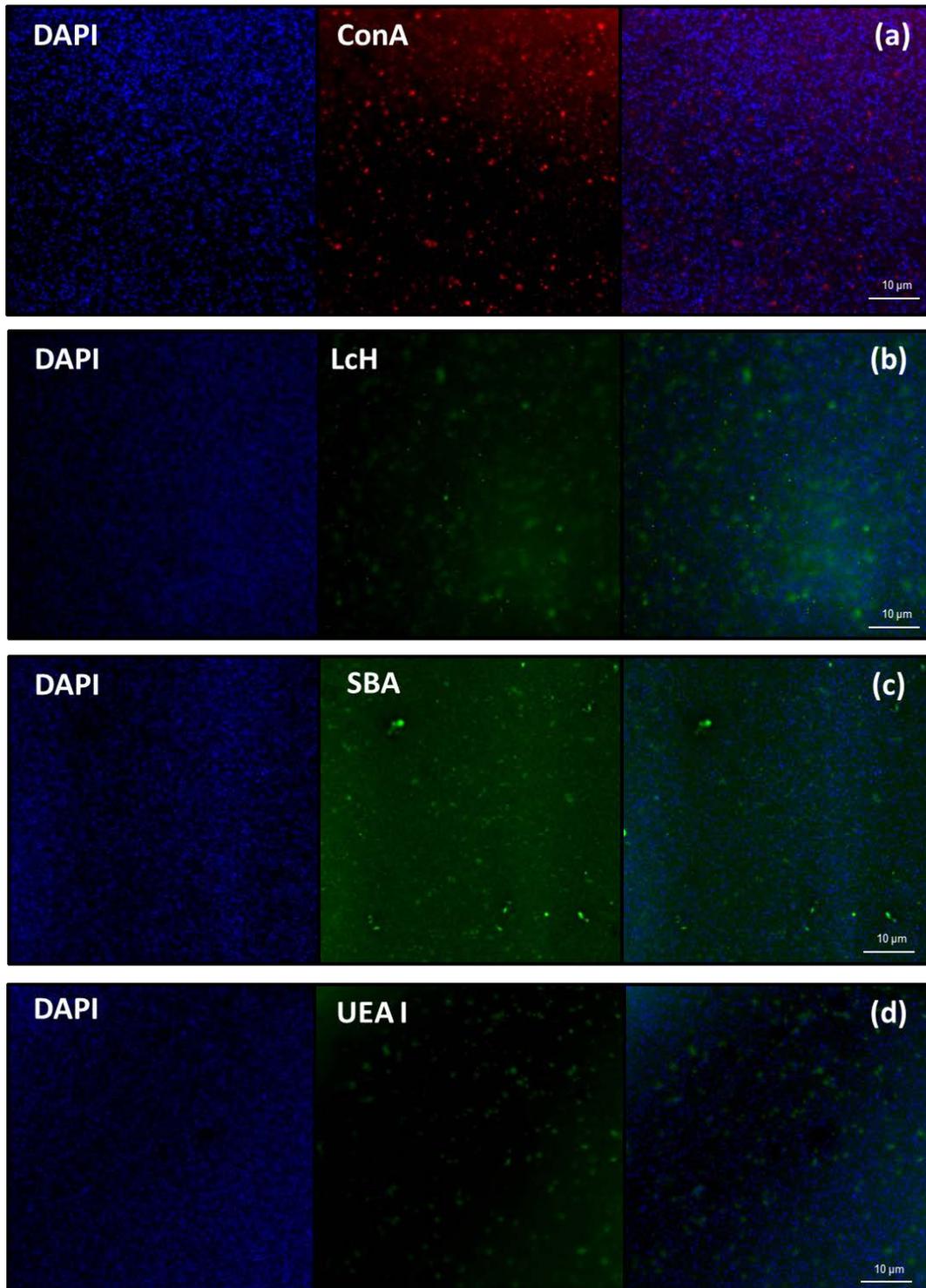


Figura 2.25a. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* planctónicas cultivadas sobre hierro(II), teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(a)** ConA-TRITC; **(b)** LcH-FITC; **(c)** SBA-FITC; **(d)** UEA I-FITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

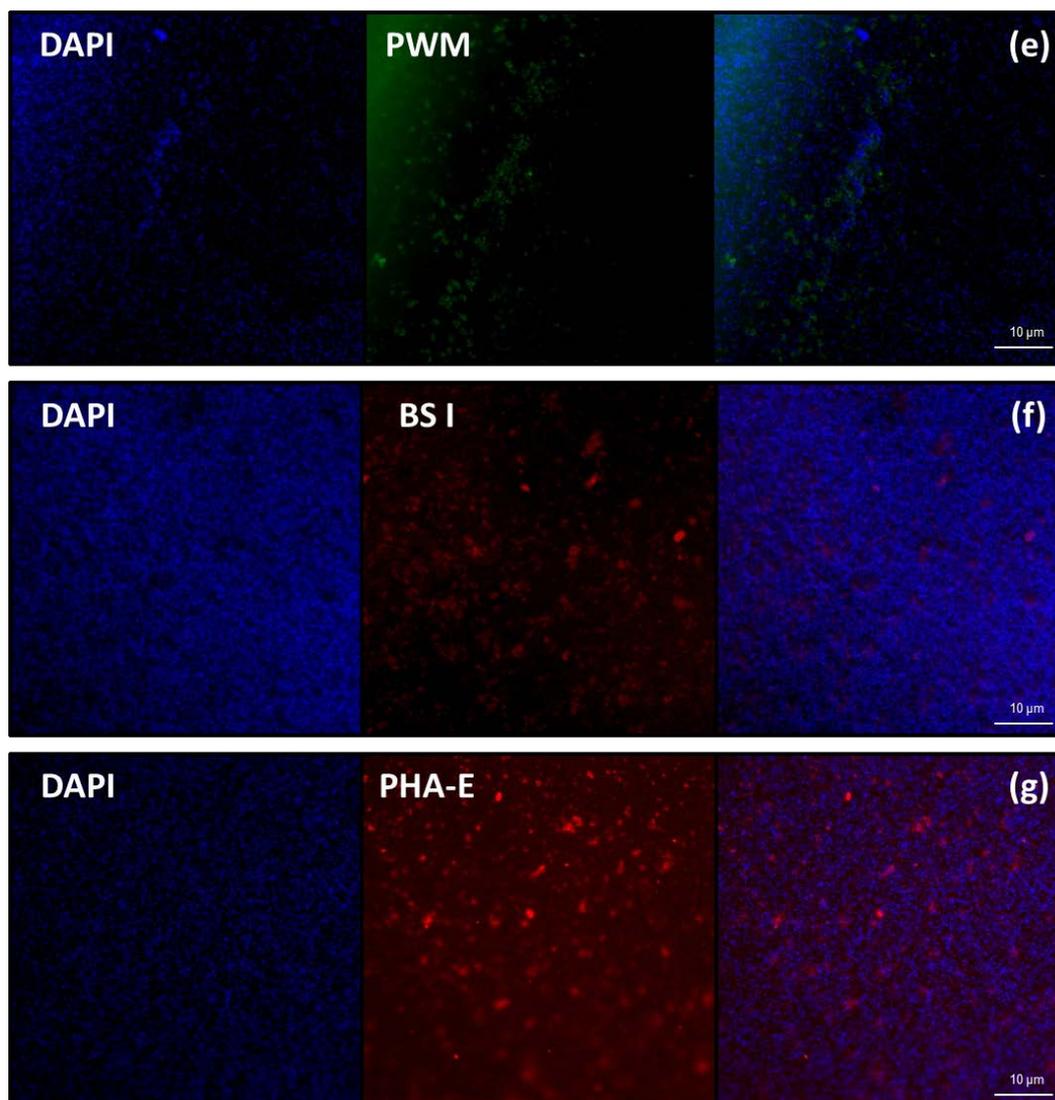


Figura 2.25b. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* planctónicas cultivadas sobre hierro(II), teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(e)** PWM-FITC; **(f)** BS I-TRITC; **(g)** PHA-E-TRITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

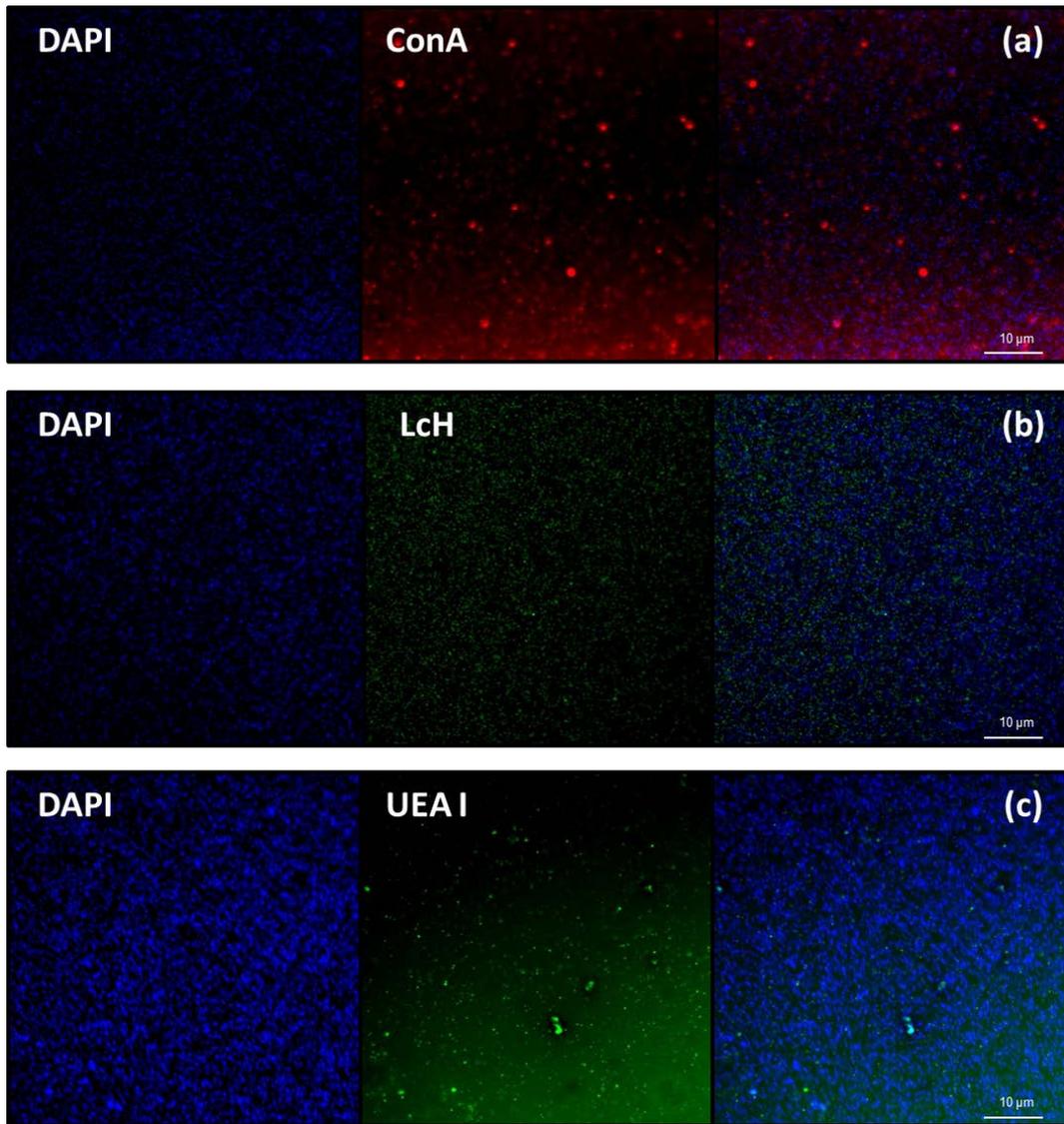


Figura 2.26a. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* planctónicas cultivadas sobre pirita, teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(a)** ConA-TRITC; **(b)** LcH-FITC; **(c)** UEA I-FITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

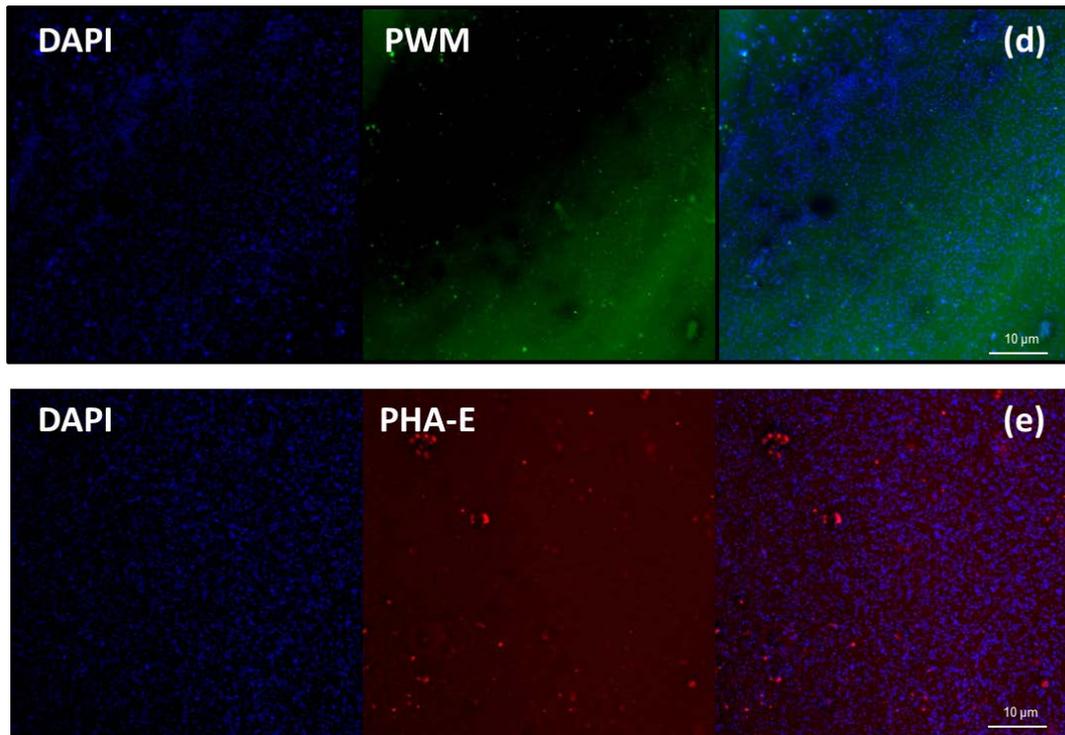


Figura 2.26b. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* planctónicas cultivadas sobre pirita, teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(d)** PWM-FITC; **(e)** PHA-E-TRITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

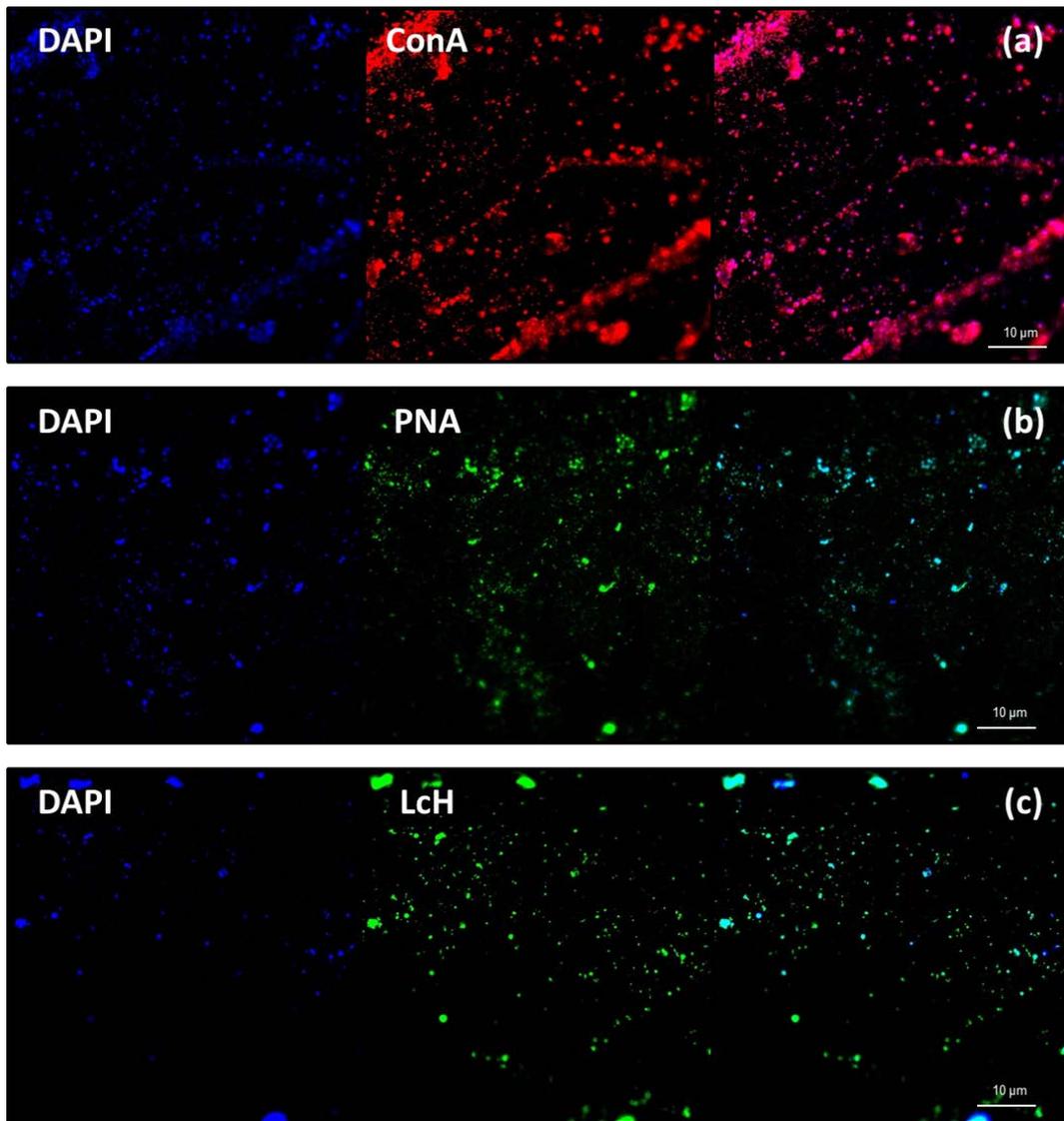


Figura 2.27a. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* sésiles adheridas a pirita, teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(a)** ConA-TRITC; **(b)** PNA-FITC; **(c)** LcH-FITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

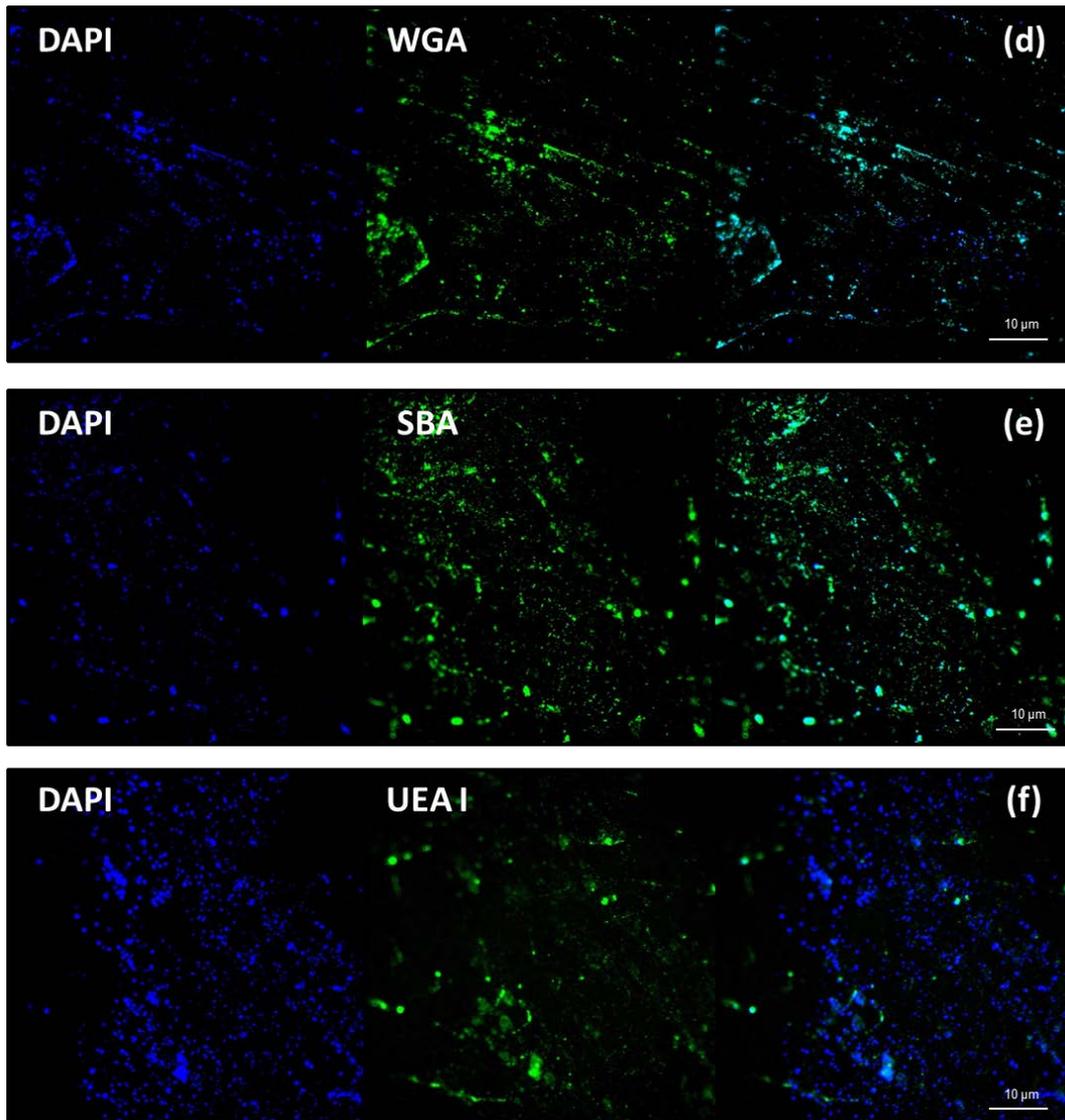


Figura 2.27b. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* sésiles adheridas a pirita, teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(d)** WGA-FITC **(e)** SBA-FITC; **(f)** UEA I-FITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

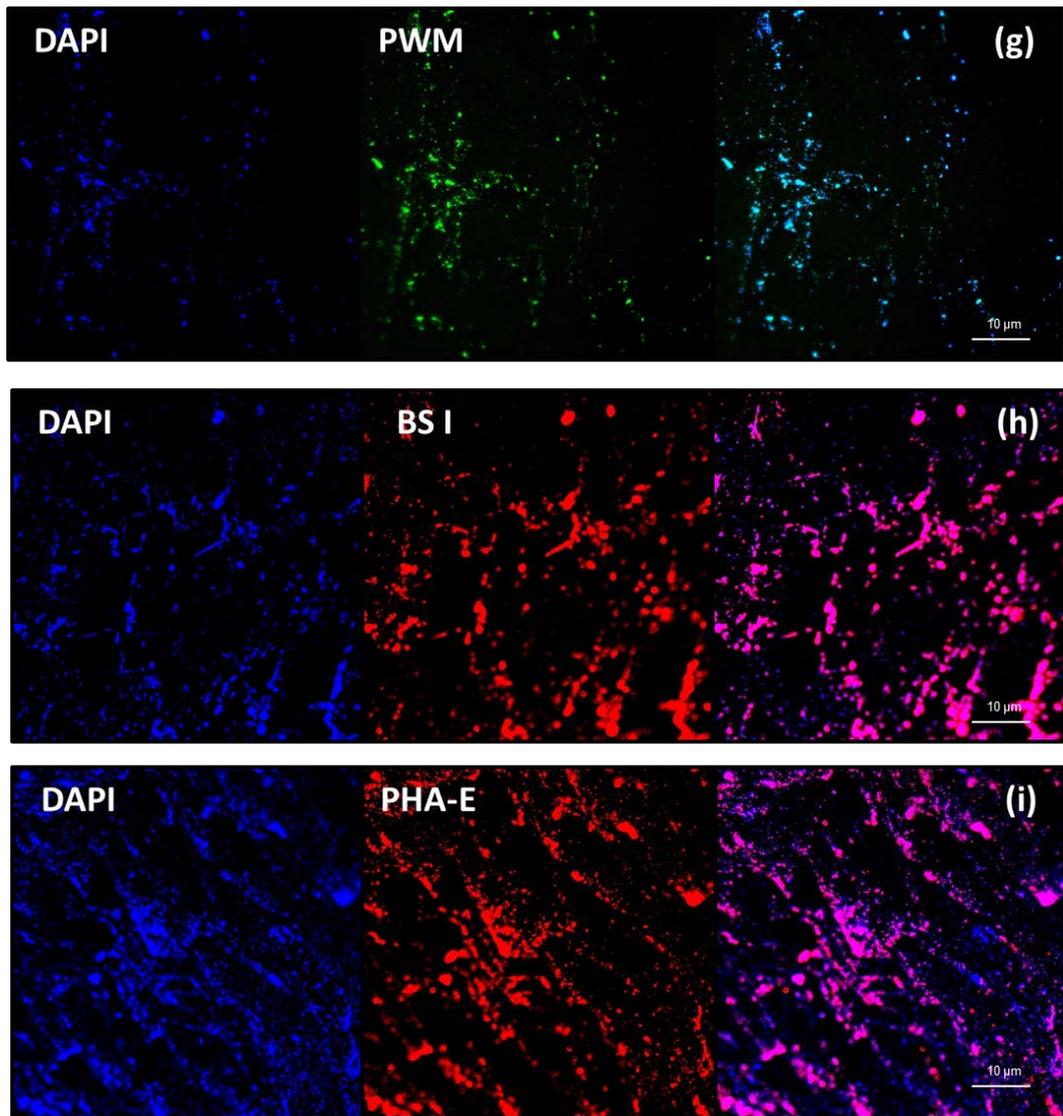


Figura 2.27c. Imágenes EFM de células de *A. copahuensis* sésiles adheridas a pirita, teñidas con DAPI (azul) y varias lectinas (rojo a verde). **(g)** PWM-FITC; **(h)** BS I-TRITC; **(i)** PHA-E-TRITC. En la última columna de la figura, se muestran imágenes de las combinaciones de ambas tinciones.

Tabla 2.9. Resultados de las tinciones con lectinas de células de *A. copahuensis* cultivadas sobre azufre, hierro(II) y pirita.

Lectina	Condición metabólica			
	Azufre	Hierro(II)	Pirita	
	planctónica	planctónica	planctónica	Sésil
ConA	+	+	+	+
PNA	+	-	-	+
LcH	-	+	+	+
WGA	-	-	-	+
ECA	-	-	-	-
SBA	x	+	-	+
UEA I	-	+	+	+
PWM	+	+	+	+
BS I	-	+	-	+
PHA-E	-	+	+	+

+: señal positiva; -: señal negativa; x: no testeada

Los resultados de tinción positiva con la lectina ConA sugieren la presencia de residuos α -glucosa y α -manosa en los EPS secretados por *A. copahuensis*. Los polisacáridos denominados Ps1 contienen manosa y glucosa; estos polisacáridos se encuentran involucrados en la adhesión tanto a superficies abióticas como bióticas y en el mantenimiento de la estructura de los biofilms (Ghafoor y col., 2011). Durante la adhesión, los polisacáridos Ps1 son anclados a la superficie celular en una disposición helicoidal, posiblemente promoviendo las interacciones entre células. Además, otros polisacáridos ricos en glucosa, denominados Pe1, son esenciales para la formación de biofilms (Flemming y Wingender, 2010).

La lectina UEA I, que se une específicamente a residuos de fucosa, tuvo señal positiva en células cultivadas con hierro(II) y pirita (tanto planctónicas como sésiles). Extensos estudios realizados con EPS

bacterianos han demostrado que la fucosa forma parte del ácido colánico, fucogel y clavan (Freitas y col., 2011).

En los EPS producidos por *A. copahuensis* se detectaron residuos de glucosa, manosa, GalNAC y GlcNAC. Las proteínas extracelulares de las especies pertenecientes al orden *Sulfolobales* se encuentran altamente glicosiladas. Probablemente algunas de las lectinas testeadas se unieron a los N-glicanos de la capa S, que seguramente difieran en su composición dependiendo de las condiciones de cultivo y el estado celular. Los N-glicanos de estas arqueas generalmente están compuestos por glucosa, manosa, GalNAC y GlcNAC. La alta densidad de glicosilación en las capas S de estos microorganismos podría representar una adaptación a las condiciones de altas temperaturas y acidez detectadas en los ambientes naturales que habitan (Meyer y Albers, 2013).

2.3.5. Adhesión inicial sobre diferentes minerales

En la Figura 2.28 se muestran las cinéticas de adhesión de *A. copahuensis* sobre los tres minerales estudiados en este ensayo. En esta figura se representaron exclusivamente las cinéticas de las células previamente crecidas sobre el mismo mineral sobre el que se estudió la adhesión. Para el resto de las condiciones estudiadas se obtuvieron cinéticas de adhesión similares, por lo cual se eligió sólo una de cada mineral de modo representativo.

En todas las condiciones hubo una importante adhesión de células sobre la superficie durante los primeros 30 a 60 min de contacto. La velocidad de adhesión disminuyó significativamente luego de los 30 min de incubación, estableciéndose un equilibrio luego de los 120 min. Esta tendencia de rápida adhesión inicial ha sido reportada en estudios

realizados con otros microorganismos y superficies minerales (Afzal Ghauri y col., 2007; Bromfield y col., 2011; Harneit y col., 2007; Rodríguez y col., 2003a).

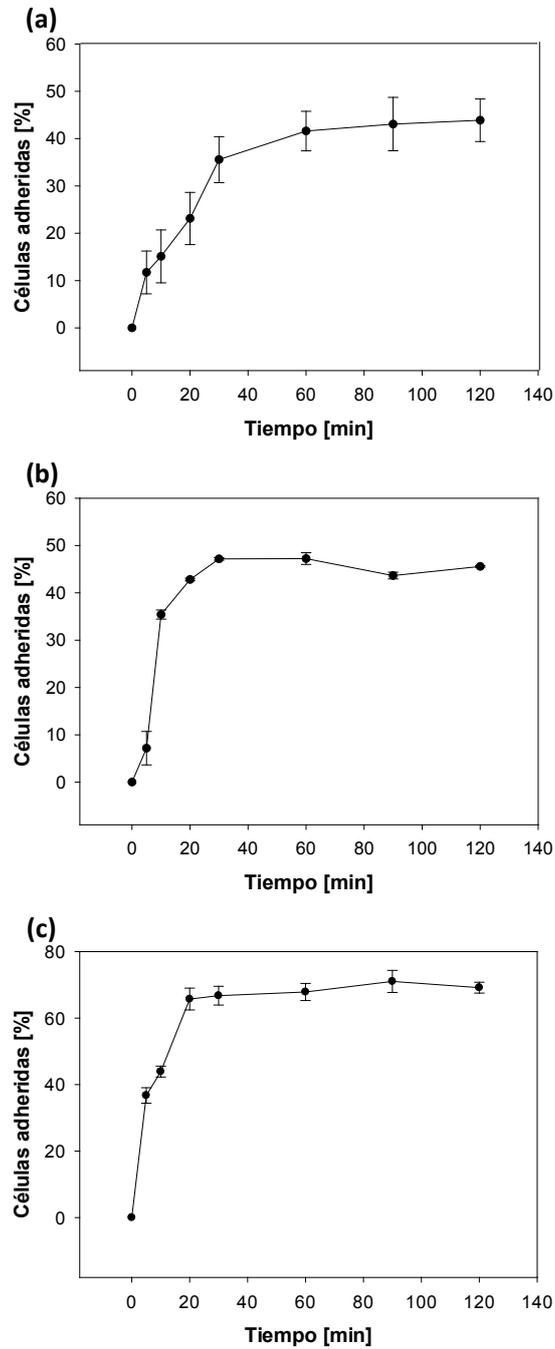


Figura 2.28. Cinética de adhesión de células de *A. copahuensis* sobre: **(a)** pirita, **(b)** mineral de Hualilán y **(c)** concentrado de Bajo La Alumbraera.

Los máximos niveles de adhesión (determinados una vez alcanzados los equilibrios) con los minerales y utilizando inóculos de *A. copahuensis* desarrollados con distintas fuentes de energía, se presentan en la Figura 2.29.

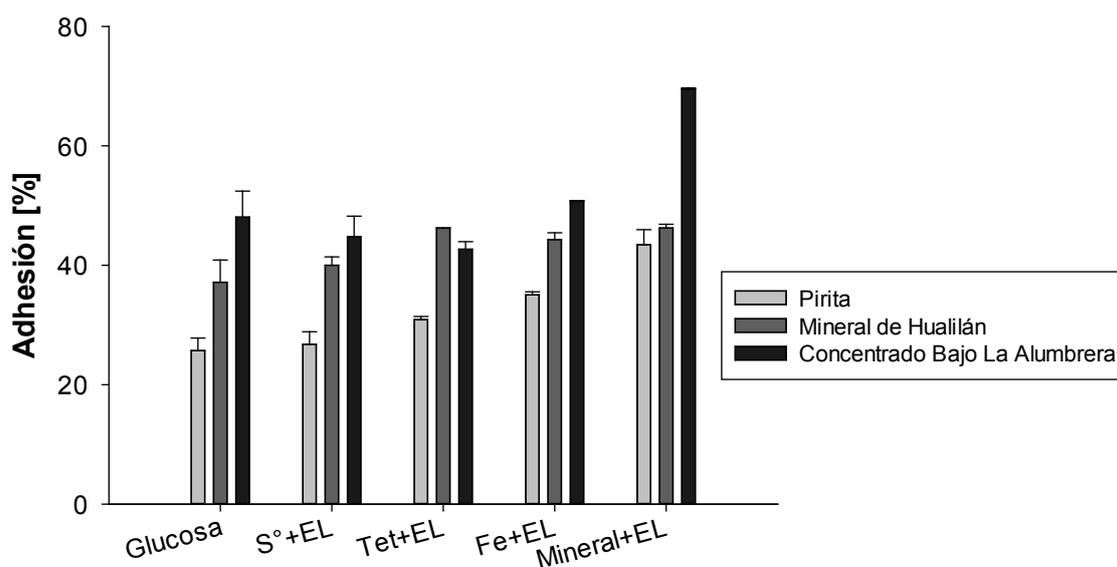


Figura 2.29. Porcentajes de adhesión de células de *A. copahuensis* sobre tres sustratos minerales (pirita, mineral de Hualilán y concentrado de Bajo La Alumbraera). Las células fueron previamente cultivadas con distintas fuentes de energía: glucosa, azufre (S°), tetrionato de potasio (Tet), hierro(II) (Fe) y adaptadas a crecer en el mineral respectivo.

Se observaron mayores niveles de adhesión cuando se utilizó el concentrado de Bajo La Alumbraera como superficie para la adhesión celular; los niveles más bajos de adhesión se obtuvieron sobre pirita. De acuerdo al análisis BET, la pirita presentó menor superficie expuesta aunque el área superficial disponible para la adhesión de microorganismos

es, en principio, muy superior a la necesaria para lograr la máxima adhesión de microorganismos.

Dado que el área disponible para la adhesión no fue un factor limitante en estos ensayos, los resultados obtenidos indican que la adhesión de *A. copahuensis* es selectiva a los diferentes minerales, siendo mayor sobre calcopirita (la especie predominante en el concentrado) que sobre pirita y sobre el mineral de Hualilán (con alto contenido en pirita y también esfalerita). Otros microorganismos termófilos también han demostrado una mayor afinidad de adhesión sobre calcopirita que sobre pirita (Bromfield y col., 2011; Rodríguez y col., 2003a). Esta selectividad en la adhesión puede estar relacionada con diferencias en las estructuras cristalinas de los minerales y sus consecuencias sobre la magnitud de las fuerzas de interacción célula-mineral (Zhu y col., 2008; Vera y col., 2013).

A pH 2, los valores de potencial zeta fueron -4 ± 1 mV, -6 ± 1 mV y $+4 \pm 1$ mV para el concentrado de Bajo La Alumbraera, para el mineral de Hualilán y para la pirita, respectivamente. A ese mismo pH las células mostraron valores de potencial positivos independientemente de la adaptación (Tabla 2.7). La mayor afinidad de las células de *A. copahuensis* por el concentrado y por el mineral de Hualilán podría deberse a una mayor atracción entre la superficie mineral cargada negativamente y las células cargadas positivamente.

Los resultados sugieren que la fuente de energía sobre la que crecieron previamente las células, influye sobre la capacidad de adhesión. Aunque no se registraron diferencias significativas en la adhesión mostrada por inóculos previamente cultivados sobre glucosa, azufre, tetrionato y hierro(II), se observó un fuerte incremento de la adhesión microbiana para los inóculos previamente adaptados a crecer en presencia del mismo

mineral sobre el que se realizaron los ensayos. Este efecto fue más marcado para el caso de la pirita y de la calcopirita, incrementando la adhesión un 24% y 15%, respectivamente.

2.3.6. Colonización y formación de biofilms

En las Figuras 2.30, 2.31, 2.32 y 2.33 se muestra la colonización y formación de biofilms sobre cupones de pirita por células de *A. copahuensis* previamente cultivadas sobre azufre, tetrionato, hierro(II) y pirita, respectivamente. Las células fueron teñidas con DAPI (azul) mientras que sus EPS se tiñeron con la lectina ConA (rojo).

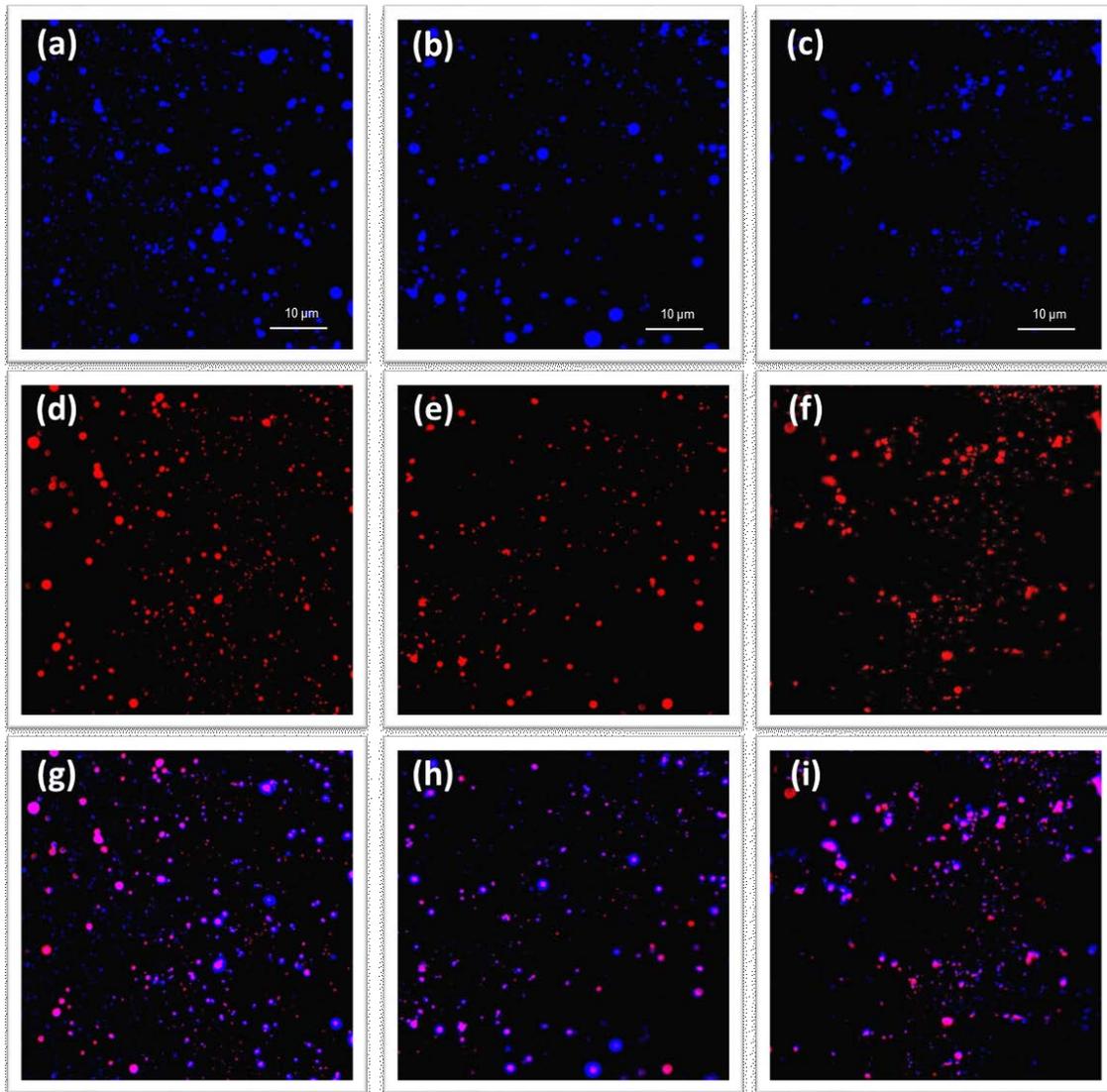


Figura 2.30. Imágenes EFM 50X de cupones de pirita incubados durante 1 día (**a, d, g**), 3 días (**b, e, h**) y 6 días (**c, f, i**) con células de *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre azufre. Las células fueron teñidas con DAPI (**a-c**) y sus EPS con ConA (**d-f**). Las figuras (**g-i**) son imágenes combinadas de ambas tinciones.

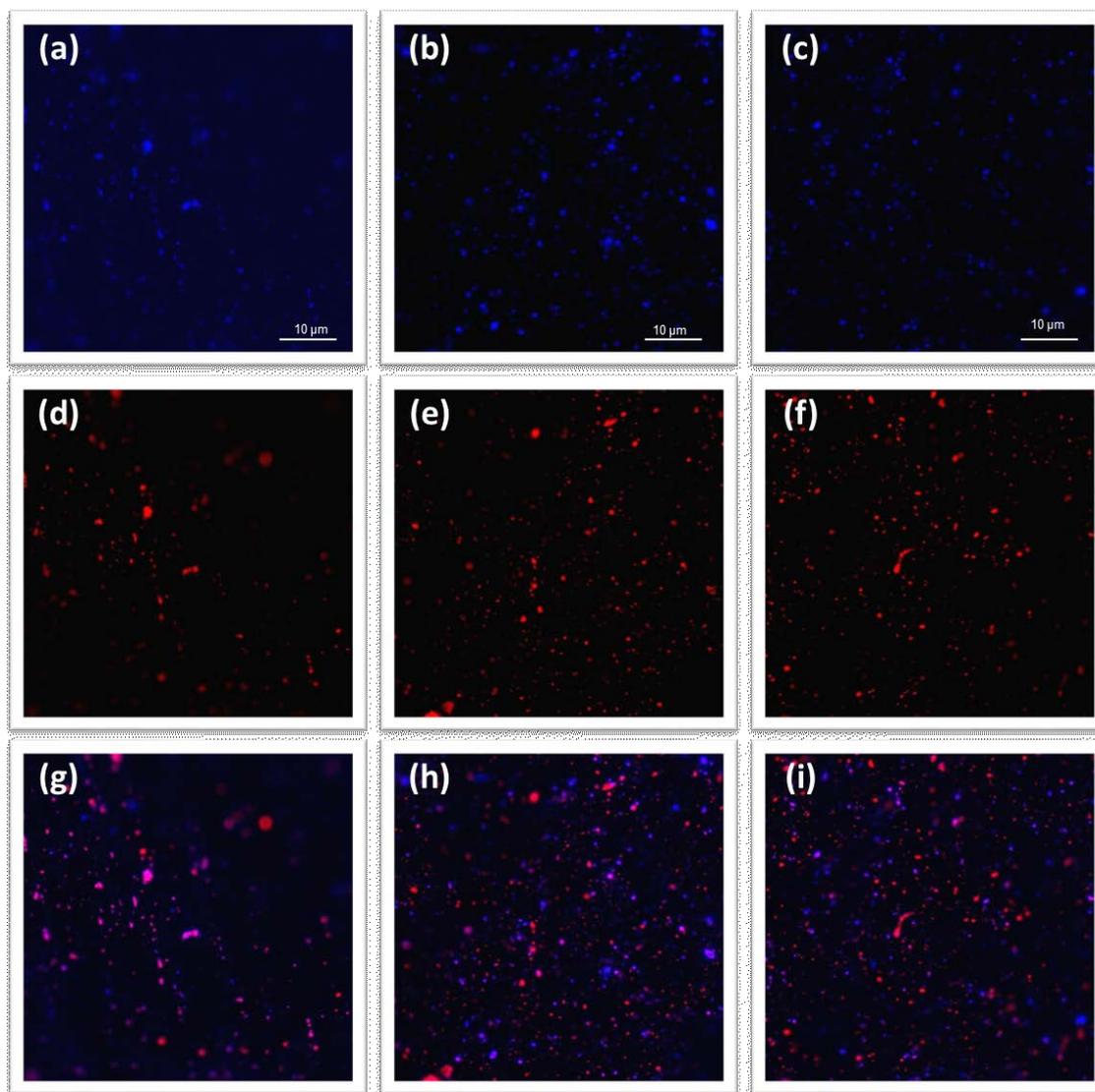


Figura 2.31. Imágenes EFM 50X de cupones de pirita incubados durante 1 día **(a, d, g)**, 3 días **(b, e, h)** y 6 días **(c, f, i)** con células de *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre tetrionato. Las células fueron teñidas con DAPI **(a-c)** y sus EPS con ConA **(d-f)**. Las figuras **(g-i)** son imágenes combinadas de ambas tinciones.

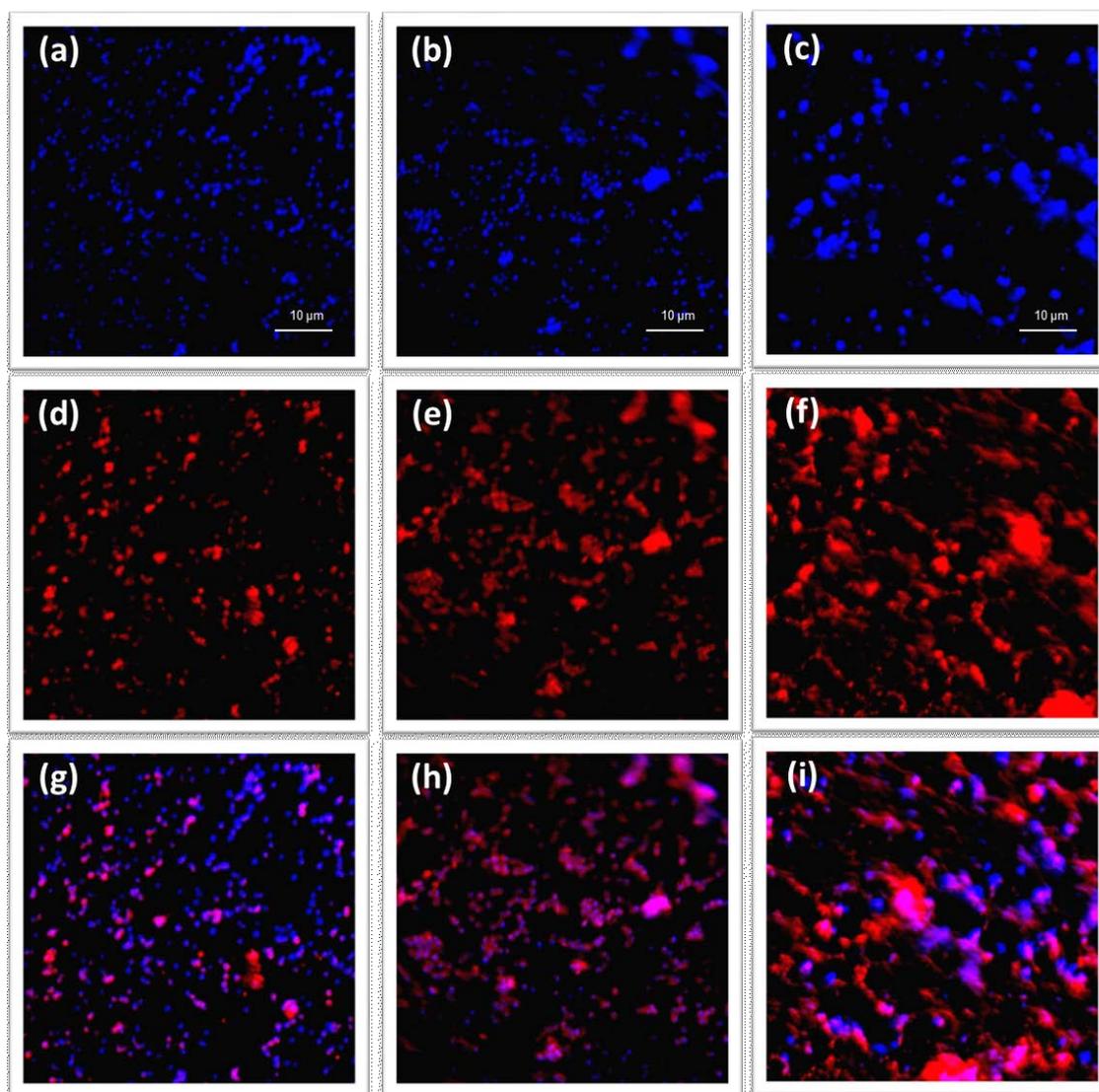


Figura 2.32. Imágenes EFM 50X de cupones de pirita incubados durante 1 día (**a, d, g**), 3 días (**b, e, h**) y 6 días (**c, f, i**) con células de *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre hierro(II). Las células fueron teñidas con DAPI (**a-c**) y sus EPS con ConA (**d-f**). Las figuras (**g-i**) son imágenes combinadas de ambas tinciones.

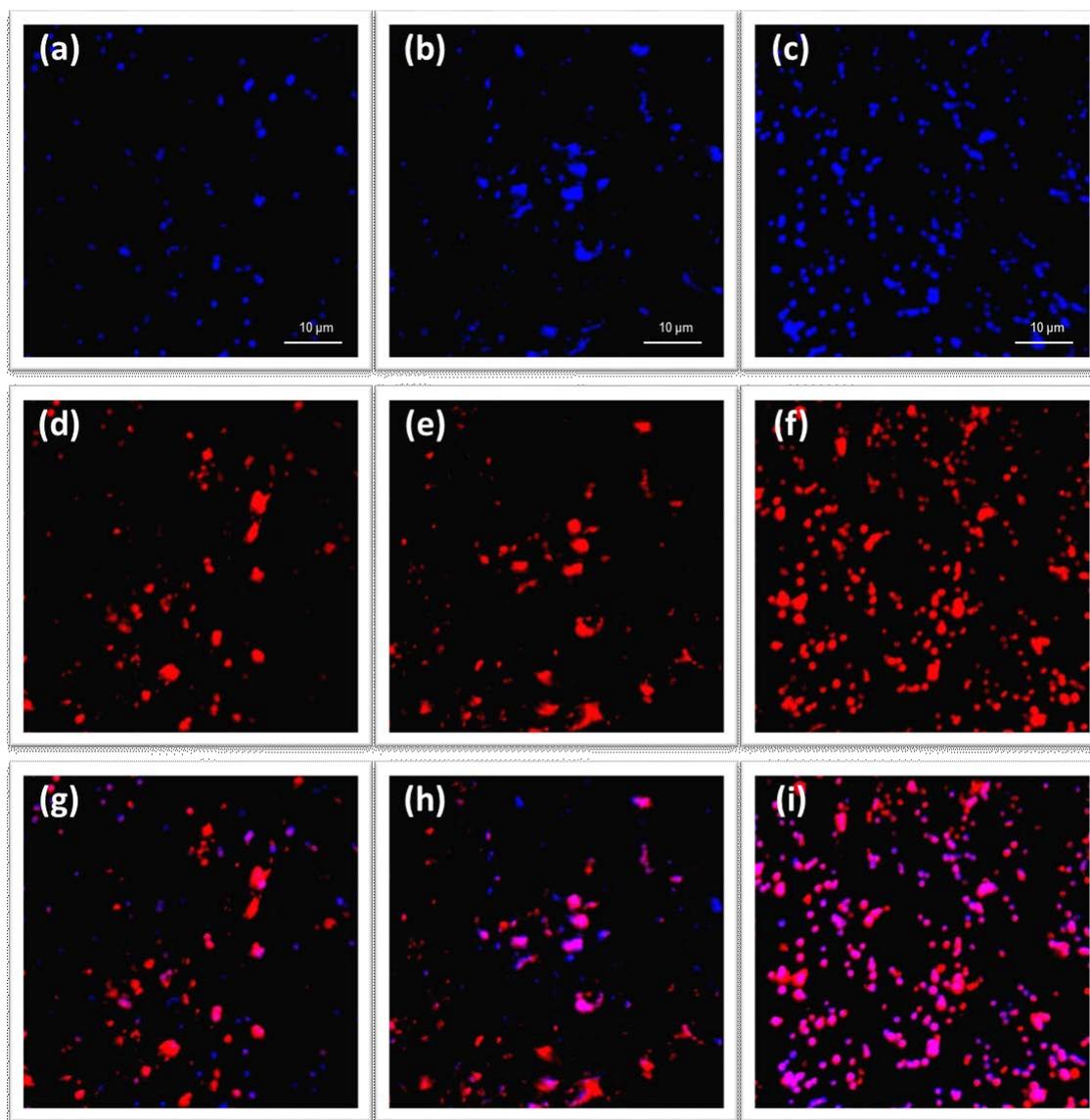


Figura 2.33. Imágenes EFM 50X de cupones de pirita incubados durante 1 día **(a, d, g)**, 3 días **(b, e, h)** y 6 días **(c, f, i)** con células de *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre pirita. Las células fueron teñidas con DAPI **(a-c)** y sus EPS con ConA **(d-f)**. Las figuras **(g-i)** son imágenes combinadas de ambas tinciones.

Bajo todas las condiciones, se observaron células adheridas sobre la superficie de los cupones de pirita luego de un día de incubación. En los ensayos realizados con células pre-crecidas sobre azufre (Fig. 2.30), no se

observaron cambios significativos en la extensión de la superficie colonizada durante los siguientes días de incubación. Luego de 3 días de incubación, la colonización con células pre-crecidas sobre tetrionato (Fig. 2.31) se incrementó levemente, manteniéndose constante incluso a los 6 días de incubación. En los ensayos realizados con células pre-crecidas sobre hierro(II) (Fig. 2.32) y pirita (Fig. 2.33) se observó un marcado aumento de la superficie colonizada durante el transcurso de la experiencia, logrando una mayor cobertura de la superficie en comparación con células pre-crecidas sobre compuestos reducidos de azufre (azufre o tetrionato). En estas condiciones las células formaron microcolonias o agregados sobre la superficie de los cupones, luego de 6 días de incubación.

La producción de EPS fue visualizada mediante tinción con la lectina ConA. Luego de un día de incubación, las células mostraron señal ConA, indicando la producción EPS en las etapas tempranas de formación de biofilms, estimulada, probablemente, por el contacto con la superficie mineral. Durante los primeros días, la señal ConA se evidenció rodeando a las células individuales, indicando que el EPS se encuentra principalmente encapsulando las células. La señal ConA aumentó junto con el incremento de la población sétil durante los siguientes días. En los ensayos realizados con células pre-crecidas sobre hierro(II), luego de 6 días de incubación, la señal TRITC-ConA también se registró sobre la superficie mineral indicando que el EPS forma parte de la base del biofilm. Una tendencia similar se observó en la colonización de pirita y calcopirita por *M. hakonensis* (Africa y col., 2013).

Las Figuras 2.30, 2.31, 2.32 y 2.33 sugieren que luego de la adhesión inicial de las células a la superficie de la pirita, se forma un biofilm en monocapa. Generalmente, los microorganismos acidófilos desarrollan biofilms con este tipo de estructura sobre minerales, tal cual ha sido

reportado para *At. ferrooxidans* (Bellenberg y col., 2012), *M. hakonensis* (Africa y col., 2013) y *F. acidiphilum* (Zhang y col., 2014).

La colonización y formación de biofilms por *A. copahuensis* también se estudió sobre cupones de azufre. En las Figuras 2.34, 2.35, 2.36 y 2.37 se muestra la adhesión de *A. copahuensis* sobre azufre, con inóculos provenientes de cultivos sobre azufre, tetrionato, hierro(II) y pirita, respectivamente.

La población sénil aumentó al tercer día de incubación con células pre-cultivadas sobre azufre aunque no se observó el mismo fenómeno con las células pre-cultivadas sobre tetrionato. Luego de seis días de incubación, *A. copahuensis* desarrolló biofilms caracterizados por colonias y agregados celulares, independientemente de la fuente de energía utilizada. Se ha demostrado que muchos microorganismos azufre oxidantes generan reservas intracelulares o extracelulares de azufre cuando crecen sobre compuestos reducidos de azufre como fuentes de energía. Esto es consistente con las observaciones señaladas en la sección 2.3.1 cuando las células de *A. copahuensis* fueron cultivadas con compuestos de azufre. Estas reservas pueden ser utilizadas por células planctónicas permitiendo el desarrollo celular sin necesidad de adherirse a la superficie del azufre para obtener energía.

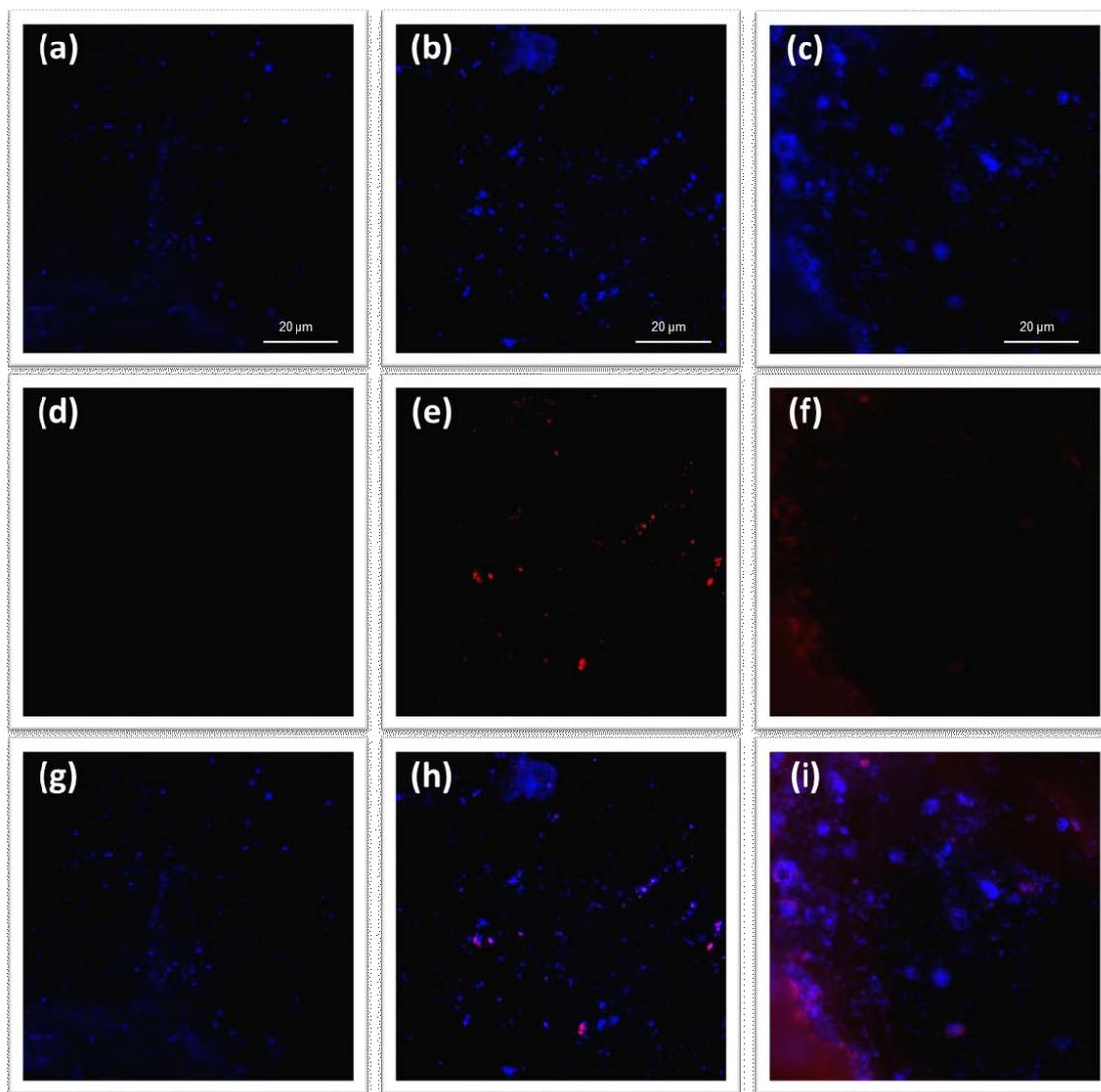


Figura 2.34. Imágenes EFM 20X de cupones de azufre incubados durante 1 día **(a, d, g)**, 3 días **(b, e, h)** y 6 días **(c, f, i)** con células de *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre azufre. Las células fueron teñidas con DAPI **(a-c)** y sus EPS con ConA **(d-f)**. Las figuras **(g-i)** son imágenes combinadas de ambas tinciones.

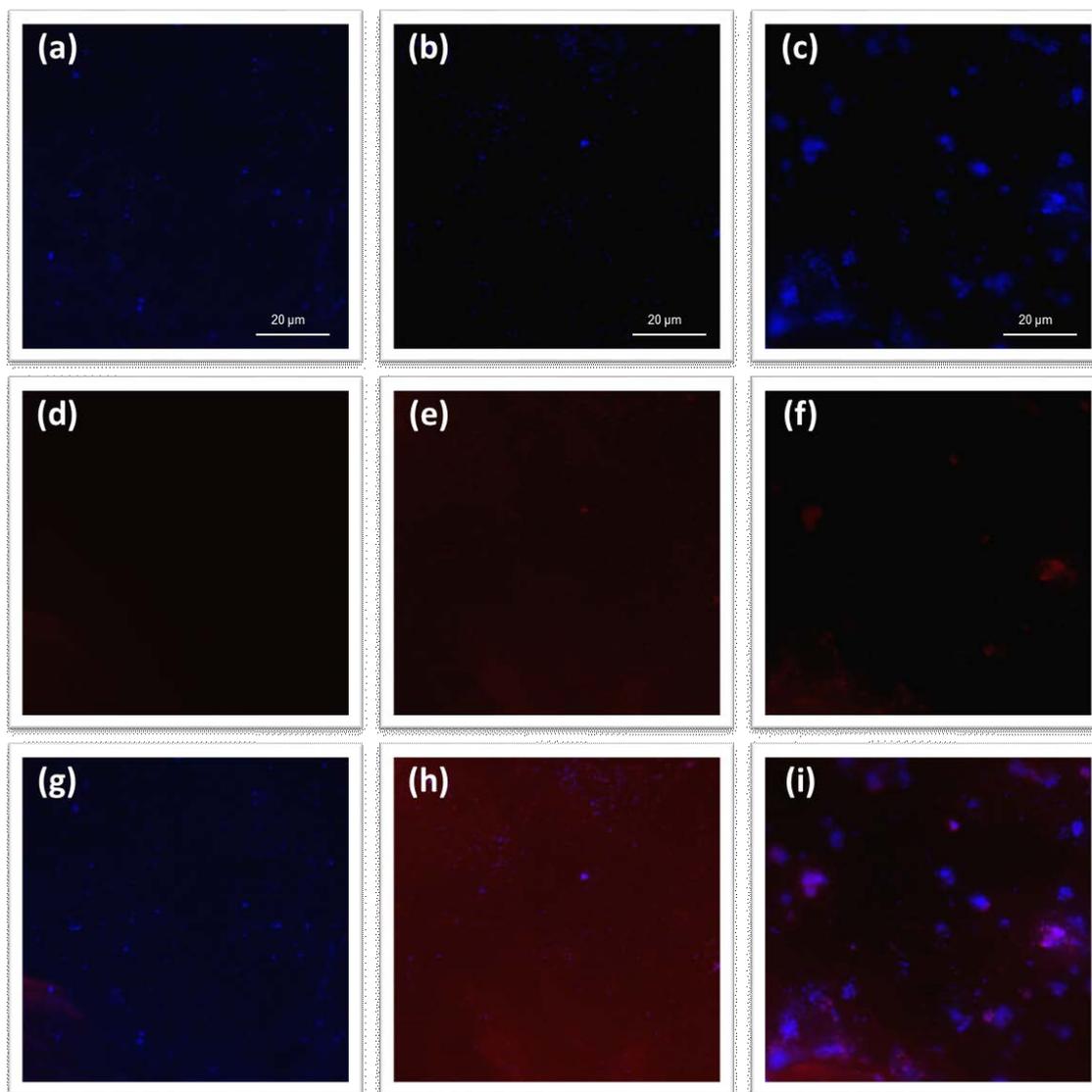


Figura 2.35. Imágenes EFM 20X de cupones de azufre incubados durante 1 día (**a, d, g**), 3 días (**b, e, h**) y 6 días (**c, f, i**) con células de *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre tetrionato. Las células fueron teñidas con DAPI (**a-c**) y sus EPS con ConA (**d-f**). Las figuras (**g-i**) son imágenes combinadas de ambas tinciones.

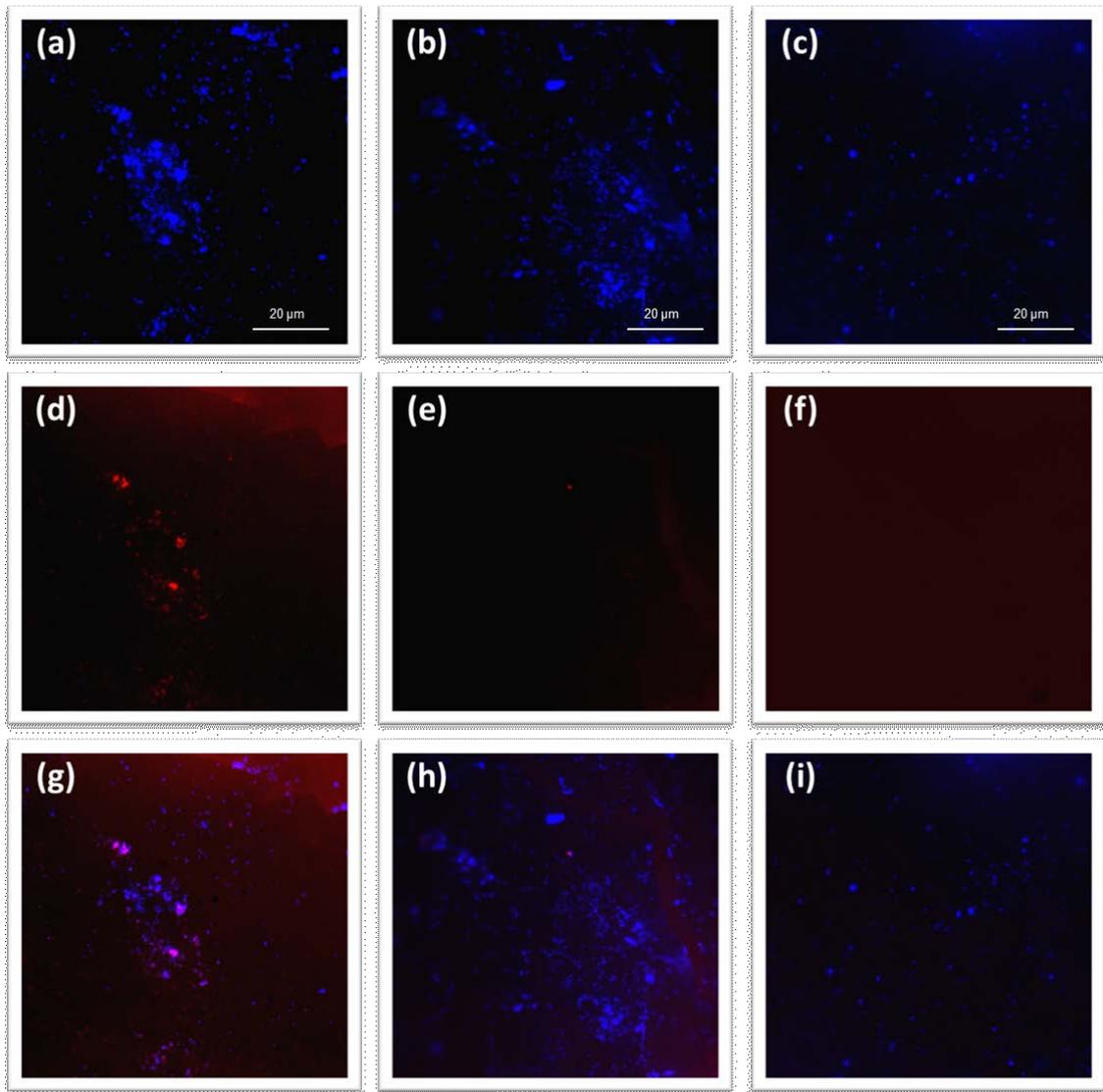


Figura 2.36. Imágenes EFM 20X de cupones de azufre incubados durante 1 día **(a, d, g)**, 3 días **(b, e, h)** y 6 días **(c, f, i)** con células *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre hierro(II). Las células fueron teñidas con DAPI **(a-c)** y sus EPS con ConA **(d-f)**. Las figuras **(g-i)** son imágenes combinadas de ambas tinciones.

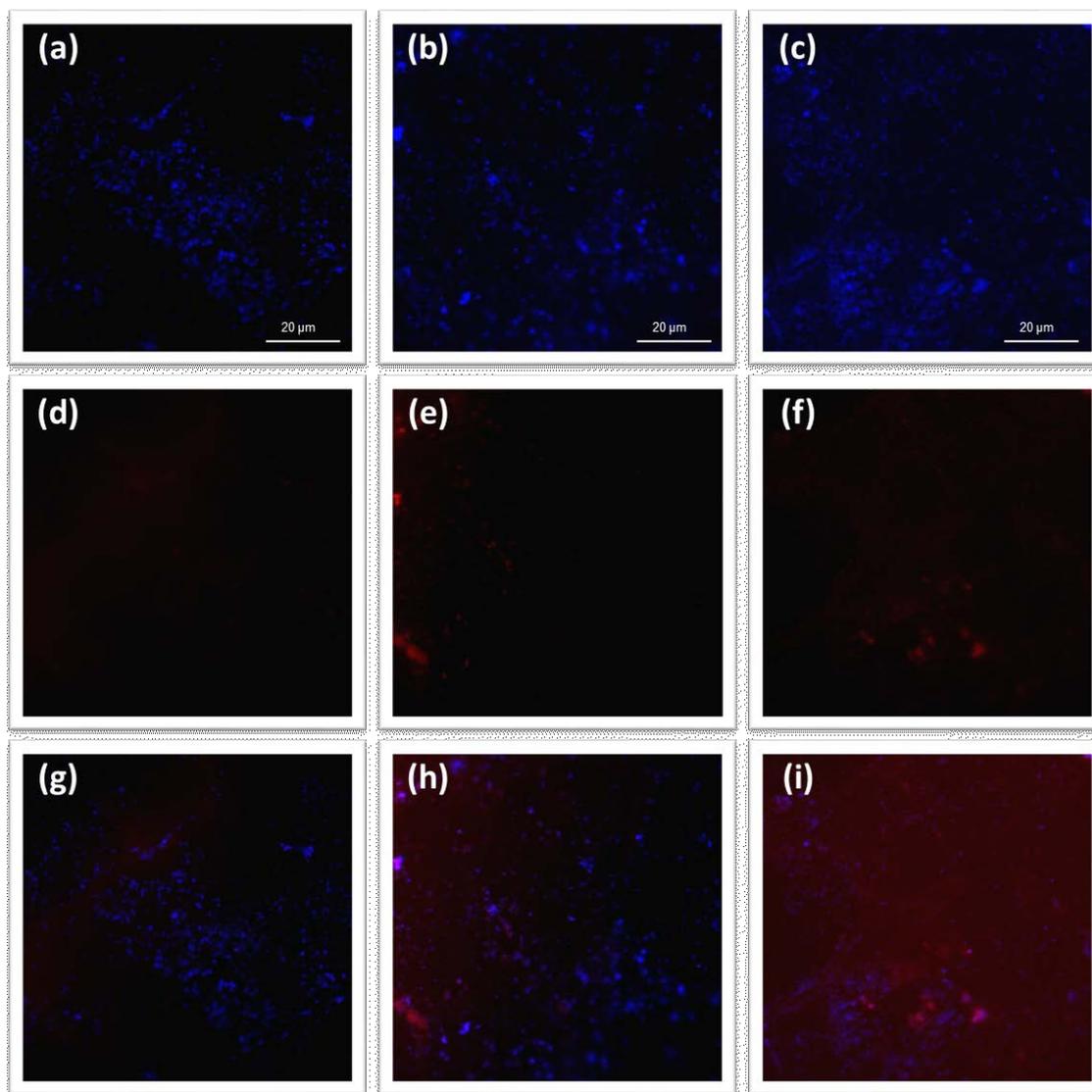


Figura 2.37. Imágenes EFM 20X de cupones de azufre incubados durante 1 día (**a, d, g**), 3 días (**b, e, h**) y 6 días (**c, f, i**) con células de *A. copahuensis* pre-cultivadas sobre hierro(II). Las células fueron teñidas con DAPI (**a-c**) y sus EPS con ConA (**d-f**). Las figuras (**g-i**) son imágenes combinadas de ambas tinciones.

En las experiencias realizadas con inóculos provenientes de cultivos sobre hierro(II) (Fig. 2.36) y sobre pirita (Fig. 2.37), se registró una tendencia distinta. La colonización se mantuvo constante o aumentó levemente durante los primeros tres días de incubación. Luego de seis días de

incubación, la superficie colonizada disminuyó, probablemente debido al proceso de dispersión del biofilm.

Del mismo modo que sobre los cupones de pirita, *A. copahuensis* parece desarrollar biofilms en monocapas sobre la superficie del azufre. Sin embargo, en estos ensayos se detectó una señal muy tenue de la lectina ConA, e incluso nula en algunos casos. Este resultado puede deberse a una menor producción de EPS cuando las células se encuentran en contacto con azufre, o a que la composición del EPS producido en estas condiciones sea de una naturaleza distinta y no puede ser detectado por la lectina TRITC-ConA.

2.4. Conclusiones generales del capítulo

A. copahuensis demostró su capacidad de crecer en medios suplementados con diferentes fuentes de energía, como azufre, tetrionato, hierro(II), pirita, glucosa y extracto de levadura. Presentó un mejor crecimiento cuando se utilizaron compuestos de azufre como fuentes de energía.

Las células experimentan cambios morfológicos de acuerdo a la fuente de energía suplementada al medio de cultivo. En presencia de compuestos de azufre, las células presentan corpúsculos intracelulares que podrían tratarse de reservas de energía. Los sustratos sólidos, como azufre elemental o pirita, inducen la producción de apéndices extracelulares, que podrían colaborar en la adhesión de las células a la superficie del azufre o mineral. Además, en presencia de pirita se detectó una mayor producción de EPS, necesarios para mediar la adhesión entre las células y la superficie mineral.

La cantidad y composición de los EPS producidos por *A. copahuensis* varían de acuerdo a la fuente de energía utilizada. Las células cultivadas con glucosa producen EPS ricos en polisacáridos, indicando que posiblemente en estas condiciones, *A. copahuensis* utilice parte del sustrato directamente en la síntesis de exopolímeros. Los carbohidratos fueron el principal componente detectado en los EPS de células planctónicas *A. copahuensis* crecidas en pirita. Por otro lado, en los EPS de los biofilms sobre pirita predominan compuestos proteicos.

La adhesión de *A. copahuensis* sobre distintos minerales ocurre rápidamente cuando las células se ponen en contacto con el mineral; su extensión depende del mineral utilizado y de las condiciones de cultivo de

las células. Este proceso se incrementó cuando las células fueron adaptadas a crecer en presencia de mineral.

A. copahuensis genera biofilms sobre superficies minerales y sobre azufre. Para ello, las células parecen secretar EPS.

Tercer capítulo

Los biofilms y la biolixiviación

En el capítulo anterior se describieron ensayos para estudiar las características celulares, los procesos de adhesión, colonización, formación de biofilms y producción de EPS por *A. copahuensis* en distintas condiciones. La principal conclusión es que las condiciones en las cuáles se cultivan las células afectan su capacidad de adhesión y formación de biofilms sobre diferentes minerales y azufre. En función de ello, en esta sección se estudiará la relación entre la formación de biofilms y la actividad biolixivante de *A. copahuensis*. Se investigará con mayor detalle el rol catalítico de *A. copahuensis* en los procesos de biolixiviación de pirita, evaluando separadamente la contribución de la población planctónica en este proceso. Además, en este capítulo se analizarán diferentes condiciones tendientes a incrementar la adhesión de los microorganismos sobre la superficie mineral y/o actividad biolixivante. Se incluirán el efecto de la limitación de fosfato, adición de L-cisteína y cultivos mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus*.

3.1. Introducción

La adhesión de microorganismos sobre la superficie mineral es un factor clave en el proceso de disolución de minerales (Vera y col., 2013). Algunos estudios conducidos con bacterias, en particular, con *At. ferrooxidans*, han demostrado que la adhesión de los microorganismos lixiviantes a la superficie mineral incrementa la disolución de los sulfuros metálicos; esto se debe a que la mayoría de las reacciones lixiviantes ocurren directamente en la interfase creada entre la superficie celular y el mineral, dentro de la matriz de EPS (Vera y col., 2013). Hasta el momento, la información equivalente para microorganismos termoacidófilos es muy escasa y es completamente nula para el caso de *A. copahuensis*. El conocimiento de estos mecanismos podría generar nuevas alternativas para incrementar la recuperación de metales mediante lixiviación utilizando microorganismos termófilos. Las evidencias mostradas en el segundo capítulo indican que *A. copahuensis* se adhiere a diversas superficies minerales secretando EPS y formando biofilms sobre la superficie mineral; esto sugiere que, tal cual se ha comprobado para otros microorganismos, podría existir una relación entre estos fenómenos y la actividad lixiviante de esta arquea. Precisamente, en este capítulo se estudiará la relación entre la formación de biofilms y la actividad biolixivante de *A. copahuensis*. Además se investigará con mayor detalle el rol catalítico de *A. copahuensis* en los procesos de biolixiviación de pirita, evaluando separadamente la contribución de la población planctónica en este proceso.

En muchas bacterias, la formación de biofilms y la producción de EPS están reguladas por QS. Las moléculas señal o autoinductores utilizados en QS pueden variar dependiendo de las especies. Por ejemplo *At. ferrooxidans* produce autoinductores del tipo N-acil-homoseril lactonas (AHLs) (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2007). En muchas bacterias la transición del estado

planctónico a sésil está regulada por los niveles intracelulares de c-di-GMP. La formación de biofilms también puede estar modulada en respuesta a la disponibilidad de fosfato (P_i) (Lamarche y col., 2008). En *At. ferrooxidans* se registró una fuerte inducción de la producción de EPS en condiciones de limitación de P_i (Bellenberg y col., 2012). Si bien se ha comprobado que algunas especies de arqueas son capaces de sobrevivir en condiciones de limitación de P_i debido a que poseen reservas intracelulares de P_i (Remonsellez y col., 2006; Orell y col., 2012), aún no se ha estudiado el efecto de la limitación de P_i en la formación de biofilms y biolixiviación y mucho menos se lo ha estudiado para la arquea que utilizamos en este trabajo de tesis. En este capítulo se estudiará el efecto de la limitación de P_i en la biolixiviación de piritita y en la formación de biofilms por *A. copahuensis*.

Algunas estrategias para mejorar las recuperaciones de metales mediante técnicas de biolixiviación se basan en modificar las propiedades superficiales del mineral mediante el agregado de algún compuesto, con el objetivo de incrementar la actividad de los microorganismos lixiviantes sobre el mismo. Algunos estudios han revelado que la adición de cantidades adecuadas de ciertas sustancias biológicas (principalmente carbohidratos y proteínas) en los medios de cultivo, incrementan las eficiencias de recuperación de metales por biolixiviación, tanto utilizando bacterias como arqueas (Ghosh y col., 2012; Hu y col., 2004; Rojas-Chapana y Tributsch, 2000; He y col., 2011; Li y col., 2013; Li y col., 2014). No obstante, el efecto varía dependiendo de la composición del mineral, de la especie microbiana y también de la naturaleza y cantidad de la sustancia adicionada. Entre estos compuestos, L-cisteína demostró una gran capacidad para acelerar las velocidades de biolixiviación de piritita y esfalerita por *At. ferrooxidans* (Hu y col., 2004; Rojas-Chapana y Tributsch, 2000), y la biolixiviación de un mineral de cobre y níquel por *At. caldus* (He y

col., 2009), *A. manzaensis* (He y col., 2011) y un consorcio de cuatro especies termófilas (Li y col., 2014). En este capítulo se describirán estudios de biolixiviación de pirita utilizando *A. copahuensis*, en presencia de distintas concentraciones de L-cisteína.

La mayoría de los estudios sobre biolixiviación con microorganismos termófilos utilizan una sola especie, mientras que los análisis microbiológicos de plantas de biolixiviación indican que varias especies están involucradas en la biolixiviación (Rawlings y Johnson, 2007). Además, la utilización de cultivos mixtos en procesos de biolixiviación de sulfuros metálicos usualmente es considerada más eficiente que la oxidación de minerales utilizando cepas puras. En este trabajo se estudiará la actividad oxidante de cultivos mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus*. También se estudiará la interacción entre estas especies y la formación de biofilms mixtos. Estos procesos han sido poco estudiados en arqueas y particularmente no existe información para biofilms mixtos de arqueas acidófilas.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Minerales

Para estos experimentos se utilizó pirita molida proveniente de la mina Suior localizada en Maramures, Cavnic, Rumania. Las características del mineral y el tratamiento previo a los ensayos se describen en la sección 2.2.1.2.

3.2.2. Microorganismos y medios de cultivo

En las experiencias detalladas en este capítulo se utilizaron las arqueas *A. copahuensis* DSM 29038 (Giaveno y col., 2013) y/o *S. metallicus* DSM 6482^T (Huber y Stetter, 1991) adquirida de la colección de microorganismos alemana DSMZ. Ambas cepas se cultivaron en medio de cultivo MAC (Anexo I) y fueron incubadas a 65°C y 150 rpm. En la sección 2.2.2 se pueden encontrar más detalles de las condiciones de cultivo.

3.2.3. Los biofilms y la actividad biolixivante

Los ensayos fueron realizados en frascos Erlenmeyers de 100 mL, conteniendo 50 mL de medio de cultivo MAC de pH 2 y 1% p/v de pirita. Los frascos se inocularon de modo de obtener una población microbiana inicial de aproximadamente 10^8 células/mL. Las células utilizadas para esta experiencia se prepararon a partir de cultivos de *A. copahuensis* creciendo bajo condiciones mixotróficas sobre distintas fuentes de energía (hierro(II), azufre, o pirita, suplementados con extracto de levadura). Los inóculos se prepararon por filtrado, centrifugación y lavado de las células, del mismo modo que para los ensayos de adhesión inicial, detallados anteriormente en la sección 2.2.7.

Los frascos se incubaron a 65 °C y en agitación a 150 rpm. Los ensayos se realizaron por duplicado y se llevaron a cabo los correspondientes controles estériles, reemplazando el volumen de inóculo por igual volumen de medio de cultivo MAC estéril.

Periódicamente se tomaron muestras de 1 mL de cada sistema para determinar pH, las concentraciones de hierro(II) y hierro total y la concentración celular (ver sección Anexos para más detalles). Cada condición se realizó por duplicado y se realizaron los correspondientes controles estériles para evaluar la lixiviación abiótica.

También se tomaron muestras de mineral para evaluar la adhesión de las células de *A. copahuensis* sobre los granos de pirita. Se lavaron con agua destilada estéril (filtrada a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro) para remover las células planctónicas (no adheridas) que pudieran estar sobre la superficie y también para eliminar compuestos del medio que puedan interferir en la posterior tinción. Las células adheridas a la superficie de los cupones se tiñeron con DAPI siguiendo el protocolo descrito en el Anexo III. Las muestras de mineral se visualizaron mediante EFM.

3.2.4. Influencia de la separación de la población planctónica y sésil de *A. copahuensis* en la biolixiviación de pirita

Con el objetivo de estudiar la actividad biolixivante en poblaciones sésiles de *A. copahuensis* se llevó a cabo un ensayo similar a los anteriormente descritos en la sección 3.2.3, utilizando como inóculos células *A. copahuensis* cultivadas con pirita y extracto de levadura. En estos experimentos, la población planctónica fue eliminada diariamente

mediante uno de los siguientes métodos: lavando el mineral con medio MAC estéril (sin fuente de energía) y renovación del medio de cultivo o mediante filtración y reutilización del mismo medio de cultivo. Diariamente se tomaron muestras de sobrenadantes para determinar pH y concentraciones de hierro(II) y hierro total (ver sección de anexos para más detalles). También se tomaron muestras de pirita para observar microscópicamente (EFM) el desarrollo del biofilm mediante tinción de las células con DAPI y visualización de la producción de EPS con lectina TRITC-ConA (Anexo III).

3.2.5. Efecto de diversos factores en la formación de biofilms y biolixiviación

3.2.5.1. Ensayos en limitación de fosfato

El efecto de la limitación de fosfato en la adhesión de células de *A. copahuensis* y en la consecuente biolixiviación de pirita, fue estudiada en ensayos similares a los descritos en la sección 3.2.3 con células cultivadas previamente en pirita. En estos ensayos se utilizó un medio de cultivo MAC modificado al que no se le agregaron fosfatos.

3.2.5.2. Ensayos con L-cisteína

La influencia de la L-cisteína en la biolixiviación fue estudiada en ensayos de biolixiviación de pirita por *A. copahuensis*. El inóculo para esta experiencia se obtuvo a partir de un cultivo de *A. copahuensis* creciendo mixotróficamente con hierro(II) como fuente de energía y se preparó mediante filtrado, centrifugación y lavado de las células, del mismo modo

que para los ensayos de adhesión inicial, detallados anteriormente en la sección 2.2.7.

Los ensayos fueron realizados en frascos Erlenmeyers de 250 mL, conteniendo 150 mL de medio de cultivo MAC pH 2 y 2% p/v de pirita. Los frascos se inocularon de modo de obtener una población microbiana inicial de aproximadamente 10^8 células/mL. Se llevaron a cabo experimentos en ausencia y presencia de distintas concentraciones de L-cisteína (100, 200 o 400 ppm) seleccionadas de acuerdo a los valores reportados en bibliografía. Los cultivos fueron incubados a 65 °C y 120 rpm. Durante la experiencia las pérdidas de agua por evaporación fueron compensadas mediante el agregado de agua destilada estéril. Periódicamente, se tomaron muestras de sobrenadante para determinar pH, Eh y concentración de hierro soluble (ver más detalles en la sección de Anexos).

3.2.5.3. Interacciones entre *A. copahuensis* y *S. metallicus*

Cultivos mixtos

Se realizaron cultivos puros y mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus* para evaluar la interacción entre las dos especies de arqueas durante la biolixiviación de pirita. Los cultivos se prepararon siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.2.3. Los cultivos mixtos fueron inoculados con una población celular inicial total de 10^8 células/mL, utilizando poblaciones de ambas especies en iguales proporciones. Periódicamente, se tomaron muestras de sobrenadante para determinar pH, Eh y concentración de hierro soluble (ver más detalles en la sección de Anexos). Además la visualización y formación de biofilms se estudió mediante EFM y CLSM utilizando sondas fluorescentes (ver más detalles en Anexo III).

De modo similar, también se estudió la formación de biofilms y actividad oxidante de las cepas en cultivos puros y mixtos, utilizando cupones de azufre en lugar de pirita. En estos ensayos se utilizó como inóculo células cultivadas previamente con azufre en condiciones mixotróficas.

Ensayos de pre-colonización

Estos experimentos fueron realizados en frascos Erlenmeyer de 100 mL, cada uno conteniendo 50 mL de medio MAC de pH 2,5 estéril y 1% p/v de pirita. Los frascos fueron inoculados alternativamente con 5×10^8 células/mL de *A. copahuensis* o de *S. metallicus*, y luego incubados durante 16 h, en agitación (150 rpm) y a 65 °C. Luego de este tiempo, aproximadamente el 85% de la población inicial se encuentra adherida al mineral; en ese momento se realizó la inactivación del biofilm colocando la pirita colonizada a 120 °C durante 1 h. La pirita fue lavada 3 veces con medio MAC para eliminar las células planctónicas o adheridas débilmente a la superficie y resuspendida en 50 mL de medio fresco. Posteriormente, los sistemas conteniendo pirita con biofilm inactivo fueron inoculadas con la cepa contraria (5×10^8 células/mL). Paralelamente se prepararon controles de inactivación de biofilm y controles utilizando pirita sin pre-colonizar. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Durante las primeras 6 h de incubación se tomaron muestras de sobrenadante para seguir la adhesión inicial de los microorganismos sobre la pirita. Periódicamente se tomaron muestras para determinar pH y las concentraciones de hierro total y de hierro(II) (ver más detalles en la sección de Anexos).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Los biofilms y la actividad biolixivante

La actividad oxidante de las células de *A. copahuensis* adaptadas a crecer con diferentes sustratos se siguió mediante la medición de pH (Fig. 3.1) y de la concentración de hierro en solución (Fig. 3.2). En todos los frascos inoculados, el pH disminuyó durante el transcurso de la experiencia. En estos sistemas los valores de pH registrados fueron inferiores al del control estéril. En los sistemas inoculados con células cultivadas previamente sobre azufre, el pH disminuyó desde 2 a 1,6. En los sistemas inoculados con células previamente cultivadas sobre hierro(II) y sobre pirita, la disminución de pH fue más pronunciada alcanzando valores cercanos a 1,6 al final del ensayo. Esta disminución sugiere la oxidación de compuestos reducidos de azufre liberados durante la disolución de pirita.

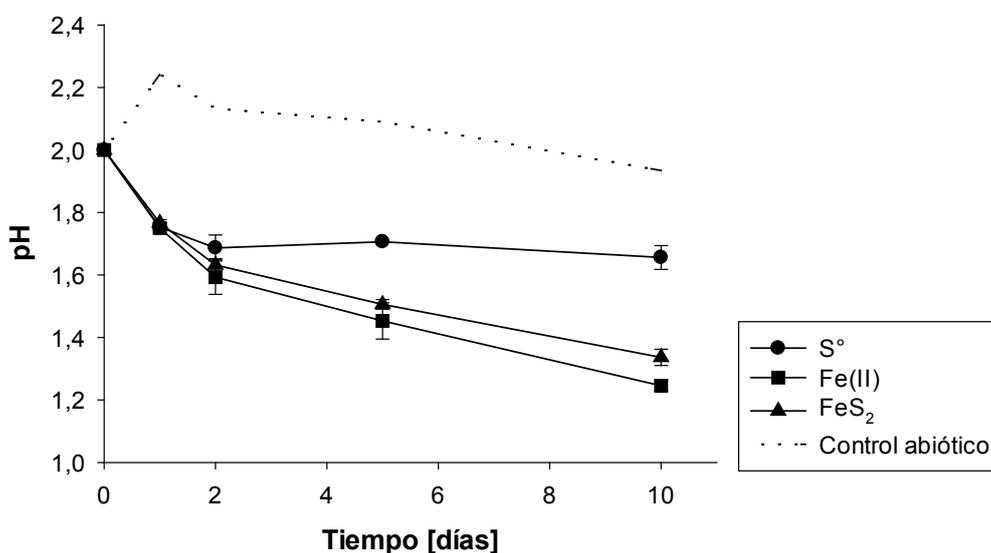


Figura 3.1. Evolución del pH durante la experiencia realizadas con células *A. copahuensis* previamente cultivadas sobre azufre, hierro(II) y pirita.

La mayor parte del hierro medido se encontró en forma de hierro(III). En todas las condiciones, la concentración de hierro(II) se mantuvo constante y muy baja (aproximadamente 6 ppm) durante toda la experiencia (Fig. 3.3). En los ensayos realizados con células previamente cultivadas sobre azufre, la concentración de hierro total durante la experiencia aumentó levemente, solubilizando aproximadamente 80 ppm de hierro luego de 10 días de incubación (Fig. 3.2). En cambio, en los sistemas inoculados con células previamente cultivadas sobre hierro(II) y sobre pirita, la concentración de hierro total en solución alcanza valores de 4500 ppm y 3300 ppm, respectivamente. En el control abiótico se solubilizaron solamente 12 ppm de hierro hacia el final de la experiencia.

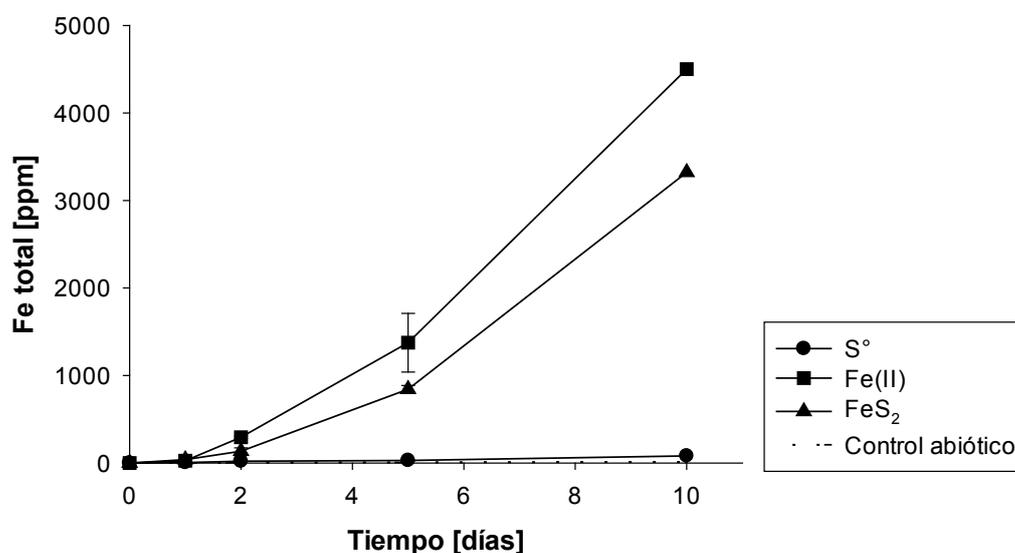


Figura 3.2. Evolución del hierro total en solución durante la experiencia realizada con células *A. copahuensis* previamente cultivadas sobre azufre, hierro(II) y pirita.

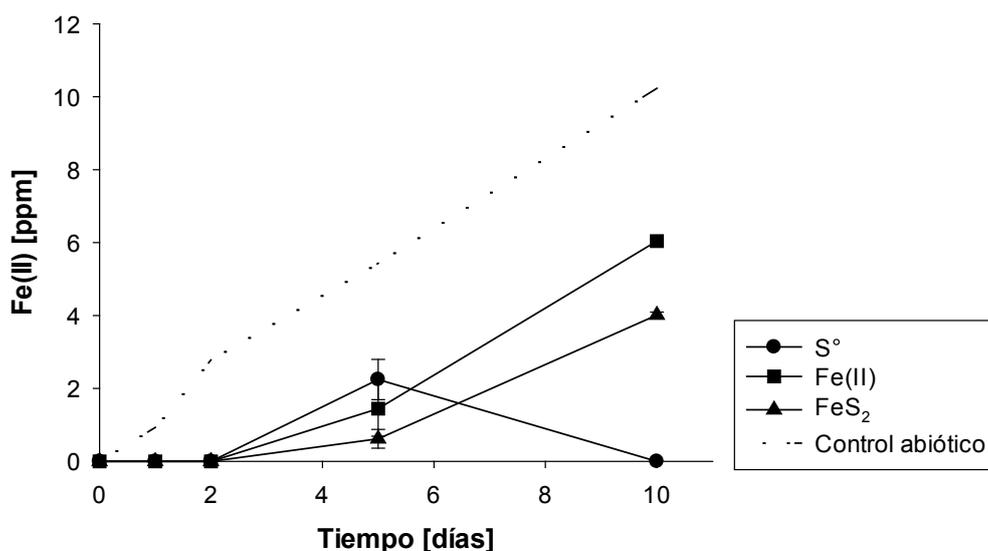


Figura 3.3. Evolución de la concentración de hierro(II) en solución durante la experiencia realizada con células *A. copahuensis* previamente cultivadas sobre azufre, hierro(II) y pirita.

Las poblaciones planctónicas mostraron comportamientos similares en las diferentes condiciones estudiadas (Fig. 3.4). Durante las primeras horas de incubación hubo un marcado aumento del número de células en solución, alcanzándose mayores recuentos en solución para las células de *A. copahuensis* previamente cultivadas sobre hierro(II) o sobre pirita, que para las previamente cultivadas sobre azufre. Luego, la población planctónica se mantiene constante coincidiendo con el aumento de la población sésil (Fig. 3.5), indicando que las células continúan dividiéndose. Al final de la experiencia se observa una leve disminución del número de células en solución, probablemente debido a que los cultivos comienzan una fase de crecimiento menos activa.

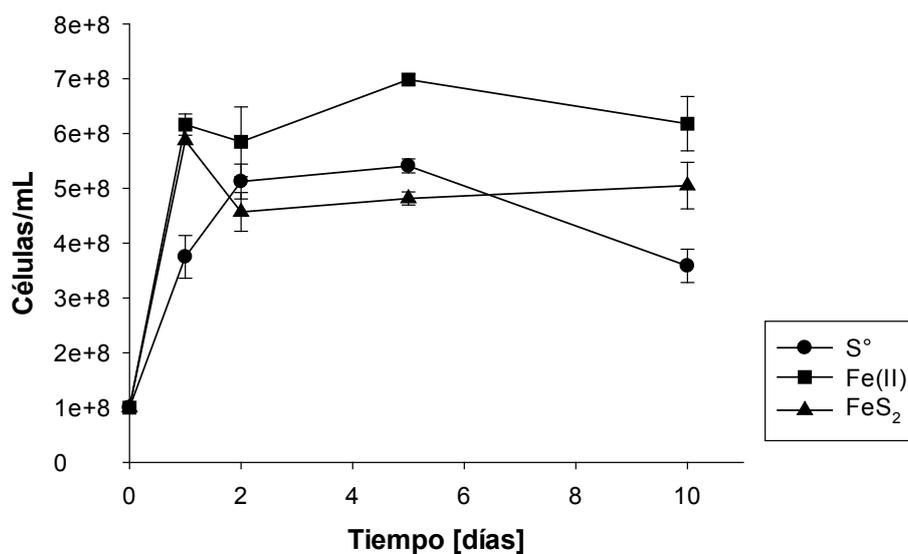


Figura 3.4. Población de células planctónicas durante los ensayos con células de *A. copahuensis* previamente cultivadas sobre azufre, hierro(II) y pirita.

En la Figura 3.5 se muestran las imágenes de epifluorescencia de granos de pirita incubados con células de *A. copahuensis* cultivadas previamente sobre azufre (Fig. 3.5a), hierro(II) (Fig. 3.5b) y pirita (Fig. 3.5c).

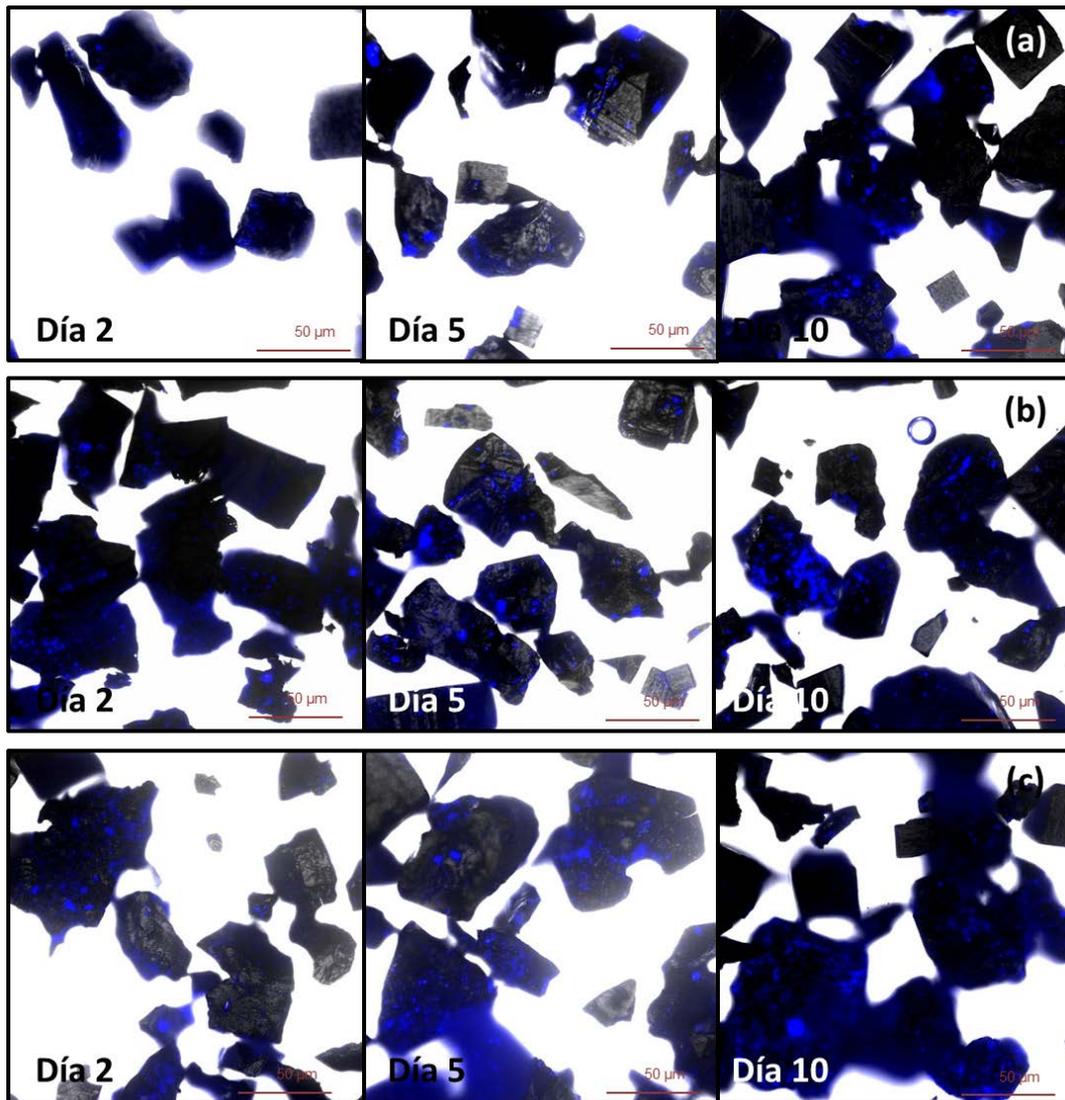


Figura 3.5. Imágenes EFM de granos de pirita incubadas diferentes tiempos, con células de *A. copahuensis* cultivadas previamente sobre azufre **(a)**, hierro(II) **(b)**, y pirita **(c)**. Las células fueron teñidas con DAPI (azul).

En las imágenes puede detectarse un aumento de la colonización de los granos de pirita con el transcurso de los días. Sin embargo, cuando las células fueron adaptadas a crecer sobre azufre se observó una menor colonización de la superficie mineral en comparación con las células adaptadas a crecer sobre hierro(II) o pirita. Estos resultados coinciden con las previamente expuestos en las secciones 2.3.5 y 2.3.6, en los cuáles se

pudo detectar una mayor afinidad de adhesión y formación de biofilms sobre pirita cuando las células estaban adaptadas a crecer con hierro(II) o pirita.

Las células de *A. copahuensis* pueden catalizar la solubilización de pirita, especialmente si han sido previamente cultivadas sobre hierro(II) o sobre pirita. El aumento de la adhesión se vio reflejado en un incremento de la disolución de pirita. Las células cultivadas sobre azufre sólo lograron una baja oxidación de pirita, aunque se desarrollaron significativamente probablemente a expensas de la oxidación de compuestos de azufre liberados de la pirita y/o utilizando reservas celulares de azufre.

3.3.2. Influencia de las poblaciones planctónica y sésil de *A. copahuensis* en la biolixiviación de pirita

Se realizaron ensayos de biolixiviación para evaluar separadamente la contribución del biofilm de *A. copahuensis* en la disolución de pirita. Los resultados fueron comparados con ensayos realizados en las mismas condiciones, pero sin separar la población planctónica y el biofilm. Se realizó un control abiótico en el cuál no se observaron cambios significativos a lo largo de la experiencia y por simplicidad no se muestran en los gráficos. Durante los primeros 3 días, la concentración de hierro total en solución fue similar en todos los ensayos, independientemente si se separaban o no la población planctónica y el biofilm (Fig. 3.6). Luego de ese tiempo, en los ensayos que se eliminó la población planctónica se registró una mayor disolución de hierro total, comparado con los ensayos con ambas poblaciones (planctónica y biofilm). Cuando se eliminó diariamente la población planctónica (mediante recambio del medio de cultivo o por filtración) la concentración de hierro total en solución alcanzó valores de

aproximadamente 1100 ppm luego de 10 días de incubación; esta concentración fue aproximadamente un 40% mayor que en los ensayos con ambas poblaciones.

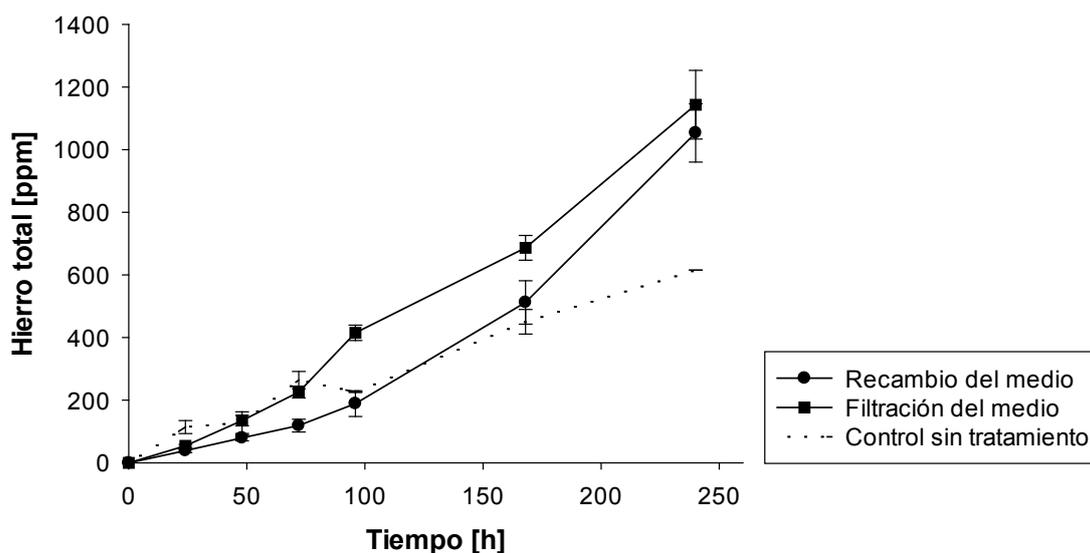


Figura 3.6. Evolución de hierro total en solución en los ensayos realizados con poblaciones sésiles de *A. copahuensis*.

Cuando la población planctónica fue eliminada diariamente mediante filtración aproximadamente el 35% del hierro total medido se encontró como hierro(II) durante los primeros 4 días de incubación; luego, el nivel de hierro(II) disminuyó hasta 18,7% al final del ensayo (Fig. 3.7). Una tendencia similar se observó en los ensayos con ambas poblaciones, alcanzando el 28% y 4,5% de hierro(II) a los 4 y 10 días de incubación, respectivamente. Por otra parte, en los ensayos con recambio del medio de cultivo el nivel de hierro(II) se mantuvo relativamente constante durante los primeros 7 días (41-45%) y luego desciende hasta aproximadamente el 26% al final de la experiencia. En todos los sistemas inoculados la mayor proporción de

hierro disuelto, se encontró como hierro(III), mientras que en el control abiótico la mayor parte del hierro se detectó como hierro(II), indicando que los microorganismos son los principales responsables de la oxidación de hierro(II) liberado durante la disolución de la pirita.

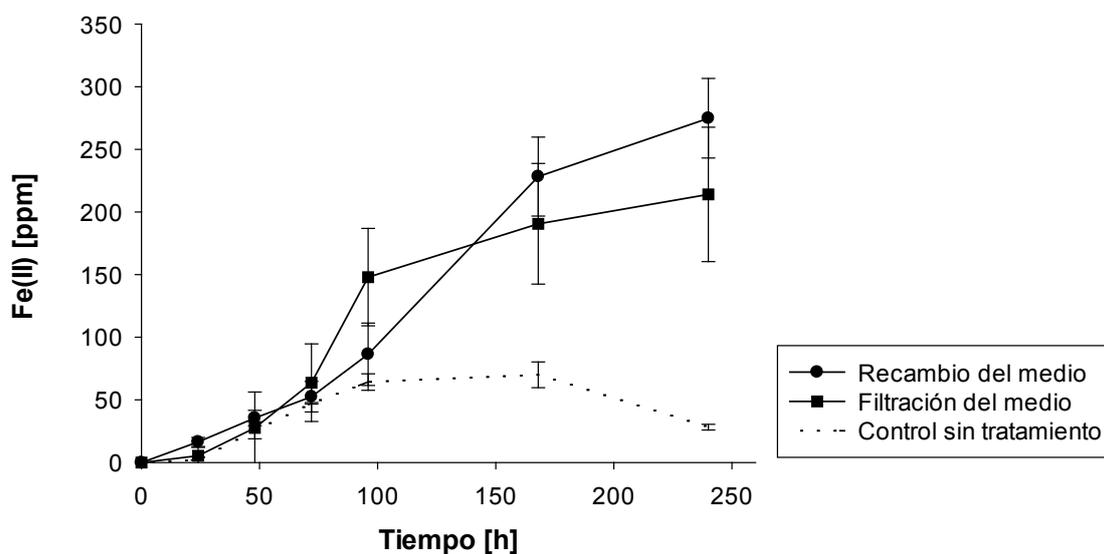


Figura 3.7. Evolución de hierro(II) en solución en los ensayos realizados con poblaciones sésiles de *A. copahuensis*

En todas las condiciones, los valores de pH descendieron durante el transcurso del ensayo (Fig. 3.8). El pH disminuyó de 2,5 a 1,4 en los ensayos sin tratamiento mientras que cuando se eliminaron las células planctónicas por filtración y mediante recambio del medio, el pH disminuyó hasta 1,6 y 2,0, respectivamente. Estos resultados sugieren la oxidación de compuestos reducidos de azufre liberados a partir de la disolución de la pirita, tanto por células sésiles como planctónicas.

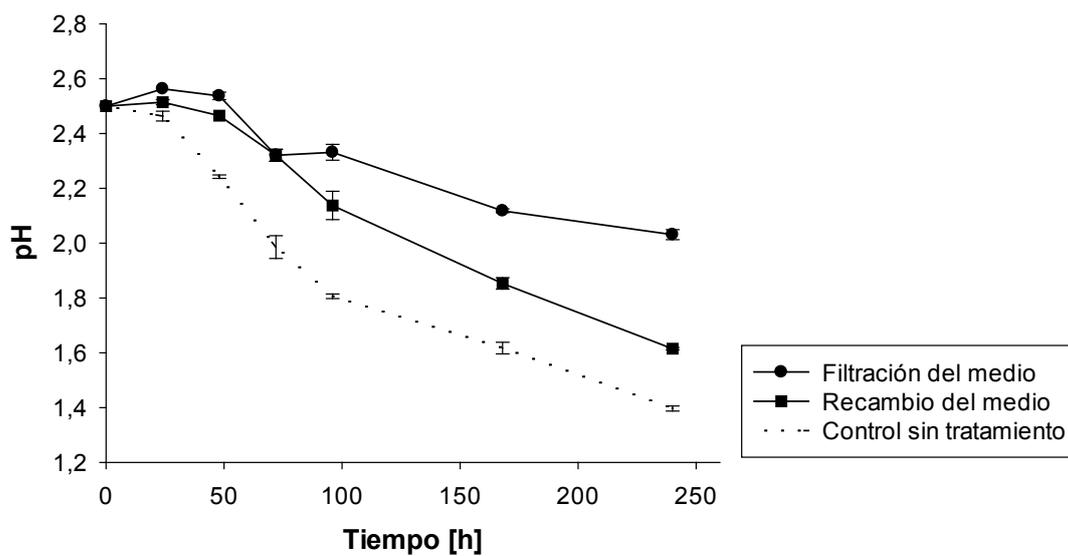


Figura 3.8. Evolución del pH en los ensayos realizados con poblaciones sésiles de *A. copahuensis*.

En la Figura 3.9 se muestran las células teñidas con DAPI adheridas a la superficie del mineral y sus EPS que fueron teñidos con lectina ConA.

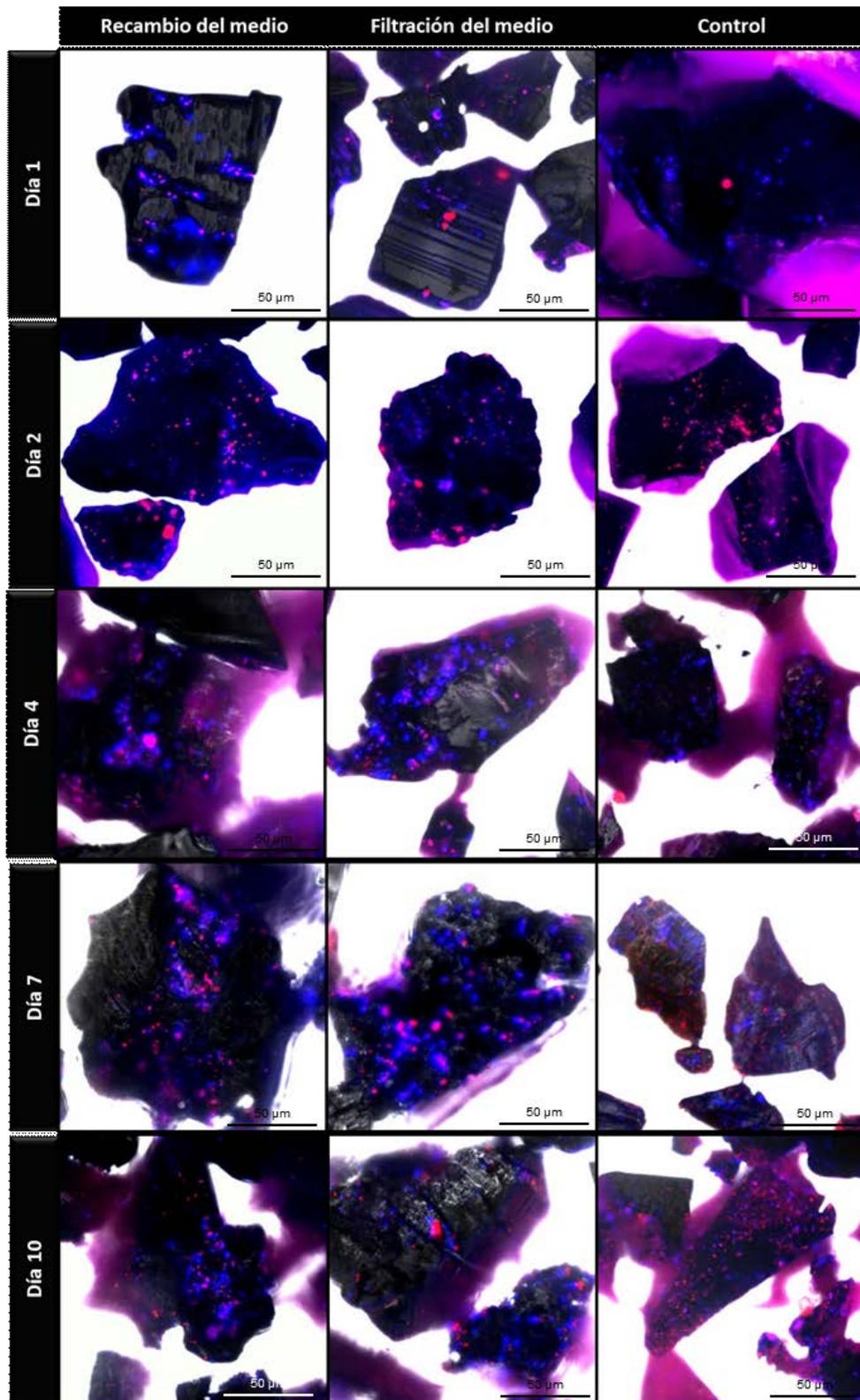


Figura 3.9. Imágenes EFM de células *A. copahuensis* adheridas a pirita, teñidas con DAPI (azul) y sus EPS con lectina ConA (rojo) durante las experiencias realizadas con poblaciones sésiles.

En el control biótico se observó un incremento en la colonización de la superficie a medida que transcurrió la experiencia. Sin embargo, la cobertura de la superficie fue menor que la que se registró en los sistemas donde se eliminó la población planctónica. Precisamente, en estos sistemas se observó un aumento de la superficie colonizada durante los primeros 7 días de incubación; luego de 10 días, comenzó una disminución de células adheridas probablemente debido a la dispersión del biofilm.

Los resultados obtenidos en esta experiencia sugieren que, del mismo modo que lo que se ha encontrado para bacterias mesófilas, en la disolución de pirita por *A. copahuensis*, las poblaciones sésiles cumplen un rol preponderante. El aumento de la población sésil estuvo acompañado por un incremento en la disolución de hierro a través del mecanismo de contacto donde los microorganismos adheridos actúan sobre el sulfuro a través de las reacciones que ocurren esencialmente en la matriz construida con EPS sobre el mineral. También sugiere que la presencia de células planctónicas afecta negativamente la colonización y la consecuente disolución de pirita. Esta diferencia podría deberse a la acumulación de algún producto metabólico que inhibe la actividad microbiana y que es eliminado mediante el recambio o filtración del medio. Por otro lado, muchas especies bacterianas son capaces de censar mediante QS la densidad poblacional y de este modo modular diversos procesos microbianos como la formación de biofilms o actividad oxidante y es posible que este mecanismo también funcione para arqueas; el conocimiento sobre estos mecanismos en arqueas es aún muy pobre y es una de las áreas sobre la que debe trabajarse intensamente en el futuro próximo.

3.3.3. Efecto de diversos factores en la formación de biofilms y biolixiviación

3.3.3.1. Efecto de la limitación de fosfato

La respuesta de *A. copahuensis* a condiciones de limitación de P_i se estudió utilizando medio de cultivo MAC sin P_i . Los recuentos celulares obtenidos en condiciones de deficiencia de P_i fueron levemente inferiores que los registrados en las mismas condiciones con P_i (Fig. 3.10), probablemente debido al estrés de los microorganismos por limitación de un nutriente esencial como el fósforo. Estos resultados indican que *A. copahuensis* es capaz de crecer en condiciones de deficiencia de P_i , sugiriendo la posible existencia de reservas de P_i en esta arquea.

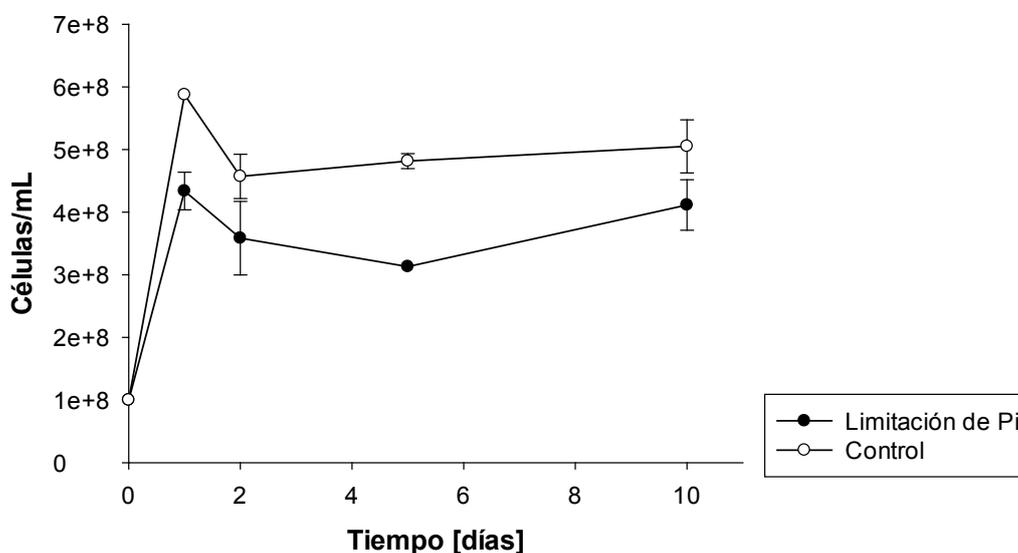


Figura 3.10. Población celular de cultivos de *A. copahuensis* en condiciones de limitación de P_i .

Varias especies de microorganismos acidófilos, como *At. ferrooxidans*, *At. caldus*, *At. thiooxidans*, *S. metallicus* y *M. sedula*, son capaces de acumular gránulos compuestos por fosfatos inorgánicos (polyP) (Navarro y col., 2013; Orell y col., 2012). Otras especies de arqueas como *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* son capaces de sintetizar polyP durante su crecimiento, pero no los acumulan en grandes cantidades (Remonsellez y col., 2006). Estas reservas de P_i también han sido detectadas en otros tipos de microorganismos como *Thiomona arsenitoxidans* (Arséne-Ploetze y col., 2010). Estos gránulos constituyen una reserva intracelular de P_i , que permite el desarrollo microbiano en condiciones de carencia de P_i . Además, se ha sugerido que las reservas de polyP funcionan como quelantes de iones metálicos e intervienen en la regulación de la expresión de ciertos genes (Lamarche y col, 2008; Navarro y col., 2013; Orell y col., 2013; Seufferheld y col., 2008). El metabolismo de los polyP está ligado a varios procesos fisiológicos, incluyendo motilidad, desarrollo de biofilms, QS y virulencia (Seufferheld y col., 2008). Algunas especies de arqueas halófilas como *Haloferax volcanii*, si bien no poseen reservas de P_i , tienen la ventaja de utilizar ADN como fuente de fosfatos en condiciones de limitación de este nutriente esencial (Chimileski y col., 2014; Zerulla y col., 2014). Aunque nuestros experimentos no permiten decidirlo, es probable que algunos de estos mecanismos permita explicar la capacidad de *A. copahuensis* de sobrevivir y desarrollarse en condiciones de limitación de fosfato.

La limitación en P_i afecta de un modo distinto a la población sésil; en las imágenes de los granos de pirita puede observarse una mayor adhesión microbiana sobre la superficie mineral en condiciones de deficiencia de P_i (Fig. 3.11).

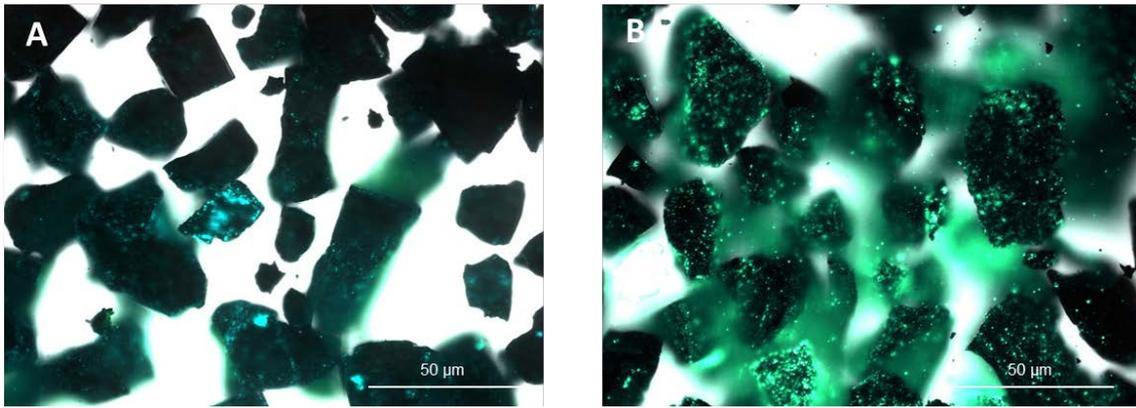


Figura 3.11. Imágenes EFM de células *A. copahuensis* teñidas con DAPI y adheridas a la superficie de pirita luego de 7 días de incubación. **(A)** adhesión de células previamente cultivadas sobre pirita en presencia de cantidades suficientes de P_i , y **(B)** adhesión de células previamente cultivadas sobre pirita en condiciones de deficiencia en P_i .

Las Figuras 3.12 y 3.13 muestran la evolución de pH y hierro total en solución durante esta experiencia. El comportamiento del pH es muy similar al del control realizado con células previamente cultivadas sobre pirita en presencia de cantidades suficientes de P_i . *A. copahuensis* logró solubilizar 4500 ppm de hierro luego de 10 días de incubación. Esta disolución fue aproximadamente 30% mayor que en el control realizado con cantidades suficientes de P_i .

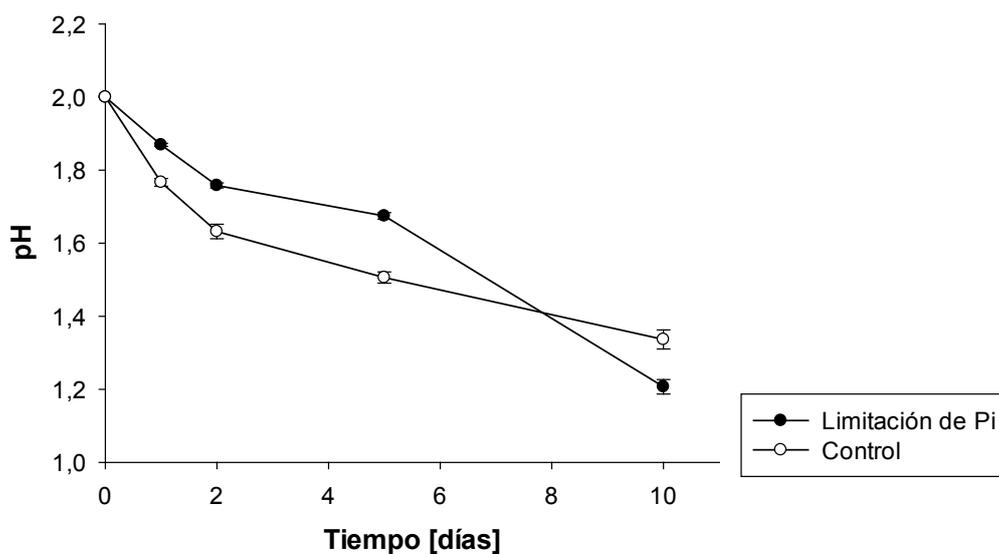


Figura 3.12. Evolución del pH durante la experiencia realizada con *A. copahuensis* en condiciones de limitación en P_i .

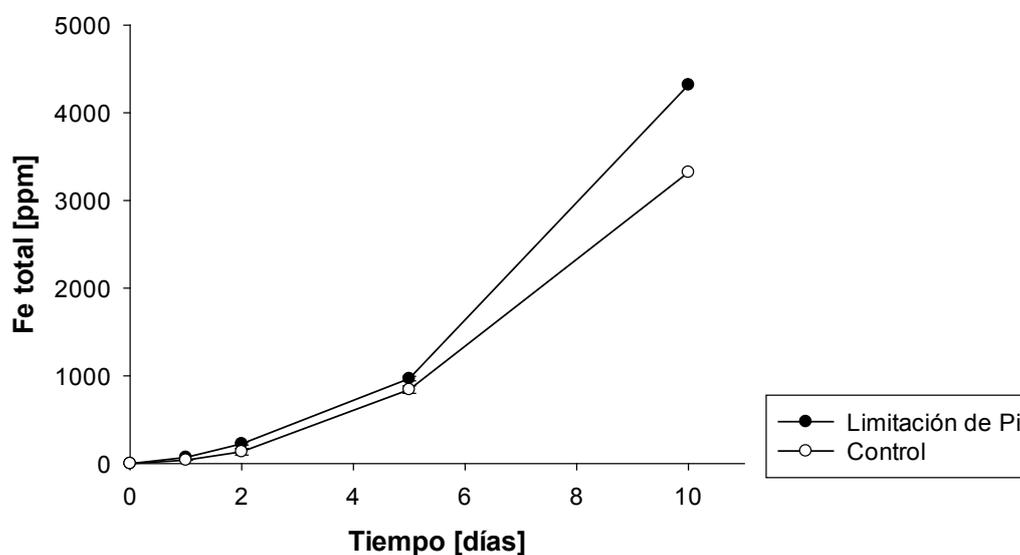


Figura 3.13. Evolución de hierro total en solución en la experiencia realizada con *A. copahuensis* en condiciones de limitación en P_i .

El aumento de la biolixiviación de pirita en condiciones de limitación en P_i , podría ser el resultado de una mayor cantidad de microorganismos

adheridos sobre la superficie mineral o debido a que la disponibilidad de fosfatos esté modulando la actividad de los microorganismos. Para *At. ferrooxidans* se ha sugerido que la deficiencia de fosfato induce la expresión de genes relacionados a QS y la producción de EPS (Bellenberg y col., 2012). No existe, hasta el momento, información equivalente para arqueas termófilas.

3.3.3.2. Efecto de la adición de L-cisteína

Se realizaron ensayos de biolixiviación para evaluar el efecto de la adición de L-cisteína en la disolución de pirita por *A. copahuensis*. En la Figura 3.14 se muestran los cambios en la concentración de hierro total soluble en los ensayos de biolixiviación con la adición de distintas concentraciones de L-cisteína; los resultados fueron comparados con ensayos de biolixiviación realizados sin el agregado de L-cisteína. En las figuras se incluye de modo representativo el control abiótico realizado con 400 ppm de L-cisteína.

En los ensayos realizados con 100 ppm de L-cisteína, la concentración de hierro total soluble luego de 36 días de incubación es similar al control sin L-cisteína (aproximadamente 1900 ppm). El agregado de mayores concentraciones de L-cisteína provocó un efecto negativo en la disolución de hierro, disminuyendo las recuperaciones de hierro en un 45% y 64% cuando se adicionaron 200 ppm y 400 ppm de L-cisteína, respectivamente. Esta disminución en la recuperación de hierro indica que concentraciones superiores a 200 ppm reducen la biolixiviación de pirita por *A. copahuensis*; posiblemente debido a que estos niveles de L-cisteína resultan tóxicos o inhiben la actividad de los microorganismos.

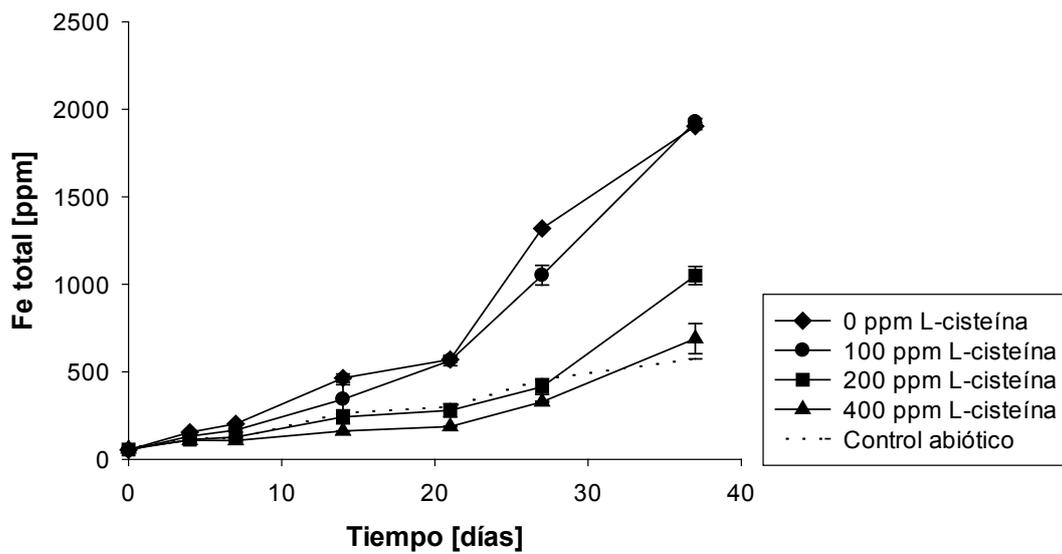


Figura 3.14. Concentración de hierro total disuelto durante la biolixiviación de pirita en presencia de distintas concentraciones de L-cisteína.

En todas las condiciones el pH disminuyó durante el transcurso de la experiencia (Fig. 3.15). Durante los primeros días de incubación disminuyó lentamente y decreció a mayor velocidad a partir de los 21 días de incubación. Los valores de pH disminuyeron hasta aproximadamente 1,2 en los ensayos con 0 y 100 ppm de cisteína. Con mayores concentraciones de L-cisteína los valores de pH al final de la experiencia fueron cercanos a 1,5. Estos resultados indican una disminución de la actividad azufre oxidante de los microorganismos con el agregado de concentraciones mayores a 200 ppm de L-cisteína.

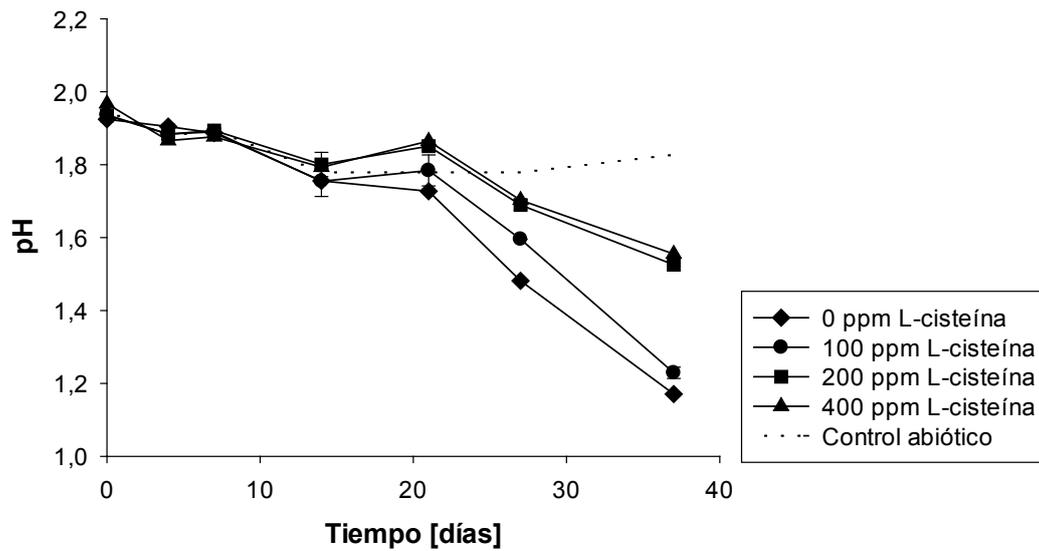


Figura 3.15. Evolución de pH durante la biolixiviación de pirita en presencia de distintas concentraciones de L-cisteína.

En nuestros ensayos, la adición de L-cisteína redujo los valores de potencial redox (Fig. 3.16). Sin el agregado de L-cisteína, el potencial redox se mantiene en valores mayores a 400 mV, mientras que la adición de 100 ppm de L-cisteína disminuye levemente los valores de potencial redox. El agregado de 200 ppm y 400 ppm de L-cisteína generaron una marcada disminución de los valores de potencial redox, manteniéndose en valores inferiores a 400 mV durante toda la experiencia.

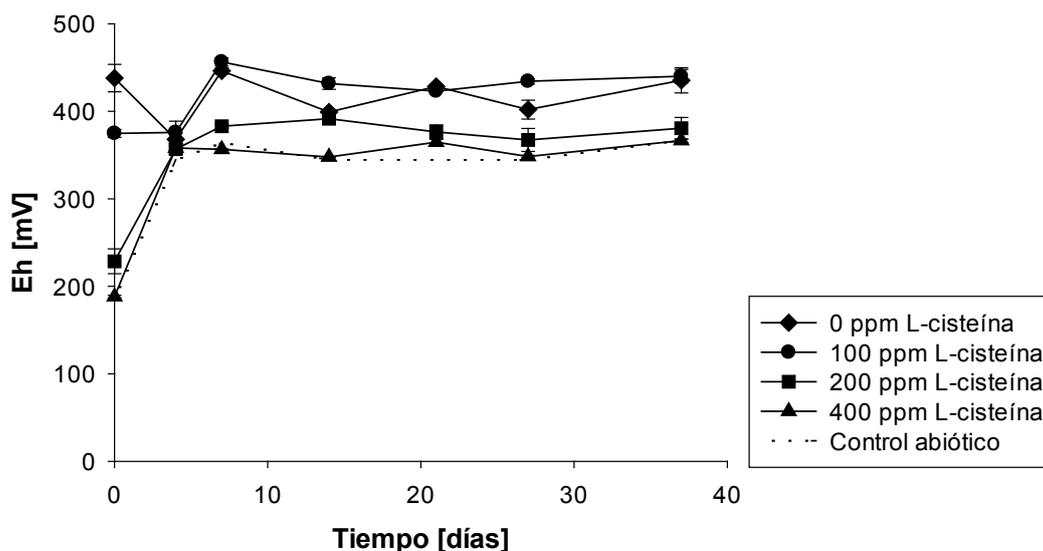


Figura 3.16. Potencial redox durante la biolixiviación de pirita en presencia de distintas concentraciones de L-cisteína.

Los resultados obtenidos en esta experiencia indican que la adición de concentraciones de L-cisteína mayores a 100 ppm no favorecen la biolixiviación de pirita por *A. copahuensis*. Posiblemente estas concentraciones resultan tóxicas e inhiben la actividad de *A. copahuensis*. Estos resultados son opuestos a los reportados en la mayoría de los trabajos sobre biolixiviación con L-cisteína (He y col., 2011; Hu y col., 2004; Li y col., 2014; Rojas-Chapana y Tributsch, 2000). Li y col (2014) estudiaron la composición de una comunidad de termófilos durante la biolixiviación de un sulfuro de Ni y Cu en presencia de L-cisteína; encontraron que la composición de la comunidad microbiana difiere significativamente entre los tratamientos con y sin L-cisteína. Este resultado indica que la L-cisteína afecta de diferente modo a las distintas especies termófilas. *A. copahuensis* podría ser más susceptible a la presencia de L-cisteína que las otras especies microbianas utilizadas en los trabajos similares de biolixiviación con L-cisteína. Además, Hu y col (2009) reportaron que la adición de L-

cisteína incrementa la velocidad de biolixiviación de un sulfuro de Ni y Cu por *At. caldus*; pero inhibe la biolixiviación de marmetita por esta misma especie. Este resultado sugiere que el efecto de la adición de L-cisteína no sólo depende de la especie de microorganismo, sino también del mineral.

Rojas-Chapana y Tributsch (2000) propusieron un mecanismo mediante el cual la L-cisteína podría favorecer la lixiviación de pirita. La L-cisteína forma complejos con los iones hierro y el azufre de la superficie mineral, a través de enlaces FeS-R y FeS-S-R (S-R, cisteína). Esta interacción altera la estructura del sulfuro metálico y provoca la formación de complejos Fe-Cisteína y pirita-cisteína. El complejo pirita-cisteína se reorganiza y produce la liberación de un complejo Fe-S-cisteína. Este complejo sirve como transportador de energía hacia los microorganismos, que regeneran la cisteína y el ion metálico. La interacción de la L-cisteína es complicada y el mecanismo propuesto no es completamente claro. Son necesarios estudios adicionales para comprender este mecanismo, que podría ayudar en la búsqueda de aditivos económicos que mejoren las eficiencias de biolixiviación.

3.3.3.3. Interacciones entre *A. copahuensis* y *S. metallicus*

Cultivos mixtos

La actividad azufre oxidante de *A. copahuensis* y *S. metallicus* cultivadas conjuntamente, fue estudiada y comparada con la actividad de los cultivos puros de ambas especies. En la Figura 3.17 se muestra la evolución del pH en los cultivos puros y mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus*.

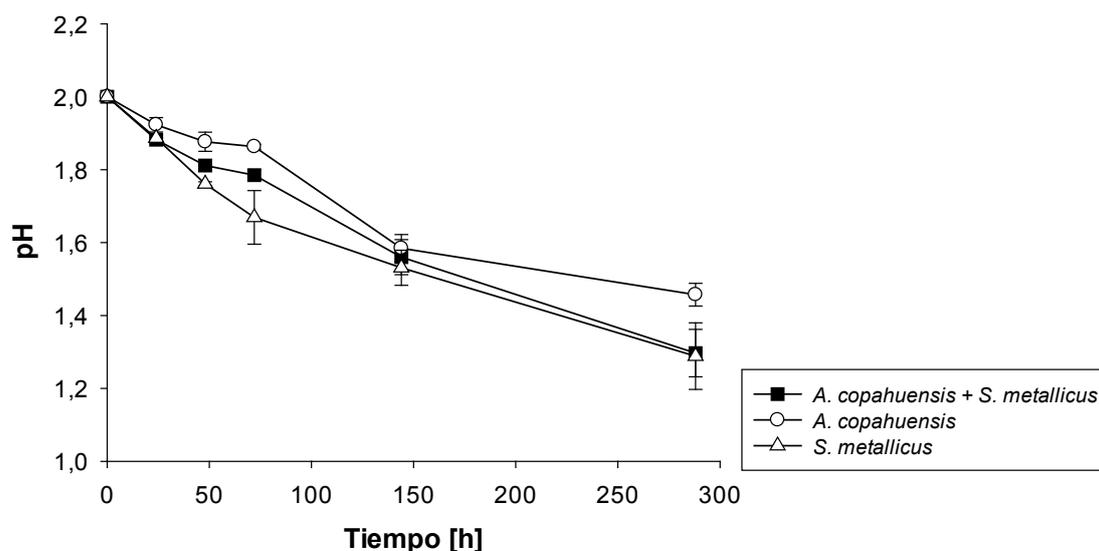


Figura 3.17. Evolución del pH en cultivos puros y mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus*.

En todos los cultivos, el pH disminuyó desde el inicio de la experiencia debido a la oxidación de azufre por los microorganismos y a la consecuente producción de ácido. En los cultivos de las especies puras se observó que la disminución de pH fue más rápida y pronunciada para *S. metallicus* (alcanzando un pH final de 1,3) en comparación con *A. copahuensis* (pH final de 1,45). Dado que el azufre fue adicionado en exceso en todos los cultivos, este resultado indica una mayor actividad azufre oxidante de la especie *S. metallicus*. El cultivo mixto de *A. copahuensis* y *S. metallicus* mostró una mayor actividad oxidante de azufre que el cultivo puro de *A. copahuensis*; sin embargo, esta actividad fue similar a la del cultivo puro de *S. metallicus*.

La colonización y formación de biofilms en los cupones de azufre fue monitoreada mediante CLSM. Luego de 24 h de incubación se observan células adheridas a la superficie de los cupones (Fig 3.18). La señal

registrada con lectina TRITC-ConA fue muy tenue a las 24 h de incubación, posiblemente debido a la baja producción de EPS o a que la composición de los EPS sea de otra naturaleza no pudiendo ser detectado por esta lectina.

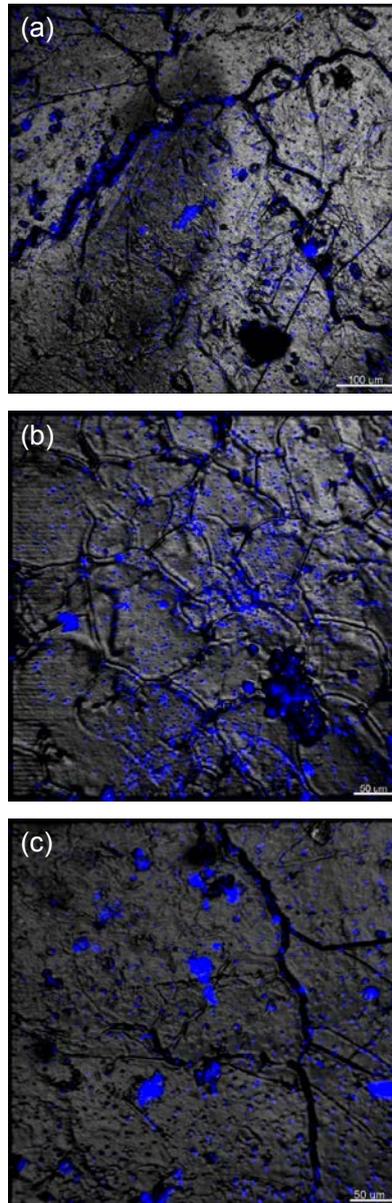


Figura 3.18. Cupones de azufre colonizados por arqueas acidófilas teñidas con DAPI (azul) luego de 24 h de incubación: **(a)** *A. copahuensis* y *S. metallicus*; **(b)** *A. copahuensis*; **(c)** *S. metallicus*. Las muestras fueron visualizadas mediante CLSM.

Los cupones presentaron una colonización similar tanto en presencia de una o de ambas especies de arqueas. Sobre la superficie de los cupones de azufre se distinguieron células adheridas individualmente y la formación de microcolonias. Los biofilms puros de *S. metallicus* exhibieron mayor cantidad de microcolonias durante los primeros días de incubación (Fig. 3.19).

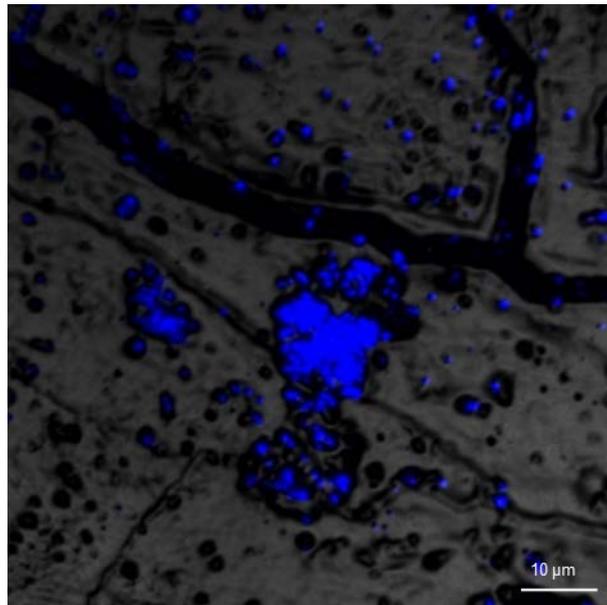


Figura 3.19. Microcolonia de *S. metallicus* formada sobre azufre. Las células fueron teñidas con DAPI (azul) y visualizadas mediante CLSM.

Luego de 144 h de incubación los biofilms desarrollados sobre los cupones de azufre presentaron una estructura más compleja con una mayor cantidad de microorganismos, número y tamaño de colonias y un incremento en la producción de EPS detectados por la lectina TRITC-ConA (Fig. 3.20).

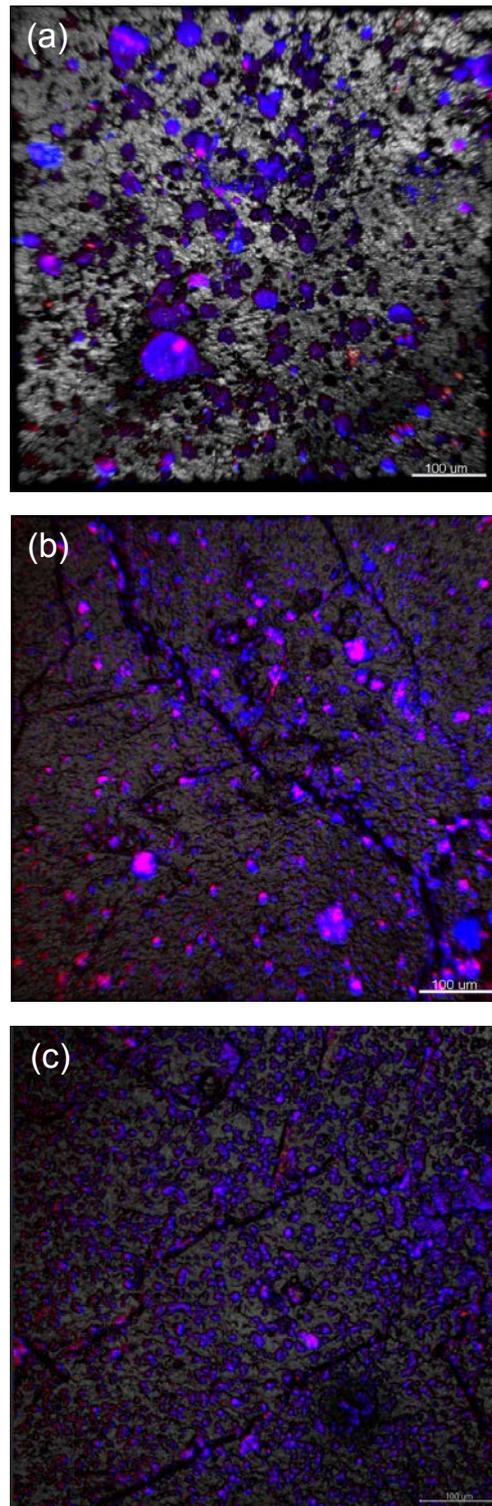


Figura 3.20. Cupones de azufre colonizados por arqueas acidófilas teñidas con DAPI (azul) y ConA-TRITC (rojo), luego de 144 h de incubación: **(a)** *A. copahuensis* y *S. metallicus*; **(b)** *A. copahuensis*; **(c)** *S. metallicus*. Las muestras fueron visualizadas mediante CLSM.

Con el objetivo de estudiar la actividad oxidante de cultivos mixtos de distintas especies de arqueas, se realizaron ensayos de biolixiviación utilizando *A. copahuensis* y *S. metallicus*. Los resultados fueron comparados con cultivos puros de cada arquea.

La Figura 3.21 muestra la disolución de hierro total a partir de pirita por cultivos mixtos y puros de *A. copahuensis* y *S. metallicus*.

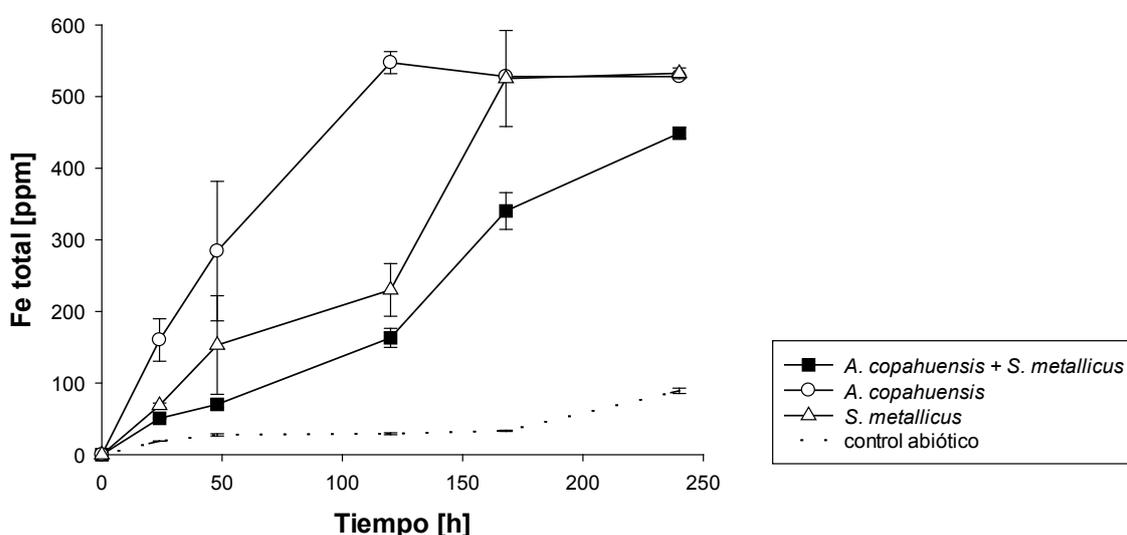


Figura 3.21. Concentración de hierro total soluble durante la biolixiviación de pirita con cultivos puros y mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus*.

La concentración de hierro total soluble aumentó rápidamente desde el comienzo de la experiencia en los cultivos puros de *A. copahuensis*. En estos cultivos, a las 120 h de incubación la concentración de hierro total alcanzó un máximo de aproximadamente 550 ppm, que se mantuvo relativamente constante hasta el final de la experiencia. En los cultivos puros de *S. metallicus*, la máxima concentración de hierro total soluble fue similar a la de los cultivos puros de *A. copahuensis*, aunque alcanzada en

tiempo mayor (168 h). En los cultivos mixtos la concentración de hierro total en solución aumentó más lentamente que en los cultivos puros; la recuperación de hierro fue aproximadamente un 18% menor comparada con la obtenida por los cultivos puros.

En los cultivos puros la concentración de hierro(II) en solución se mantuvo relativamente constante y menor a 100 ppm de hierro durante toda la experiencia. Esto indica que la mayor parte del hierro fue oxidado por los microorganismos, generando hierro(III) (Fig. 3.22). No obstante, en los cultivos mixtos más del 80% del hierro total en solución fue detectado en forma de hierro(II), indicando una inhibición de la actividad hierro oxidante cuando ambas arqueas se emplean simultáneamente en la biolixiviación de pirita.

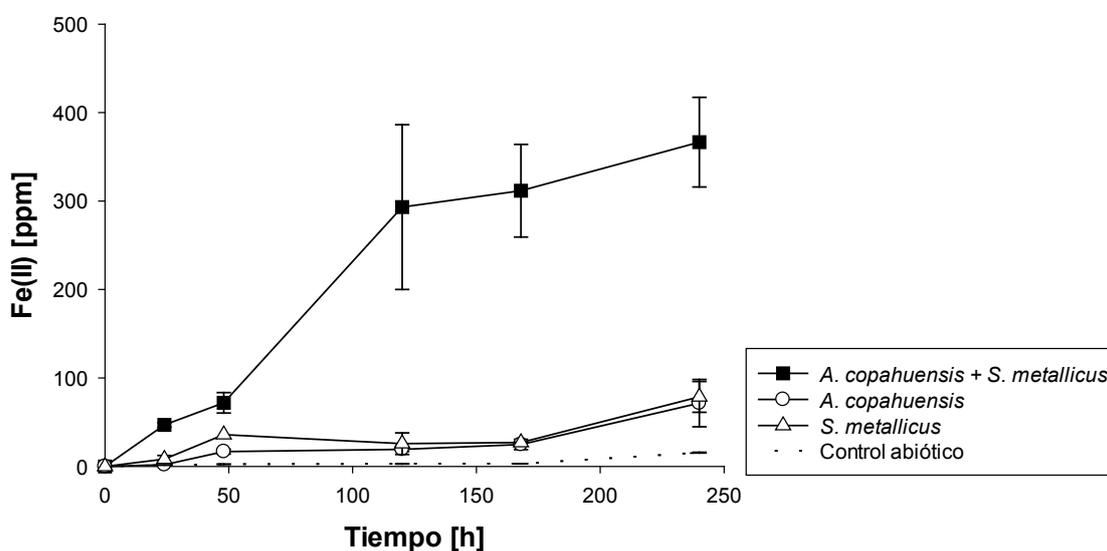


Figura 3.22. Concentración de hierro(II) en solución durante la biolixiviación de pirita con cultivos puros y mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus*.

Tanto en los cultivos puros como mixtos, el pH disminuyó desde el comienzo de la experiencia (Fig. 3.23) hasta valores similares al final del ensayo. En los cultivos puros de *A. copahuensis* el pH disminuyó a una mayor velocidad comparado con los otros cultivos, alcanzando un valor final de 1,5. En los cultivos puros de *S. metallicus* el pH final fue 1,65 mientras que en los cultivos mixtos el pH disminuyó hasta 1,8. La actividad azufre oxidante fue similar en todos los cultivos.

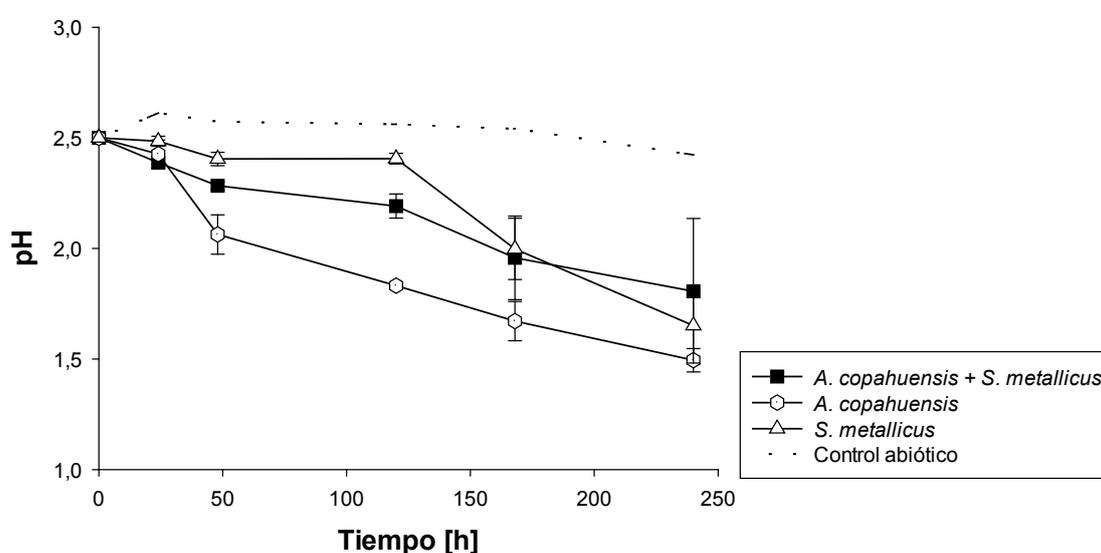


Figura 3.23. Evolución del pH durante la biolixiviación de pirita con cultivos puros y mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus*.

Las células adheridas a la superficie de la pirita fueron visibles luego de 24 h de incubación (Fig. 3.24). Ambas especies se encontraron principalmente adheridas en zonas con poros, grietas e imperfecciones del mineral; y en general como células individuales.

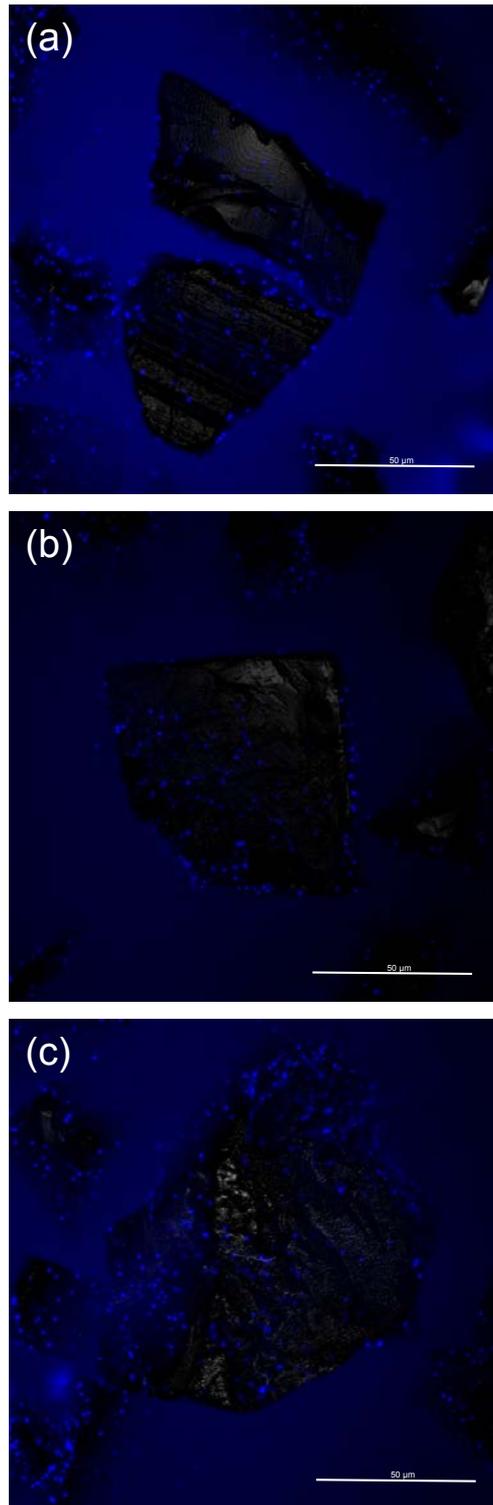


Figura 3.24. Granos de piritita colonizados por arqueas acidófilas teñidas con DAPI (azul) luego de 24 h de incubación: **(a)** *A. copahuensis* y *S. metallicus*; **(b)** *A. copahuensis*; **(c)** *S. metallicus*. Las muestras fueron visualizadas mediante CLSM.

En la Figura 3.25 se muestra un biofilm mixto de *A. copahuensis* y *S. metallicus* con mayor aumento, donde se observa claramente la localización de células en las grietas del mineral. La cobertura del mineral por microorganismos fue similar tanto en los ensayos con las cepas puras como en los cultivos mixtos. Una gran parte de la superficie mineral permanece sin colonizar a las 24 h de incubación.

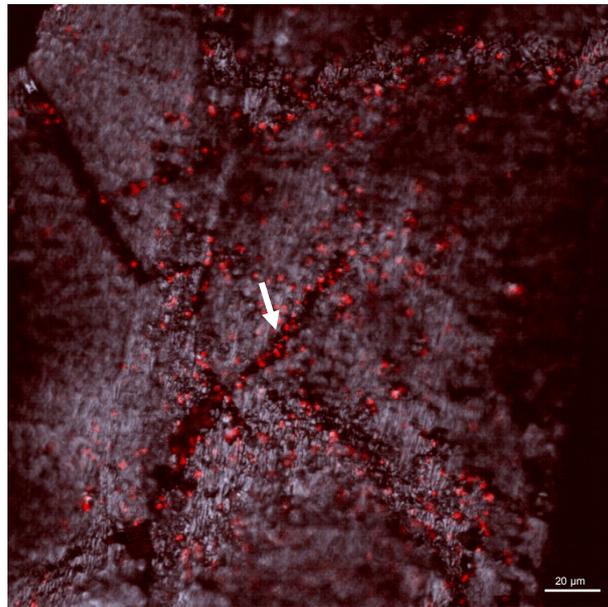


Figura 3.25. Biofilm mixto de *A. copahuensis* y *S. metallicus* sobre pirita teñido con ConA-TRITC (rojo). La flecha indica la localización de células en imperfecciones del mineral.

Luego de 240 h de incubación, los granos de pirita presentaron un mayor grado de corrosión (Fig. 3.26). Los biofilms desarrollaron una apariencia más densa, con una mayor producción de EPS visualizados mediante la unión de la lectina ConA.

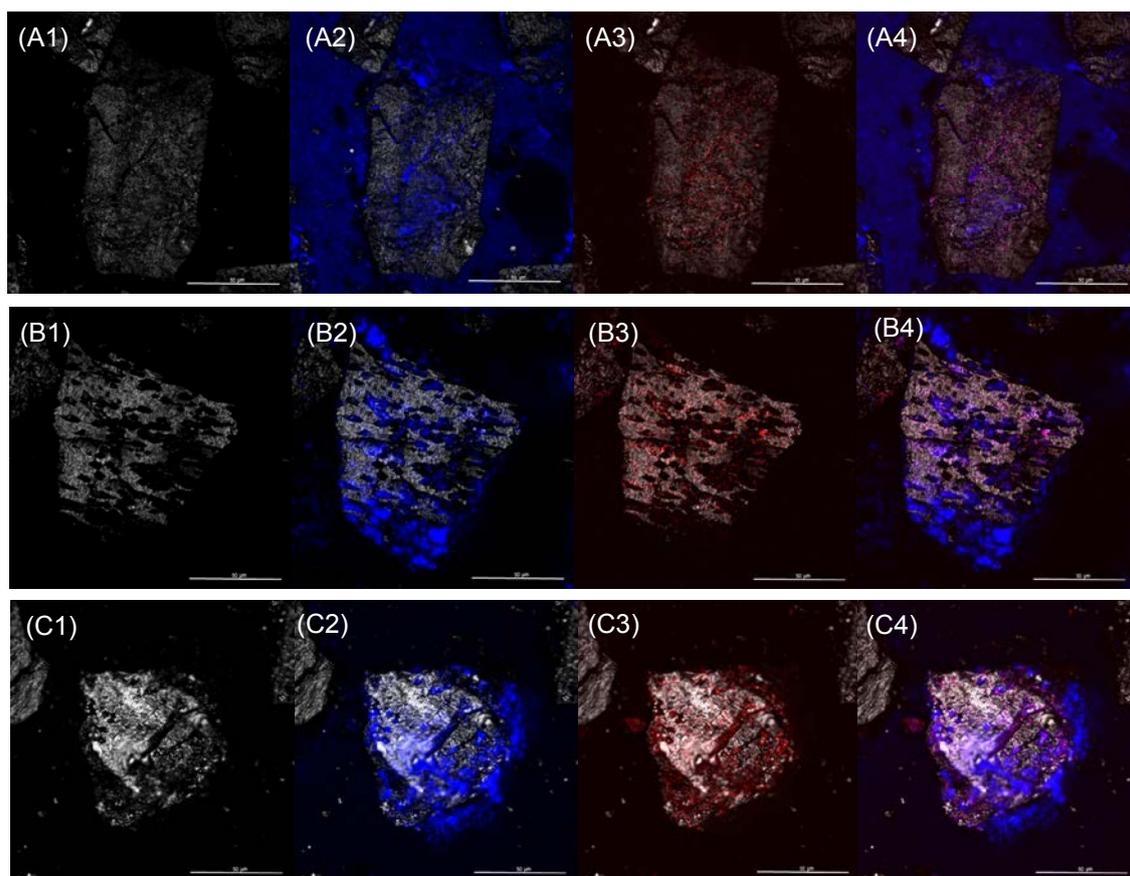


Figura 3.26. Biofilms de arqueas acidófilas sobre pirita, teñidos con DAPI (azul) y la lectina TRITC-ConA (rojo): **(A)** *A. copahuensis* y *S. metallicus*; **(B)** *A. copahuensis*; **(C)** *S. metallicus*. Las muestras fueron visualizadas mediante CLSM.

Previos estudios han demostrado el potencial uso de diversas lectinas para estudiar biofilms mixtos de microorganismos acidófilos (Zhang y col, 2015). Diversas lectinas disponibles comercialmente fueron testeadas con los biofilms de las cepas puras de *A. copahuensis* y *S. metallicus* desarrollados sobre la superficie de la pirita, con el objetivo de encontrar aquellas que puedan ser utilizadas para teñir específicamente una de las dos especies y de este modo poder distinguir las células de cada especie en un biofilm mixto. En la Tabla 3.1 se resumen las lectinas ensayadas y los resultados obtenidos.

Tabla 3.1. Resultados de unión de lectinas a biofilms de *A. copahuensis* y *S. metallicus* en pirita.

Lectinas	Especificidad	<i>Acidianus copahuensis</i>	<i>Sulfolobus metallicus</i>
AAL	Fuc	-	-
ConA	Man; Glc	+	+
DBA	GalNAc	-	-
ECA	GalNAc; Gal	-	-
GNA	Man	+	+
GS-I	Mel; Gal	-	-
HHL	Man	+	-
IRA	GalNAc	-	-
LBA	GalNAc; Gal	-	-
LcH	Man	+	-
LEA	GlcNAc	-	-
MPA	GalNAc	-	-
PHA-E	Man	+	-
PHA-L	GalNAc	-	-
PNA	Gal	+	-
PSA	Man	-	+
PWM	GlcNAc	+	-
SBA	GalNAc; Gal	+	-
UEA-I	Fuc; Ara	+	-
VVL	GalNAc	-	+
WFL	GalNAc	-	+

+, unión positiva; -, unión negativa

A pesar de que los resultados indican que varias de las lectinas estudiadas podrían ser utilizadas para distinguir una de las especies en particular en un biofilm mixto; muchas de ellas mostraron señales muy tenues. Entre las lectinas testeadas se encontró que la lectina HHL (lectina de *Amaryllis*) se unió específicamente al biofilm producido por *A. copahuensis* sobre pirita (Fig. 3.27a), pero no al generado por *S. metallicus*. De modo contrario, la lectina PSA (aglutinina de *Pisum sativum*) se unió

exitosamente a las células del biofilm de *S. metallicus* en pirita (Fig. 3.27b), pero no al de *A. copahuensis*. Estas dos lectinas, en combinación con la lectina ConA (que tiñe los glicoconjugados producidos por ambas especies) fueron seleccionadas para estudiar los biofilms mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus* en pirita.

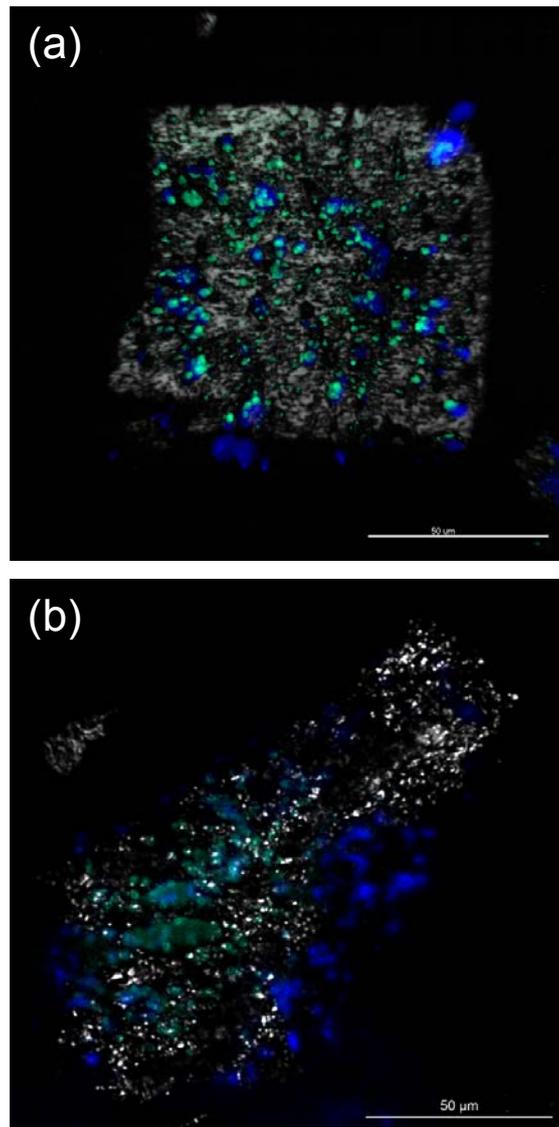


Figura 3.27. (a) Biofilm de *A. copahuensis* sobre pirita teñido con HHL-FITC (verde) y DAPI (azul); **(b)** biofilm de *S. metallicus* sobre pirita teñido con PSA-FITC (verde) y DAPI (azul).

En la Figura 3.28, la señal de DAPI (azul) reveló la distribución de ambas especies en un biofilm mixto de ambas especies sobre pirita. La señal de la lectina HHL-FITC (verde) tiñó la parte del biofilm conteniendo células *A. copahuensis* (Fig. 3.28.A4); mientras que las células de *S. metallicus* en un biofilm mixto fueron teñidas con la lectina PSA-FITC (verde) (Fig. 3.28.B4).

En el mineral, se pudieron evidenciar algunas zonas sin señal de DAPI, pero claramente conteniendo “huellas” microbianas debido a la señal de las lectinas PSA, HHL o ConA. Este mismo fenómeno ha sido encontrado en otras especies de arqueas acidófilas (Zhang y col., 2015). Esto indica que el proceso de dispersión cumple un rol activo durante el desarrollo de biofilms de microorganismos termoacidófilos.

Sobre la superficie mineral se visualizaron células individuales de *A. copahuensis* y *S. metallicus*. También se observó la formación de microcolonias o grupos celulares integrados mayormente por una sola especie. En las proximidades y alrededor de estos grupos se encontraron células de ambas especies, cercanas y, aparentemente, en contacto físico. Estos resultados sugieren la existencia de interacciones interespecies entre *A. copahuensis* y *S. metallicus*, mediada probablemente por los EPS.

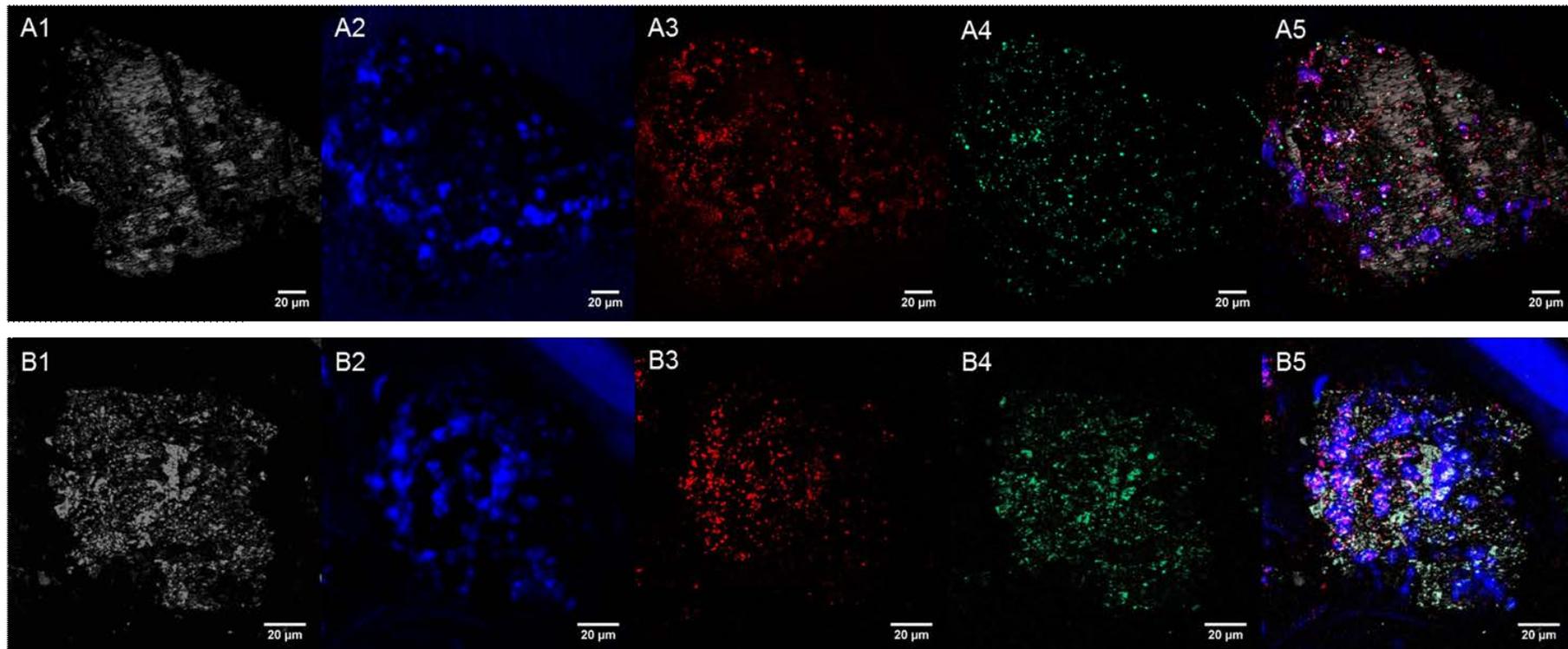


Figura 3.28. Biofilms mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus* visualizados con lectinas fluorescentes mediante CLSM. **(A)** las señales de DAPI (A2) y ConA (A3) revelan la distribución de ambas especies sobre la superficie mineral, mientras que la señal HHL (A4) se une específicamente a las células *A. copahuensis*. **(B)** muestra un biofilm mixto teñido con DAPI (B2); ConA (B3) y PSA (B4) que tiñe selectivamente las células *S. metallicus*. La superficie de la pirita se muestra en modo de reflexión (A1 y B1). A5 y B5 muestran la superposición de imágenes.

En general, la estructura de biofilms producidos por comunidades o consorcios de arqueas han sido escasamente estudiados. Aún no existe información al respecto en arqueas acidófilas que intervienen procesos de biolixiviación. Schopf y col (2008) estudiaron la formación de biofilms entre dos especies de arqueas hipertermófilas, *Pyrococcus furiosus* y *Methanopyrus kandleri*. Cuando estas especies de arqueas son cultivadas conjuntamente, *P. furiosus* se adhiere a las células de *M. kandleri* formando colonias inusuales con forma de huevo. El contacto celular entre las dos especies de arqueas esta mediado por flagelos y posiblemente mediante EPS. Otro ejemplo de interacción entre especies de arqueas es el contacto de células del sistema ARMAN (archaeal Richmond Mine acidophilic nanoorganisms) con arqueas del orden *Thermoplasmatales* (Baker y col., 2010). Al estudiar la estructura del biofilm se encontró que la mayoría de las células ARMAN no interactúan directamente con otros tipos de microorganismos. Sin embargo, algunas células ARMAN presentaron una conexión citoplasmática con células *Thermoplasmatales* a través de una protuberancia de estas últimas células. Esta interacción podría involucrar la inyección de nutriente desde las células *Thermoplasmatales* hacia las ARMAN, parasitismo o intercambio de moléculas entre ellas. Otra íntima asociación ha sido reportada entre *Ignococcus hospitalis* y *Nanoarchaeum equitans* (Jahn y col., 2008). En esta interacción *N. equitans* se adhiere a la membrana celular externa de *I. hospitalis* obteniendo lípidos, aminoácidos y posiblemente ATP (Huber y col., 2012).

Efecto de la pre-colonización

Para elucidar si la presencia de un biofilm influencia la subsiguiente colonización y lixiviación de pirita por una segunda especie, muestras de

pirita fueron pre-colonizadas con *S. metallicus* y posteriormente los biofilms fueron inactivados. Luego, los frascos conteniendo la pirita pre-colonizada fueron inoculados con *A. copahuensis*. Este mismo diseño experimental fue aplicado en modo inverso para estudiar la adhesión y actividad biolixivante de *S. metallicus* con pirita pre-colonizada por un biofilm inactivo de *A. copahuensis*.

La Figura 2.29 muestra la adhesión de *S. metallicus* sobre pirita previamente colonizada por *A. copahuensis* y cuyo biofilm se inactivó posteriormente.

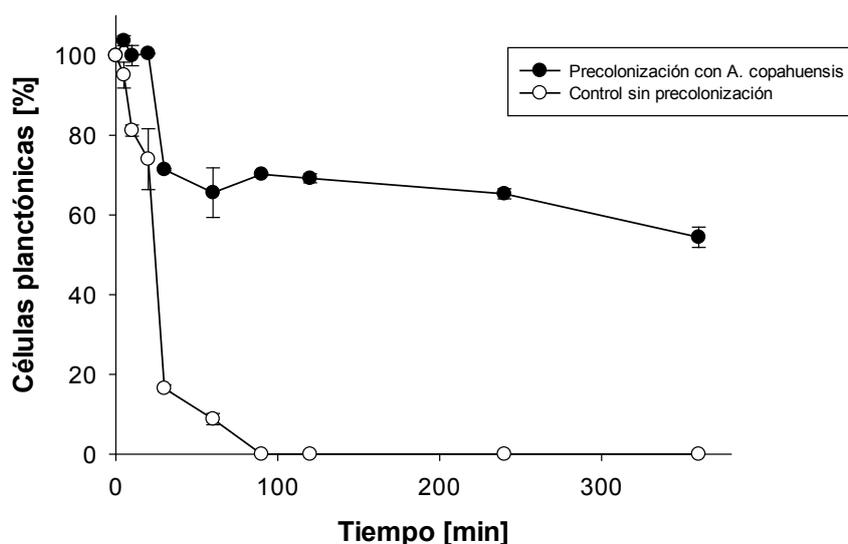


Figura 3.29. Adhesión inicial de *S. metallicus* sobre pirita previamente colonizada por *A. copahuensis* cuyo biofilm se inactivó posteriormente y sobre pirita no colonizada previamente.

La pre-colonización de la pirita con *A. copahuensis* produjo una disminución de la adhesión inicial de *S. metallicus* sobre la superficie mineral. En el control realizado con pirita sin pre-colonizar se observa

prácticamente una adhesión microbiana total luego de 100 min de incubación; en cambio, en los ensayos realizados con pirita pre-colonizada, sólo el 40% de la población celular de *S. metallicus* logra adherirse a la superficie mineral luego de 360 min de incubación.

La evolución de pH en los ensayos realizados con *S. metallicus* y pirita pre-colonizada con *A. copahuensis* se muestra en la Fig. 3.30. Se puede ver que la tendencia de pH prácticamente no varía entre los sistemas con pirita pre-colonizada y sin pre-colonizar, en ambos sistemas el pH alcanzó un valor final cercano a 1,6 al final de la experiencia.

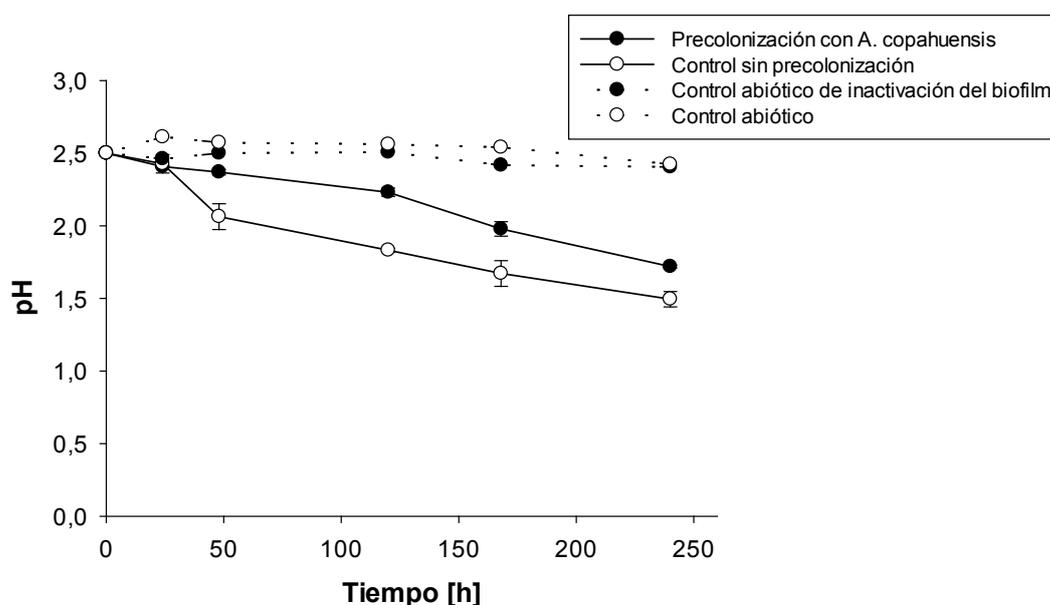


Figura 3.30. Evolución de pH durante el ensayo realizado con *S. metallicus* y pirita pre-colonizada por *A. copahuensis*.

Al analizar la concentración de hierro(II) (Fig. 3.31) y de hierro total en solución (Fig. 3.32), se puede observar que la concentración de hierro(II) se mantuvo baja en todos los sistemas durante el transcurso de la experiencia. *S. metallicus* solubilizó aproximadamente 300 ppm de hierro luego de 240 h

de incubación en presencia del biofilm inactivo de *A. copahuensis* sobre la superficie de la pirita, mientras que logró la solubilización de 500 ppm de hierro en solución en el control realizado con pirita sin pre-colonizar. En este último, la concentración de hierro en solución aumenta rápidamente desde el inicio de la experiencia; en cambio, en el control, la concentración de hierro sólo se incrementa significativamente a partir de las 160 h de incubación. Estos resultados indican que la adhesión y la actividad biolixivante de *S. metallicus* se reduce en presencia del biofilm inactivo de *A. copahuensis*.

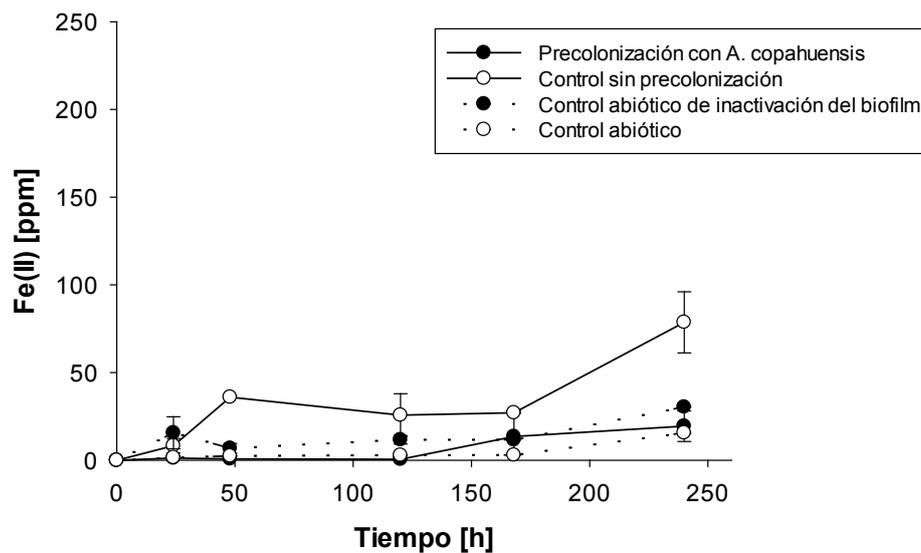


Figura 3.31. Concentración de hierro(II) durante los ensayos realizados con *S. metallicus* y pirita pre-colonizada con un biofilm inactivo de *A. copahuensis*.

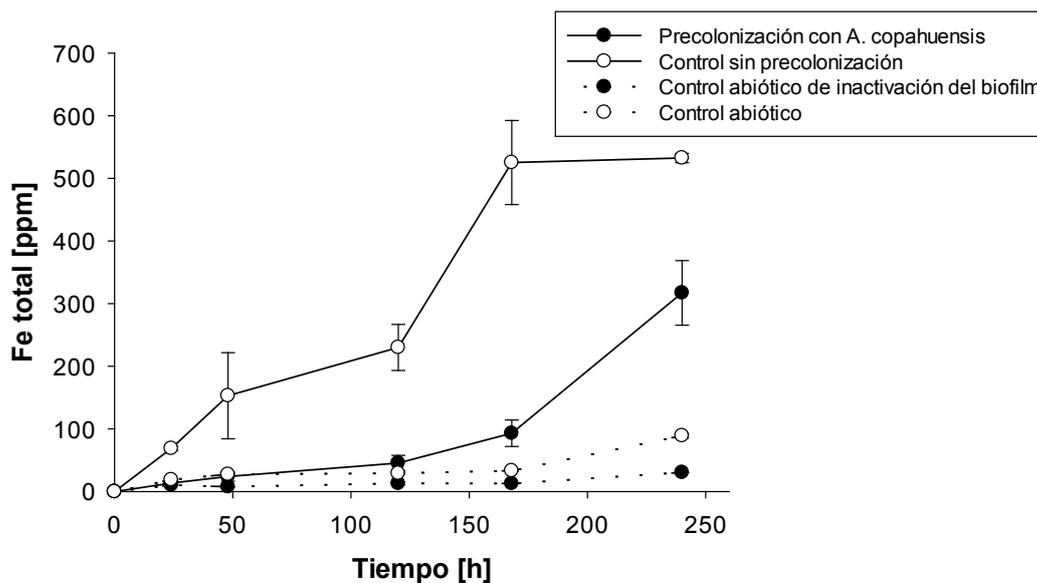


Figura 3.32. Concentración de hierro total durante los ensayos realizados con *S. metallicus* y piritita pre-colonizada con un biofilm inactivo de *A. copahuensis*.

En la Figura 3.33 se observa la adhesión inicial de *A. copahuensis* sobre piritita colonizada previamente por *S. metallicus* cuyo biofilm fue posteriormente inactivado. La presencia del biofilm inactivo de *S. metallicus* sobre la piritita redujo la adhesión inicial de *A. copahuensis* sobre la superficie mineral en aproximadamente 60%. Luego de 360 min de incubación, sólo 20% de las células inoculadas inicialmente permanecen en estado planctónico en el control realizado con piritita sin pre-colonizar, mientras que cuando los ensayos fueron realizados con piritita pre-colonizada con *S. metallicus*, aproximadamente 80% de la población permanece en estado planctónico en el mismo tiempo de incubación.

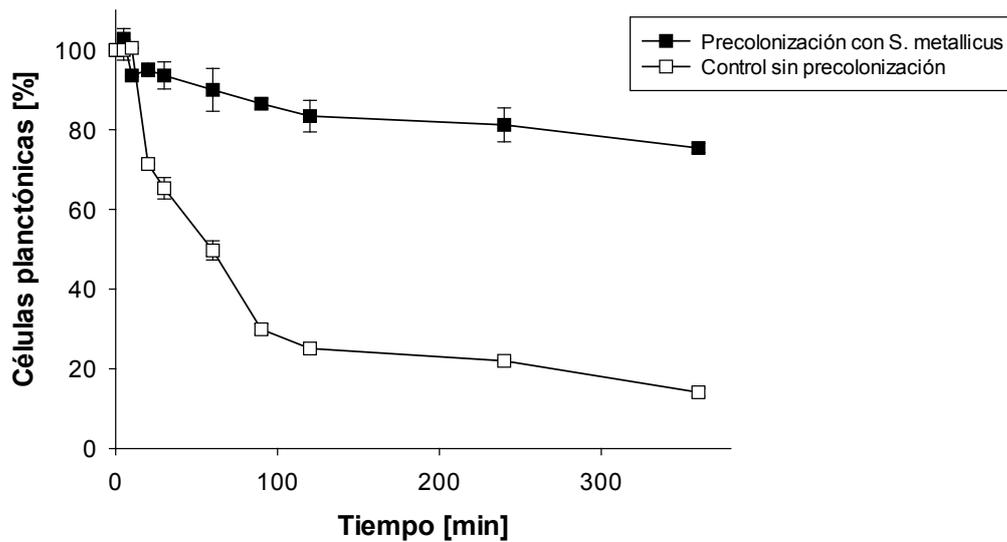


Figura 3.33. Adhesión inicial de *A. copahuensis* sobre pirita previamente colonizada por *S. metallicus* cuyo biofilm fue posteriormente inactivado.

En la Figura 3.34 puede observarse que en el control con pirita sin pre-colonizar, el pH desciende desde 2,5 hasta 1,5; en los ensayos realizados con pirita con un biofilm inactivo de *S. metallicus*, el pH desciende más lentamente hasta alcanzar un valor final de 1,7.

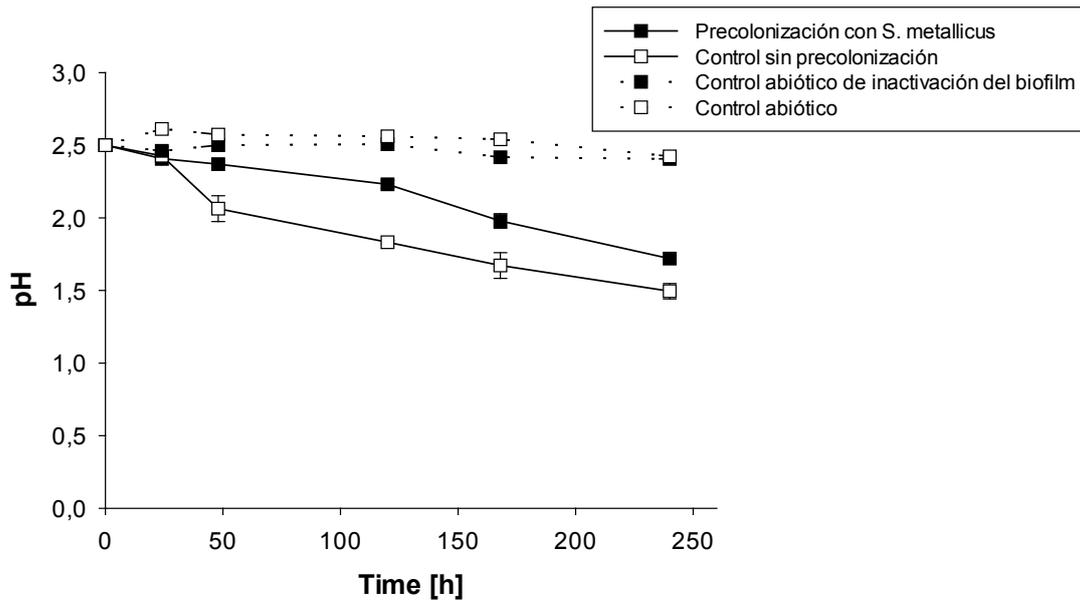


Figura 3.34. Evolución de pH durante el ensayo realizado con *A. copahuensis* y pirita pre-colonizada con un biofilm inactivo de *S. metallicus*.

Las concentraciones de hierro(II) fueron menores a 200 ppm durante el transcurso de la experiencia (Fig. 3.35) y resultaron bajas en comparación con el hierro total presente (Fig. 3.36); esto indica que la mayor parte del hierro en solución se encuentra como hierro(III).

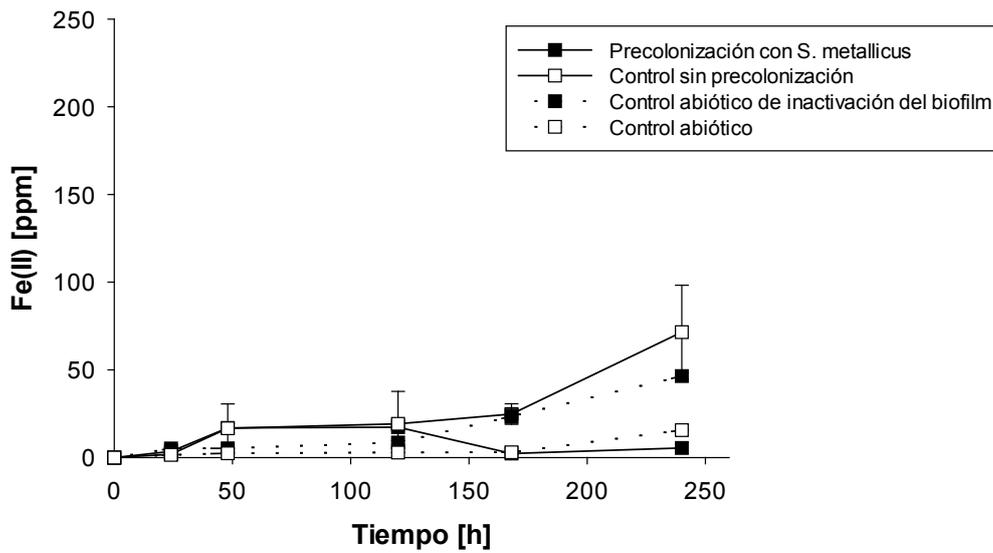


Figura 3.35. Concentración de hierro(II) durante los ensayos realizados con *A. copahuensis* y pirita pre-colonizada con un biofilm inactivo de *S. metallicus*.

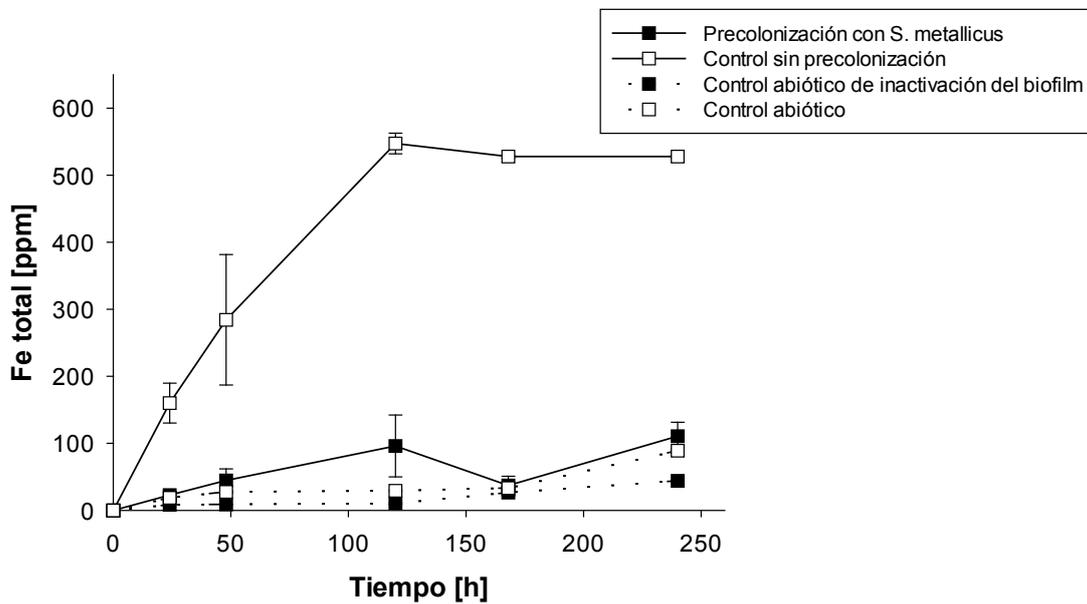


Figura 3.36. Concentración de hierro total durante los ensayos realizados con *A. copahuensis* y pirita pre-colonizada con un biofilm inactivo de *S. metallicus*.

La disolución de pirita por *A. copahuensis* se ve reducida en presencia de un biofilm inactivo de *S. metallicus*. En el control realizado con *A. copahuensis* y pirita sin pre-colonizar, la concentración de hierro total en solución aumenta rápidamente desde el inicio del ensayo hasta alcanzar 550 ppm luego de 120 h de incubación. A partir de ese momento la concentración de hierro en el control se mantiene relativamente constante. Cuando se utiliza pirita con un biofilm inactivo de *S. metallicus*, la disolución de hierro aumenta muy lentamente hasta alcanzar aproximadamente 100 ppm de hierro total en solución al final de la experiencia. Estos resultados sugieren una inhibición tanto de la adhesión, como la actividad lixivante de *A. copahuensis* en presencia de un biofilm inactivo de *S. metallicus*.

Ensayos similares fueron realizados previamente para estudiar el efecto de la pre-colonización con bacterias hierro oxidantes en la adhesión de bacterias azufre oxidantes (Bellenberg y col., 2012; Noël 2013). Se demostró que *At. thiooxidans* y células *At. ferrooxidans* precultivadas en tiosulfato se adhieren más rápidamente a la pirita pre-colonizada por biofilms vivos de *L. ferrooxidans*, comparado con la adhesión sobre pirita pre-colonizada con biofilms inactivos o pirita libre de biofilms (Bellenberg y col., 2012). También, *At. caldus* mostró una adhesión preferencial sobre pirita pre-colonizada por biofilms activos de *L. ferriphilum*, en comparación con pirita colonizada por biofilms inactivos o no colonizada (Noël 2013). Dado que la disolución de pirita esta mediada por el ataque químico de iones hierro(III), cuya concentración esta modulada por la presencia de biofilms activos de especies hierro oxidantes, hay un claro beneficio para los microorganismos azufre oxidantes al adherirse a ciertos sitios donde se encuentra incrementada la concentración de compuestos reducidos de azufre provenientes de la disolución de la pirita. Llamativamente, la presencia de biofilms activos o inactivos de *L. ferrooxidans* no

incrementaron la adhesión sobre pirita de células *At. ferrooxidans* precultivadas en hierro(II) (Bellenberg y col., 2012). Estos resultados sugieren que esta última especie podría reconocer diferentes sitios de adhesión sobre la superficie mineral que *L. ferrooxidans*. Pero esto no parece ocurrir entre arqueas termoacidófilas con características metabólicas similares, que teniendo en cuenta la inhibición de la adhesión y actividad lixivante producidos luego de la pre-colonización, parecen competir por los mismos sitios de adhesión sobre la superficie de la pirita.

Las interacciones entre arqueas acidófilas durante procesos de biolixiviación han sido escasamente estudiadas. Pero en otros tipos de arqueas, como las halófilas *Halobacterium* sp. y *Haloborun* sp., se comprobó la existencia de interacciones antagonistas (Di Meglio y col., 2014). Las razones de estos fenómenos son aún desconocidas en arqueas, pero en bacterias podrían estar relacionadas a respuestas generadas por QS o quimiotaxis. En el dominio *Archaea*, el fenómeno de QS ha recibido muy poca atención. Algunos indicios de la presencia de QS se evidenciaron en la arquea halófila *Natrococcus occultus* y las arqueas metanógenas *Methanosaeta harundinaces*, *Methanosarcina mazei* y *Methanobrevibacter smithii* (Paggi y col., 2003; Zhang y col., 2012). Estas especies parecen producir AHL como señales de QS. Sin embargo, no es esperable la presencia de un sistema de QS basado en AHLs en microorganismos termoacidófilos, principalmente debido a la labilidad de estas moléculas a elevadas temperaturas. Además, se supone que *Sulfolobus* spp. poseen sistemas de QS, sin embargo no se ha reportado la presencia de moléculas del tipo AHL o furanonas en los cultivos de estos termófilos (Orell y col., 2013).

Por otro lado, varias especies pertenecientes al género *Sulfolobus* producen toxinas proteicas, denominadas "sulfolobocinas", que matan las

células de otras especies (Prangishvili y col., 2000). No sólo se ha detectado este tipo de toxinas en el género *Sulfolobus*; algunas especies de haloarqueas también producen compuestos similares denominados halocinas (Shand y Leyva 2007). La actividad de estas moléculas está relacionada a las células y no con los sobrenadantes de los cultivos; aparentemente se encuentran asociadas a pequeñas partículas de la cápsula S (O'Connor y Shand 2002). El espectro de actividad de las sulfolobocinas parece estar restringido a otros miembros del orden *Sulfolobales* (O'Connor y Shand 2002; Prangishvili y col., 2000; Shand y Leyva 2007). La producción de antibióticos peptídicos y/o proteicos no han sido buscados en otros sulfolobales, pero podrían estar presentes en otras especies como *S. metallicus* y *A. copahuensis*. Su potencial presencia podría ayudar a explicar las interacciones antagónicas entre *A. copahuensis* y *S. metallicus* observadas en este trabajo.

Ambas hipótesis podrían explicar las interacciones observadas entre *A. copahuensis* y *S. metallicus*. El estudio de las interacciones entre distintas especies de arqueas se encuentra en estado prematuro y para comprender con mayor detalle la formación de biofilms y las moléculas que intervienen son necesarias más investigaciones.

3.4. Conclusiones generales del capítulo

En este capítulo se pudo relacionar que la mayor adhesión de las células sobre la superficie estuvo acoplada a una mayor eficiencia de biolixiviación de pirita. Se pudo comprobar que la población sésil es la principal responsable de la oxidación de hierro(II).

Los ensayos realizados en condiciones de limitación de fosfato, permitieron comprobar la capacidad de *A. copahuensis* de sobrevivir en estas condiciones; sugiriendo la presencia de reservas de fosfatos en estas células. Además, la limitación de fosfato incremento la adhesión y biolixiviación de pirita por *A. copahuensis*, posiblemente debido a las condiciones de estrés, o que la disponibilidad de fosfatos intervenga en la regulación de ciertos genes.

La presencia de L-cisteína en las concentraciones evaluadas, no incrementó las eficiencias de biolixiviación de pirita. Probablemente las concentraciones utilizadas resultaron tóxicas para *A. copahuensis*.

Los cultivos mixtos de *A. copahuensis* y *S. metallicus* tanto en azufre como en pirita, mostraron que la actividad oxidante de estas especies no se complementa. La mezcla de ambas especies no generó un incremento en la adhesión de los microorganismos; sin embargo provocó una ligera disminución de la actividad azufre y hierro oxidante. Los cultivos puros mostraron una mayor eficiencia en la biolixiviación de pirita que los cultivos mixtos. Estos resultados junto con los obtenidos en los ensayos de pre-colonización, en los cuales se pudo comprobar que la pre-colonización de pirita con biofilms inactivos afecta la posterior adhesión de otra especie de arquea, sugieren la existencia de interacciones antagónicas entre especies de arqueas acidófilas.

Cuarto capítulo

Recuperación de metales por biolixiviación

En este capítulo se describen las experiencias de biolixiviación realizadas con muestras de minerales regionales. El principal objetivo en esta etapa fue probar la capacidad de *A. copahuensis* para la disolución de sulfuros metálicos, e incrementar el conocimiento sobre técnicas mineras alternativas aplicables a estos minerales que podrían incrementar las eficiencias de recuperación de metales, disminuir el impacto ambiental y contribuir al desarrollo económico regional.

En la primera parte se describen los ensayos de biolixiviación realizados con una muestra mineral proveniente del yacimiento Hualilán. Este mineral, con alto contenido de esfalerita, fue seleccionado para evaluar la recuperación de cinc con el objetivo de aportar más información sobre procesos de biolixiviación de este metal, para el cual la aplicación de esta técnica se encuentra aún en incipiente desarrollo. En la segunda parte de este capítulo se describen los experimentos de biolixiviación realizados con un concentrado de mineral de Bajo La Alumbraera. Este concentrado de cobre, compuesto principalmente por calcopirita, es de gran interés para evaluar la capacidad de biolixiviación de *A. copahuensis* ya que dicho mineral de cobre, el más abundante en la naturaleza, es muy refractario y difícil de disolver en condiciones ambientales, aún por acción microbiana.

4.1. Biolixiviación de un mineral de cinc

4.1.1. Introducción

El cinc se encuentra presente de forma natural en las rocas, el suelo, el agua y el aire, y es esencial para la salud y el bienestar tanto del ser humano como de animales y cultivos. Este metal también desempeña un papel fundamental en determinadas aplicaciones industriales y productos. Gracias a sus características intrínsecas, el cinc constituye un material atractivo para todo un abanico de aplicaciones en el sector de transportes, infraestructuras, bienes de consumo y producción alimentaria. Además, debido a su durabilidad y reciclabilidad, el uso del cinc contribuye a ahorrar recursos naturales y a potenciar la sostenibilidad (International Zinc Association, 2016).

Aproximadamente el 50% del cinc producido se utiliza para el galvanizado de acero, es decir, para proteger a este último frente a la corrosión. En torno al 17% se utiliza para producir latón y otro 17% para la producción de aleaciones de base cinc, principalmente en el sector de moldeado por presión. Es común el uso de planchas de cinc en techos, canaletas y bajantes. También se utilizan cantidades significativas de compuestos de cinc tales como óxido de cinc y sulfato de cinc (International Zinc Association, 2016).

En el año 2014, la producción mundial de cinc superó los 13 millones de toneladas anuales (International Lead and Zinc Study Group, 2016). En la Figura 4.1 se presenta la producción mundial de este metal desde el año 1900 hasta la actualidad (United States Geological Survey, 2016). El gráfico sigue una representación bastante típica con importantes incrementos en la producción de cinc a partir de la década del 90. De acuerdo a la información entregada en el informe anual del United States Geological

Survey (USGS), en el año 2014 la producción de cinc se incrementó un 3% con respecto al año anterior, mientras que su demanda mundial aumentó aproximadamente un 5%, resultando en un déficit en la relación producción/consumo cercano a 400.000 toneladas de cinc.

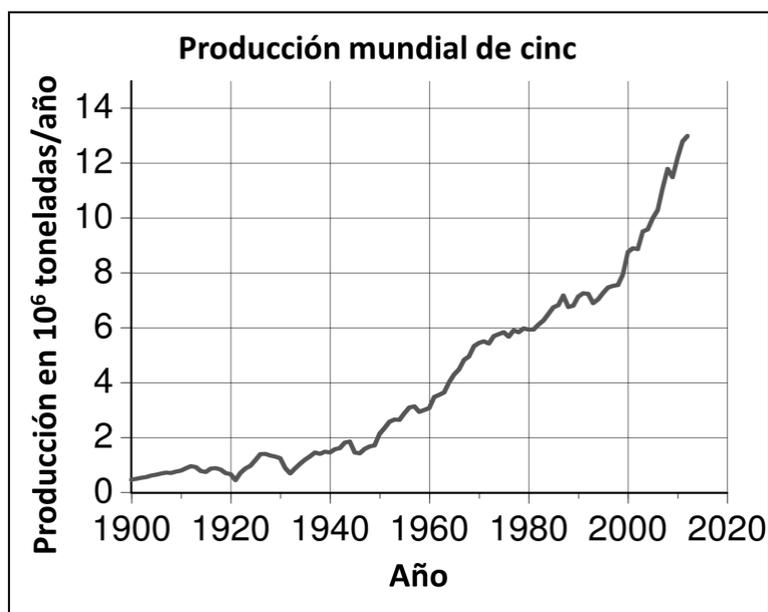


Figura 4.1. Producción mundial de cinc desde el año 1900. Fuente: USGS

El cinc es extraído en aproximadamente 40 países. China, Perú, Australia, Canadá, Estados Unidos e India son los principales países productores de cinc, contribuyendo con más del 65% de la producción mundial total de este metal (International Lead and Zinc Study Group, 2016). Argentina cuenta con producción nacional de cinc; la colocación de cinc en los mercados internacionales se incrementó en los últimos años y las exportaciones de cinc refinado tuvieron como destino final a Japón, China, Países Bajos, Singapur, Pakistán, etc.

La producción nacional de cinc se realiza principalmente en yacimientos jujeños, el Grupo Minero Aguilar, considerado probablemente

como el yacimiento con mayor concentración de minerales de plomo y cinc de Sudamérica. Sin embargo, Argentina cuenta con otros yacimientos de cinc sin emprendimientos mineros activos dedicados a la explotación y producción de este metal. Si bien la Argentina es un país rico en recursos mineros, la minería local se encuentra aún en etapa de desarrollo incipiente: algunos depósitos minerales han sido caracterizados mientras que otros se encuentran en etapa de exploración y cuantificación de reservas. El aporte de la minería al desarrollo económico general de un país puede ser significativo y de alto impacto en las regiones donde están ubicados los yacimientos, contribuyendo fuertemente en la generación de oportunidades laborales, educación, capacitación, salud, infraestructura y desarrollo de lugares postergados, que en general no tienen alternativas económicas diferentes. En este contexto, la Argentina tiene una gran oportunidad, dada su posición alentadora en los rankings de reservas a nivel mundial. Esto alienta la realización de estudios que evalúen distintas alternativas para la explotación de cinc.

En la actualidad, más del 90% del cinc mundialmente producido es obtenido mediante métodos hidrometalúrgicos (International Zinc Association, 2016). No obstante, el sector minero invierte continuamente en el desarrollo de nuevas técnicas y tecnologías para incrementar la eficiencia de la extracción y el procesamiento de cinc. Con este fin, se ha comenzado a estudiar el potencial uso de técnicas biohidrometalúrgicas en la recuperación de cinc a partir de concentrados y minerales de baja ley. Algunas investigaciones indican que el cinc (al igual que otros metales como Cu, Ni, Co, Mo y Mn) es potencialmente recuperable mediante lixiviación microbiana (Ahmadi y Mousavi, 2015; Giaveno y col., 2007; Haghshenas y col., 2009; Marchevsky y col., 2015; Petersen y Dixon, 2007). Existen algunas aplicaciones comerciales donde se biolixivian minerales polimetálicos y se

recupera cinc como subproducto; ejemplos de ello son la planta de Talvivaara, localizada en Finlandia, que produce 50000 toneladas de níquel anuales, obteniendo como co-productos cobre y cobalto además de cinc; y la planta que la compañía Kasese Cobalt Company Limited tiene en Uganda, que oxida 240 toneladas diarias de un concentrado de pirita para producir cobalto, cobre, níquel y cinc en una planta de biolixiviación en tanques agitados (Schippers y col., 2014). De todos modos, aún no existen plantas comerciales de biolixiviación para obtener exclusivamente cinc.

Los microorganismos mesófilos como *At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *At. thiooxidans* han sido extensamente estudiados en procesos de biolixiviación de esfalerita (Ahmadi y Mousavi, 2015; Giaveno y col. 2007; Haghshenas y col., 2009; Marchevsky y col., 2015). Con el objetivo de aumentar la factibilidad económica en la producción primaria de cinc, se comenzaron a aplicar nuevas especies microbianas capaces de biolixiviar con alta eficiencia y rapidez. Los microorganismos termófilos (moderados y extremos) han sido foco de atención, dado que logran altas velocidades de lixiviación de cinc debido a las altas temperaturas y también a las características metabólicas de los mismos (Ahmadi y Mousavi, 2015; Deveci y col., 2004; Rodríguez y col., 2003b; Watling, 2006; Wheaton y col., 2015; Xia y col., 2012).

En esta sección se describen los estudios de recuperación de cinc mediante procesos de biolixiviación a partir de un mineral regional (proveniente de la mina Hualilán) utilizando la arquea termófila *A. copahuensis*. La zona de Hualilán, localizada en la provincia de San Juan (Argentina), es considerada una de las mayores reservas de oro del sur de Los Andes. Para liberar el oro de este mineral refractario se requiere de un tratamiento previo del mineral como la biooxidación. Además, este mineral tiene un importante contenido de cinc (aproximadamente 8%)

principalmente en forma de esfalerita, la principal fuente de cinc a nivel mundial. Se ha demostrado que es posible recuperar cinc como subproducto durante el pretratamiento biooxidativo del mineral de Hualilán (Marchevsky y col., 2015). Los principales objetivos de este ensayo fueron probar la capacidad de *A. copahuensis* para la disolución de cinc y evaluar el efecto de diferentes fuentes de energía con el fin de mejorar la recuperación de cinc.

4.1.2. Materiales y métodos

4.1.2.1. Mineral

Para estos experimentos se utilizó un mineral de cinc proveniente del yacimiento Hualilán. Las características del mineral y el tratamiento previo a los ensayos se describieron en la sección 2.2.1.4.

4.1.2.2. Microorganismos y medios de cultivo

La cepa ALE1 DSM 29038 de *A. copahuensis* (Giaveno y col., 2013) se mantuvo creciendo activamente en condiciones aeróbicas en medio de cultivo DSM 88 (Anexo I) suplementado con 3 g/L de tetrionato de potasio y 1 g/L de extracto de levadura. El pH inicial del medio de cultivo se ajustó en un valor de 2,0 mediante el agregado de solución de H₂SO₄ 10 N. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 65 °C y 150 rpm. Se eligió esta condición para preparar el inóculo, ya que es en la que *A. copahuensis* mostró un mayor grado de adhesión al mineral de Hualilán (sección 2.3.5).

El inóculo para los ensayos se obtuvo mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. de un cultivo de *A. copahuensis* en fase de crecimiento exponencial tardía. La biomasa celular obtenida, se resuspendió en un medio estéril de sales basales sin fuente de energía y se utilizó para inocular cada uno de los sistemas biolixivantes.

4.1.2.3. Ensayos de biolixiviación

Los ensayos de biolixiviación fueron realizados en frascos Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 150 mL de medio de cultivo estéril DSM 88 pH 2. Con el objetivo de evaluar los efectos de las diferentes fuentes de energía sobre la biolixiviación del mineral Hualilán, se diseñaron sistemas de

cultivos en los cuales se varió la fuente de energía adicionada al medio de cultivo. Alternativamente se utilizó como fuente de energía uno o más de los siguientes compuestos: azufre elemental (1 g/L), tetratiónato de potasio (3 g/L), hierro(II) (1 g/L) y extracto de levadura (1 g/L). La Tabla 4.1 resume las condiciones y denominaciones de los sistemas ensayados. En todos los casos, se utilizó mineral Hualilán a una densidad de pulpa del 2% (p/v).

Tabla 4.1. Denominaciones y condiciones experimentales utilizadas en la experiencia de biolixiviación del mineral Hualilán

Sistema	Fuente de energía			
	S° (10 g/L)	K ₂ S ₄ O ₆ (3 g/L)	hierro(II) (1 g/L)	Extracto de levadura (1 g/L)
M88				
S°	X			
Tet		X		
Fe			X	
S°+EL	X			X
Tet+EL		X		X
Fe+EL			X	X
S°+Fe	X		X	
Tet+Fe		X	X	
S°+Fe+EL	X		X	X
Tet+Fe+EL		X	X	X

Los sistemas se realizaron por duplicado y se inocularon al 3,33% (v/v) con *A. copahuensis*. Los cultivos se mantuvieron a 65 °C y 150 rpm durante 45 días. Se realizaron los correspondientes controles estériles en los cuales se reemplazó el volumen del inóculo por el mismo volumen de una solución de timol en metanol al 2% p/v.

La evaporación de agua fue compensada mediante el agregado de agua destilada estéril. Periódicamente se extrajeron muestras que fueron

filtradas a través de papel de filtro banda azul para eliminar sólidos en suspensión. Posteriormente se realizaron las medidas analíticas correspondientes. Se midieron los valores de pH con un electrodo específico. La concentración de hierro(II) fue determinada empleando el método espectrofotométrico de la *o*-fenantrolina (Anexo II). Las concentraciones de hierro total soluble y de cinc, se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica (Anexo II). Antes de estas últimas determinaciones, y para eliminar posibles sólidos en suspensión, las muestras se filtraron utilizando membranas de 0,45 μm de diámetro de poro; luego, una alícuota adecuada de cada filtrado, se diluyó convenientemente en solución de HNO_3 0,14 N.

Al término del ensayo, se recuperó el mineral residual de cada condición experimental mediante filtración con papel de filtro banda azul, para retener el mineral que no reaccionó y los sólidos precipitados. Los sólidos se lavaron con medio fresco, usándolo también para recuperar por arrastre sólidos pegados a la pared del Erlenmeyer. Los filtros con el sólido retenido se incubaron en estufa de secado a 30°C. El análisis de la composición de los minerales residuales se hizo mediante difracción de rayos X (DRX).

4.1.3. Resultados y discusión

Debido a que el mineral de Hualilán presenta una interesante ley en cinc, es la liberación de este metal el principal interés en su procesamiento. En la Figura 4.2 se muestran los perfiles de solubilización de cinc para los sistemas inoculados y para los controles estériles, durante los 42 días de ensayo. El porcentaje de cinc extraído fue calculado en base al contenido de cinc inicialmente presente en la muestra mineral.

Los controles estériles (gráficos internos) solubilizaron menos del 30% del cinc contenido en el mineral original. En cambio, en los cultivos el porcentaje de extracción de cinc al final de la experiencia fue mayor al 45%, independientemente de la fuente de energía suplementada al medio de cultivo. La presencia adicional de una o más fuentes de energía incrementó la eficiencia de solubilización de cinc a partir del mineral Hualilán, logrando recuperaciones de cinc superiores al 52%. Estos resultados indican que *A. copahuensis*, al igual que otros microorganismos acidófilos, incrementa la eficiencia de disolución de cinc (Daveci y col., 2004; Marchevsky y col., 2015; Rodríguez y col., 2003b).

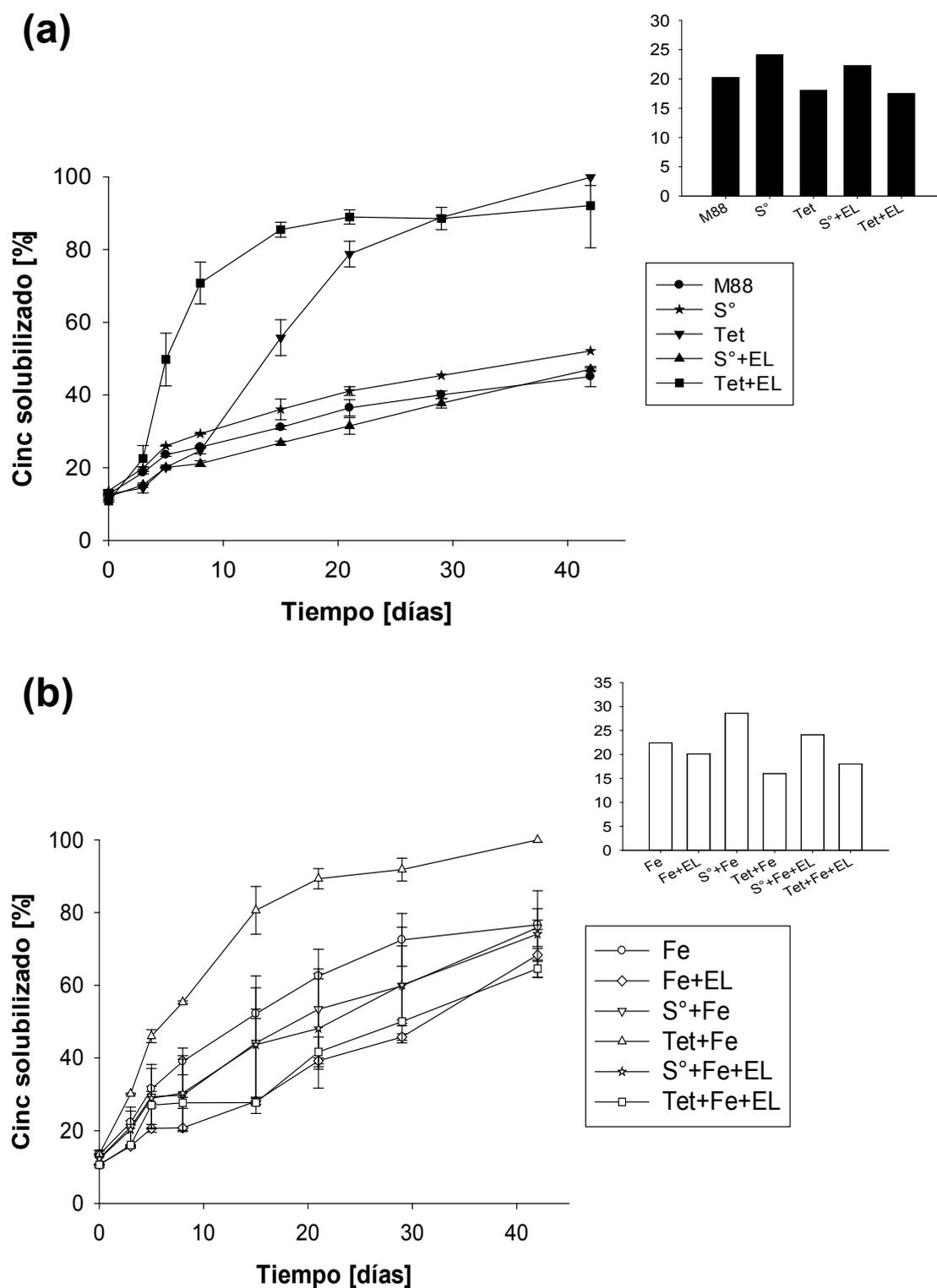
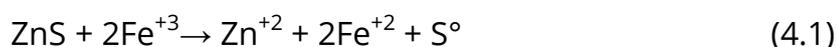


Figura 4.2. Evolución del cinc solubilizado en los cultivos y controles estériles (gráficos internos) durante los ensayos de lixiviación del mineral de Hualilán con *A. copahuensis*: **(a)** sistemas sin agregado de hierro(II); **(b)** sistemas con agregado de hierro(II).

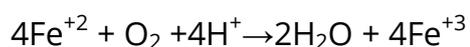
La suplementación de tetrionato al medio de cultivo generó el máximo porcentaje de recuperación de cinc por *A. copahuensis* (90-100 %) (Fig. 4.2a). El cultivo que mostró la cinética más rápida para solubilizar cinc fue aquel que tubo agregados de tetrionato de potasio y extracto de levadura; en este caso, se solubilizó más del 85% del cinc presente en el mineral en sólo 14 días de incubación. Esta mejora en la recuperación de cinc no se observó al suplementar otros compuestos de azufre como fuentes de energía.

La suplementación externa de hierro(II) benefició la biolixiviación, logrando porcentajes de recuperación de cinc mayores al 60% en todos los cultivos (Fig. 4.2b). De todos modos, el mejor desempeño fue logrado cuando se complementó con la adición de tetrionato (100%). El agregado simultáneo de extracto de levadura provocó una disminución en la extracción final de cinc.

El efecto en la recuperación de cinc generado por la adición externa de hierro puede ser explicado por el ataque de hierro(III) al mineral (Haghshenas y col., 2009). La solubilización de cinc a partir de la esfalerita (principal compuesto de cinc presente en el mineral) debido al ataque de hierro(III), puede ser representado mediante la siguiente ecuación:



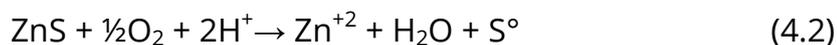
Como se demostró en el segundo capítulo y, al igual que otros microorganismos hierro oxidantes, *A. copahuensis* es capaz de regenerar el hierro(III) mediante la oxidación de hierro(II) (Ec. 2.6)



No obstante, en el segundo capítulo (Sección 2.3.1) se comprobó que *A. copahuensis* utiliza preferentemente otros sustratos (como tetrionato),

del mismo modo que lo observado en otras especies de arqueas termófilas (Shiers y col., 2013).

Este mecanismo de biolixiviación indirecto no fundamenta el incremento de la extracción de cinc generado por la adición de tetrionato. Esto puede explicarse debido a que los enlaces metal-sulfuro presentes en los sulfuros metálicos solubles en ácido (como la esfalerita), también pueden ser rotos por el ataque de protones (en lugar de hierro(III)), liberando sulfuro de hidrógeno e incluso oxidándolo hasta azufre elemental (Rodríguez y col., 2003b; Schippers y col., 2014). Esta disolución oxidativa iniciada por protones, puede representarse del siguiente modo



Este mecanismo solo puede ser mantenido si existe una producción de ácido independiente, dado que los protones son consumidos durante la disolución ácida de la esfalerita.

En la Figura 4.3 se muestra la evolución de los valores de pH en todos los sistemas de biolixiviación; en la Figura 4.3a se muestran los valores de pH en los sistemas sin agregado inicial de hierro(II) y en la Figura 4.3b los valores de pH de los sistemas en los que inicialmente se adicionó hierro(II).

Con excepción de los cultivos suplementados con tetrionato, el pH se incrementó durante la experiencia en todas las condiciones ensayadas (incluyendo los controles abióticos). Esta tendencia de ascenso del pH probablemente fue generada por el consumo de protones a través de la disolución ácida de la esfalerita, sumado a la disolución de algunos compuestos de naturaleza alcalina presentes en el mineral.

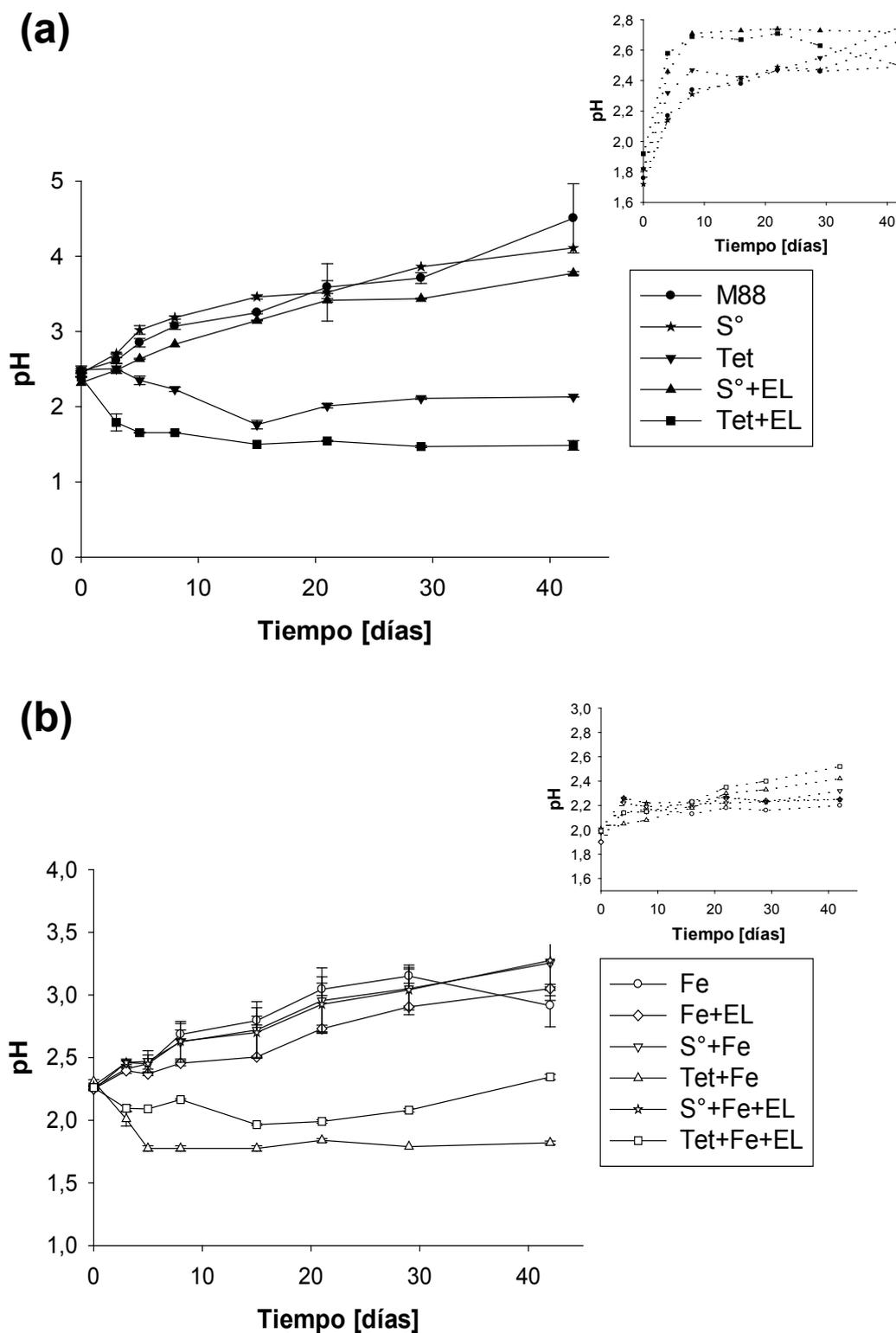


Figura 4.3. Evolución de pH en los cultivos y en los controles estériles (gráficos internos) durante los ensayos de lixiviación del mineral de Hualilán con *A. copahuensis*: **(a)** sistemas sin agregado de hierro(II); **(b)** sistemas con agregado de hierro(II).

A. copahuensis es capaz de crecer a expensas de la oxidación de tetrionato, generando ácido y consecuentemente disminuyendo el valor del pH del medio de cultivo (ver más detalles en la sección 2.3.1)



La adición externa de tetrionato en los sistemas biolixivantes favoreció la generación de ácido. De este modo el pH se mantuvo en valores por debajo de 2, permitiendo la continuidad de la disolución ácida de la esfalerita mediante el proceso indicado por la ecuación 4.2. En un estudio de biolixiviación de marmetita utilizando *S. thermosulfidooxidans* (realizado con un diseño experimental distinto) también se encontró que a bajos valores de pH se favorece la recuperación de cinc (Xiong y col., 2015). Un comportamiento diferente fue reportado por Mehrabani y col (2013) utilizando consorcios mesófilos y termófilos de microorganismos hierro y azufre oxidantes para lixiviar un mineral de plomo y cinc; encontraron que la extracción de cinc se incrementa cuando el pH se modifica de 1,5 a 2. El alto contenido de pirita en el mineral utilizado en estos experimentos pudo haber generado una disminución drástica del pH (mayor que en el experimento realizado con el mineral de Hualilán) inhibiendo parcialmente la actividad de los microorganismos. Ahmadi y Mousavi (2015) observaron un comportamiento similar en la biolixiviación de un concentrado de cinc utilizando un consorcio mixto de microorganismos termófilos moderados hierro y azufre oxidantes; al comparar experimentos realizados con diferentes valores de pH inicial comprobaron que la extracción de cinc a partir de esfalerita se redujo considerablemente en los experimentos realizado con un valor de pH inicial de 1,2; probablemente atribuido a la inhibición del crecimiento y actividad de los microorganismos. Deveci y col

(2004) propusieron una explicación similar en un estudio de biolixiviación realizado con un concentrado mineral de plomo y cinc usando microorganismos mesófilos y termófilos.

En las Figuras 4.2 y 4.3 puede observarse que la adición externa de azufre elemental (sustrato insoluble) en los sistemas biolixivantes no generó el mismo efecto que la suplementación de tetrionato (sustrato soluble), incluso siendo que su oxidación genera más moles de protones por mol de azufre oxidado.



Llamativamente el azufre elemental externamente agregado en los sistemas biolixivantes parece no ser oxidado por *A. copahuensis*. Sin embargo, en las cinéticas de crecimiento de *A. copahuensis* sobre azufre (ver sección 2.3.1) se observó una disminución del pH del medio de cultivo durante el crecimiento, demostrando claramente su capacidad de desarrollarse a expensas de la oxidación de azufre. Incluso en estas condiciones se alcanzaron mayores concentraciones celulares y menores valores de pH comparado con los cultivos suplementados con tetrionato como fuente de energía.

Además, en las secciones 2.3.6 y 3.3.3.3 mediante diferentes técnicas microscópicas se demostró la capacidad de *A. copahuensis* de colonizar azufre, produciendo microcolonias rodeadas de EPS sobre la superficie del azufre. Debido a que la adhesión de los microorganismos sobre el azufre es un paso indispensable para su oxidación, probablemente la muy baja o nula oxidación de azufre por *A. copahuensis* en los sistemas biolixivantes podría deberse a una adhesión preferencial de las células sobre la superficie mineral en comparación con su afinidad de adhesión sobre el azufre adicionado externamente. Como consecuencia de esto, y sumado al

relativamente alto nivel de adhesión de *A. copahuensis* sobre el mineral de Hualilán (ver más detalles en la sección 2.3.5), la disponibilidad de células libres para adherirse y oxidar azufre sería muy baja en los casos donde están presentes ambos sustratos.

Los resultados obtenidos en la biolixiviación de este mineral fueron analizados a través del modelo difusional conocido como “shrinking core/product layer” (Fowler y Crundwell, 1999; Giaveno y col., 2007; Marchevsky y col., 2015). 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, 1986).

De acuerdo a este modelo, la velocidad de reacción puede ser controlada por alguna de las etapas secuenciales que ocurren en la interfase líquido-sólido (Levenspiel, 1986):

- difusión a través de la película líquida
- difusión a través de la ceniza o capa producto
- reacción química

En el caso particular de las biolixiviaciones realizadas en sistemas agitados, puede suponerse que la velocidad del lixiviante no está controlada por problemas difusionales a través de la película líquida (Mishra y col., 2008), por lo que la limitación de la velocidad de reacción debe obedecer a alguna de las otras dos etapas.

Si la cinética de reacción está controlada por la difusión a través de la capa producto, los valores experimentales ajustarán con la ecuación 4.3

$$K_p \cdot t = 1 - \frac{2}{3}x - (1 - x)^{\frac{2}{3}} \quad (4.3)$$

donde K_p es la constante de velocidad (días^{-1}), t es el tiempo (días) y x es la fracción del reactivo que ha reaccionado.

En cambio, si el proceso es controlado por la reacción química, la expresión matemática está dada por la ecuación 4.4 (Gómez y col., 1999)

$$K_p \cdot t = 1 - (1 - x)^{\frac{1}{3}} \quad (4.4)$$

En función de decidir si alguna de estas etapas controló la velocidad de biolixiviación del cinc en nuestras experiencias, se analizaron los ajustes de los datos experimentales en gráficas $1 - \frac{2}{3}x - (1 - x)^{\frac{2}{3}}$ en función del tiempo (Fig. 4.4) y $1 - (1 - x)^{\frac{1}{3}}$ en función del tiempo (Fig. 4.5).

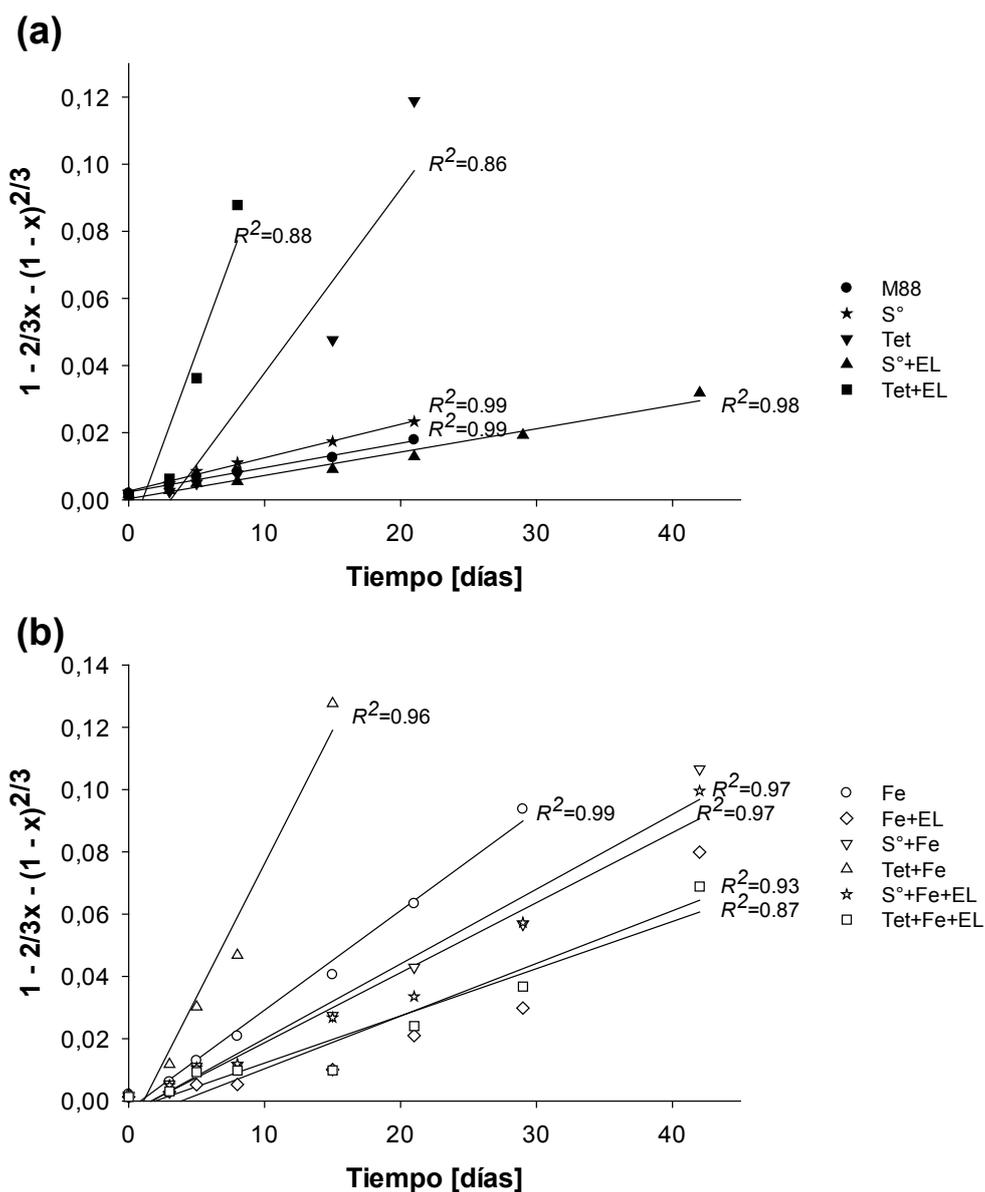


Figura 4.4. Gráficos $1 - \frac{2}{3}x - (1 - x)^{2/3}$ en función del tiempo de datos experimentales de disolución de cinc durante la biolixiviación del mineral de Hualilán: **(a)** sistemas sin agregado de hierro(II); **(b)** sistemas con agregado de hierro(II).

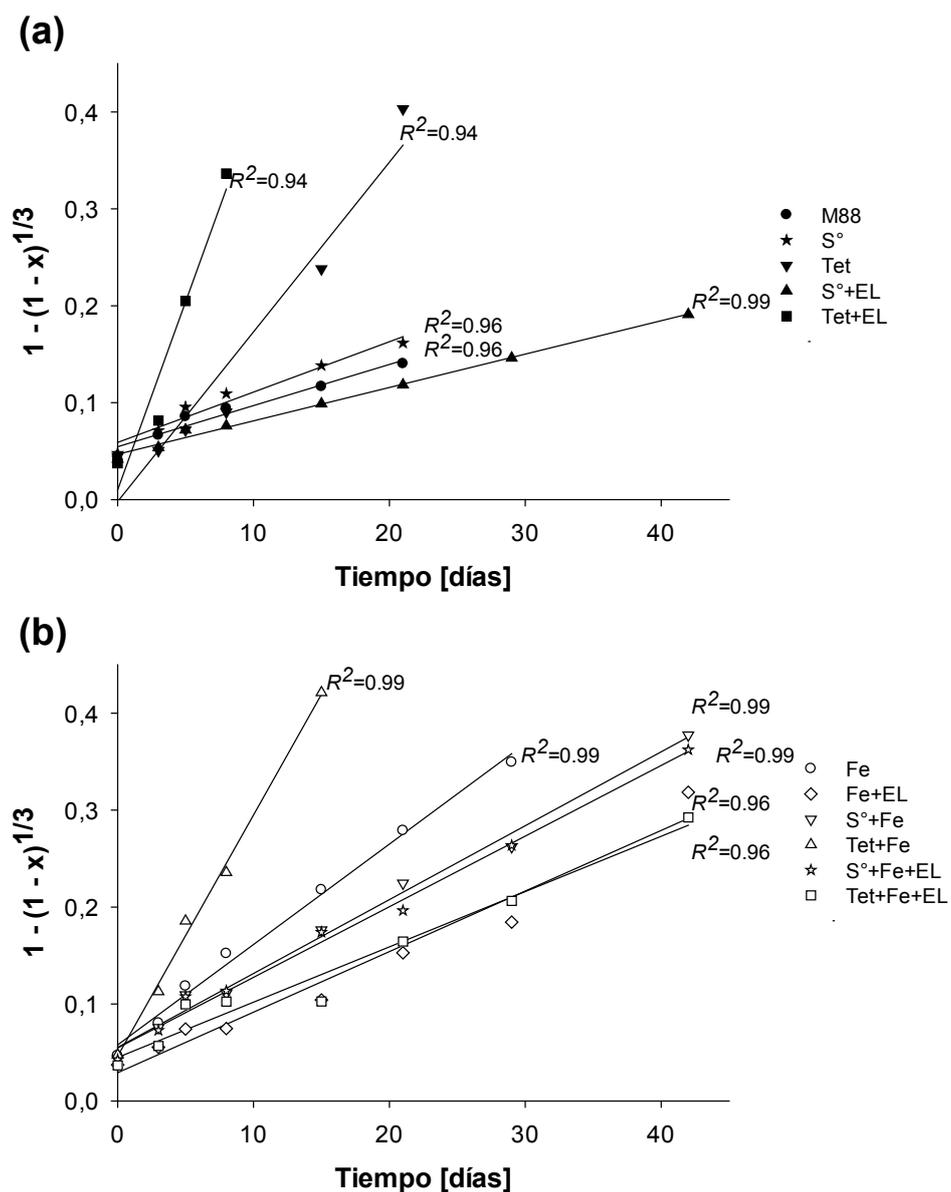


Figura 4.5. Gráficos $1 - (1 - x)^{1/3}$ en función del tiempo de datos experimentales de disolución de cinc durante la biolixiviación del mineral de Hualilán: **(a)** sistemas sin agregado de hierro(II); **(b)** sistemas con agregado de hierro(II).

Al analizar los valores de los coeficientes de correlación lineal (R^2) se observó que el modelo cinético de disolución de cinc controlado por la reacción química se ajusta mejor que el modelo cinético de limitación por

difusión para todos los cultivos suplementados con tetrionato. En contraste, la mayoría de los otros cultivos y, principalmente, aquellos con adición externa de hierro(II) mostraron mejores coeficientes de correlación lineal con el modelo de disolución limitado por difusión. Este resultado indica la formación de una capa de productos sobre la superficie mineral que limita la difusión de los reactantes.

Los residuos sólidos de algunos de los cultivos fueron analizados mediante DRX al finalizar el ensayo (Fig. 4.6). En los diagramas se pudieron detectar picos compatibles con la formación de precipitados de hierro como jarosita y hedenbergita.

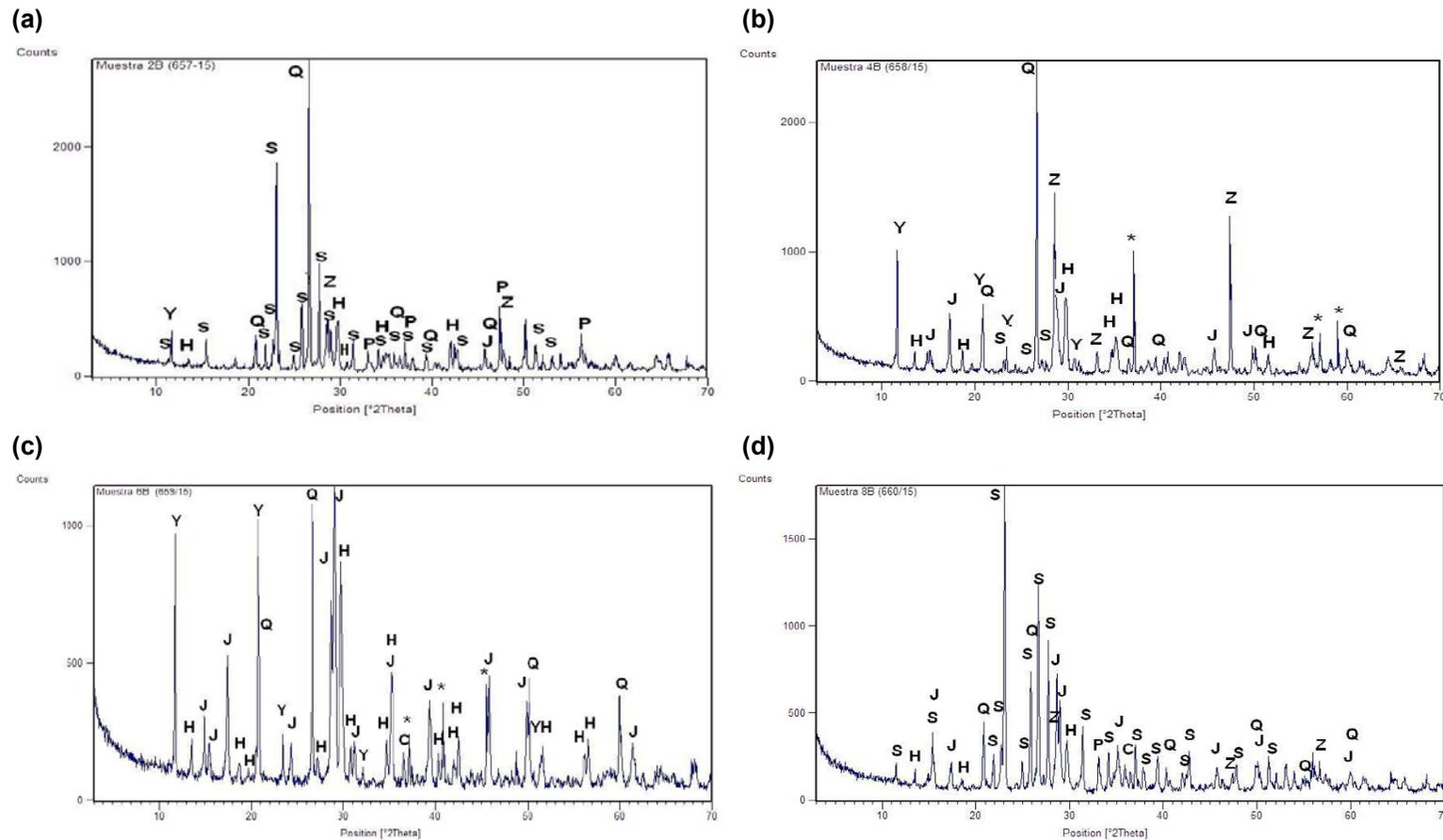


Figura 4.6. Diagramas DRX de residuos de algunos cultivos inoculados de la biolixiviación del mineral de Hualilán: **(a)** S⁰; **(b)** Fe; **(c)** Tet+Fe; **(d)** S⁰+Fe. C, cuprita; H, hedenbergita; J, jarosita; Q, cuarzo; P pirita; S, azufre; Y, yeso; Z, esfalerita.

Si bien se ha reportado que las capas compuestas por azufre y/o polisulfuros sobre la superficie mineral reducen las eficiencias de lixiviación (Giaveno y col., 2013; Haghshenas y col., 2009; Pecina y col., 2008; Weisener y col., 2004), en nuestro caso se observó una extensa precipitación de hierro, cuyas fases sólidas producidas durante esta precipitación (principalmente jarosita) seguramente formaron una barrera de difusión sobre la superficie mineral.

En la Figura 4.7 se muestran las concentraciones finales de hierro total soluble en los cultivos inoculados. En presencia de tetrionato, *A. copahuensis* mantuvo mayores concentraciones de hierro en solución comparado con el resto de los cultivos. Los bajos valores de pH logrados en estas condiciones parecen reducir la formación de precipitados de hierro, los cuales restringen la interacción de los microorganismos con la superficie mineral y disminuyen la difusión de los agentes lixiviantes, limitando de este modo la recuperación de cinc.

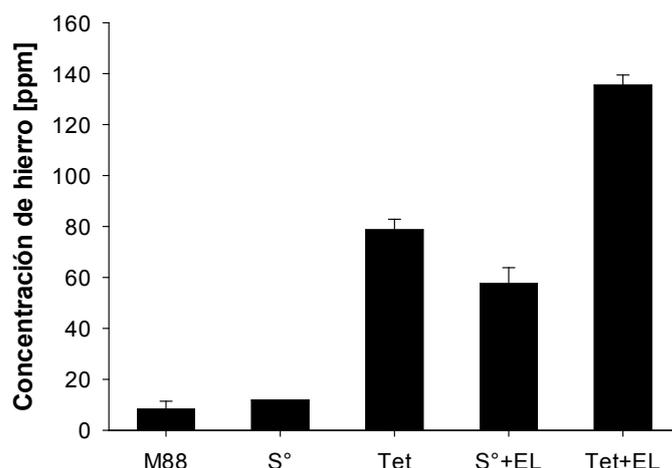


Figura 4.7. Concentración de hierro final en los ensayos de biolixiviación sin suplementación de hierro.

4.1.4. Conclusiones

En esta serie de ensayos se ha demostrado la capacidad de las células de *A. copahuensis* de biolixiviar el mineral de Hualilán, logrando elevadas recuperaciones de cinc. Este proceso podría ser utilizado simultáneamente para incrementar la recuperación de oro a partir de minerales en los cuales este metal se encuentra ocluido en una matriz de sulfuros. La disolución de cinc, en general, fue favorecida por la adición de otras fuentes de energía al medio de cultivo. Previamente en el capítulo 2 se concluyó que las células *A. copahuensis* cultivadas en tetrionato poseen una mayor afinidad de adhesión sobre el mineral de Hualilán. Además, la presencia de tetrionato en los sistemas de biolixiviación incrementó significativamente la recuperación de cinc, alcanzando recuperaciones del 100%. La disolución de la esfalerita se produjo mediante la acción de los protones generados durante la oxidación de tetrionato. Los bajos valores de pH generados en estas condiciones, además de incrementar la disolución ácida de la esfalerita, limitaron la precipitación de compuestos de hierro que cubren la superficie mineral y reducen la difusión de los agentes lixiviantes hacia la superficie. La adición simultánea de tetrionato y extracto de levadura incrementó la velocidad de extracción de cinc. La cinética de disolución de cinc parece estar controlada por la reacción química en el caso de los cultivos suplementados con tetrionato, pero en los otros cultivos la limitación estaría relacionada a la difusión de los reactantes a través de una capa de productos compuesta principalmente por jarosita y hedenbergita.

4.2. Biolixiviación de un concentrado de cobre

4.2.1. Introducción

El cobre es el metal más utilizado como material conductor debido a su excelente conductividad eléctrica, maleabilidad y ductilidad, y con un menor valor de mercado comparado con otros metales de similares características. Tiene innumerables aplicaciones en la tecnología actual además de uso masivo en cables eléctricos. Este metal semiprecioso, de color rojo brillante, se usa también en conectores, chips, cañerías, llaves, cerrojos, manijas de puertas y barandas. Además de su alta conductividad eléctrica, presenta una buena conductividad térmica y es resistente a la corrosión. Su uso está tan extendido que en una casa promedio (70 m²) se encuentran entre 70 y 90 kilos de cobre mientras que un automóvil mediano contiene alrededor de 22 kilos de cobre, en su mayoría, aunque no exclusivamente, bajo la forma de componentes eléctricos (Cámara Argentina de Empresarios Mineros, 2016). Por último, es un nutriente esencial para la vida, tiene propiedades antimicrobianas y es completamente reciclable.

En la Figura 4.8 se presenta la producción mundial de cobre desde el año 1900 (United States Geological Survey, 2016). La gráfica sigue una representación bastante típica con importantes incrementos en la producción de cobre a partir de la década del 80. En el año 2014, la producción mundial de cobre se incrementó en aproximadamente un 3% respecto del año anterior, llegando a los 18,7 millones de toneladas anuales (International Copper Study Group, 2016), mientras que la demanda cayó levemente en comparación al año 2013 (United States Geological Survey, 2016). Se prevé que la producción mundial de cobre seguirá aumentando a

tasas elevadas durante los próximos años (International Copper Study Group, 2016).

Chile es el principal país productor, contribuyendo con un 34% del total de la producción mundial de cobre; seguido por China, Perú, Estados Unidos, Congo y Australia (United States Geological Survey, 2016). La Argentina cuenta con producción de cobre propia, aunque se encuentra muy lejos de alcanzar los niveles de los países anteriormente mencionados. Sin embargo, la Argentina cuenta con reservas de cobre que, si se explotaran, convertirían al país en uno de los cinco mayores productores del metal rojo del mundo. Bajo de la Alumbreira, es el proyecto más grande de superficie de Argentina. El yacimiento está ubicado en la provincia de Catamarca y contiene cobre, oro y molibdeno (Aumbreira Ltd, 2016). Otro proyecto minero en el país con grandes reservas de cobre y molibdeno, es Pachón (Pachón, 2016); este mega yacimiento de cobre se encuentra ubicado en la provincia de San Juan. Una vez en marcha será la mina de cobre más grande del país y tendrá una vida útil de aproximadamente 30 años.

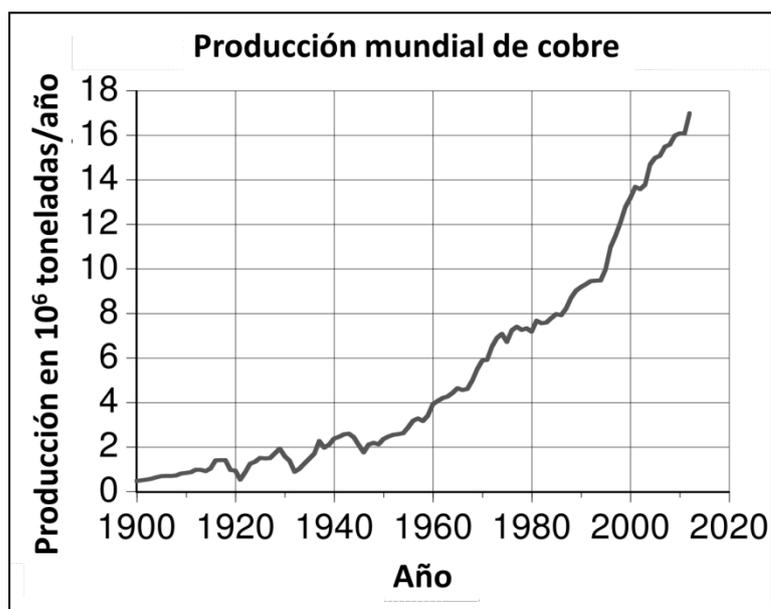


Figura 4.8. Producción mundial de cobre desde el año 1900. Fuente: USGS.

La calcopirita (CuFeS_2) es la especie mineral de cobre de mayor interés en la industria del cobre ya que es el mineral más abundante, constituyendo aproximadamente el 70% del cobre total presente en el planeta (Li y col., 2013). Es un mineral muy refractario, es decir, muy difícil de disolver en condiciones ambientales. Actualmente este mineral se trata mediante técnicas de flotación y pirometalurgia. La hidrometalurgia aplicada a la calcopirita presenta la problemática de que es muy refractaria frente a los agentes lixiviantes comúnmente utilizados a temperatura ambiente.

Debido a lo anteriormente mencionado, es necesario desarrollar tecnologías alternativas para el procesamiento de estos sulfuros, que incrementen su lenta cinética de lixiviación y disminuyan el impacto ambiental que su tratamiento tradicional genera. En este sentido, la biolixiviación es una de las alternativas metalúrgicas para su tratamiento. Sin embargo, la aplicación de la biolixiviación de calcopirita a escala comercial continua siendo inadecuada debido a las lentas cinéticas de lixiviación y a las bajas recuperaciones de cobre obtenidas cuando se utilizan microorganismos mesófilos (Li y col., 2013; Watling, 2013). Se han propuestos varios métodos para incrementar las eficiencias de biolixiviación de la calcopirita, destacándose la biolixiviación a altas temperaturas con el uso de microorganismos termófilos que, en general, incrementan las velocidades de reacción y disminuyen el carácter refractario de este mineral (Watling, 2006).

En esta sección se describen los estudios de biolixiviación realizados con la arquea termófila *A. copahuensis* y un concentrado de flotación principalmente compuesto por calcopirita, producido en Bajo la Alumbreira. El objetivo principal fue estudiar la potencialidad de *A. copahuensis* para el tratamiento de un mineral refractario como la calcopirita en función de

obtener una elevada recuperación de cobre. Otro de los objetivos de esta etapa fue evaluar la flexibilidad metabólica de *A. copahuensis* y el efecto de diferentes fuentes de energía en la recuperación de este metal.

4.2.2. Materiales y métodos

4.2.2.1. Mineral

Para estos experimentos se utilizó un concentrado mineral de Bajo la Alumbraera. Las características del mineral se detallan en la sección 2.2.1.3.

4.2.2.2. Microorganismos y medio de cultivo

Las células de *A. copahuensis* utilizadas en esta experiencia fueron transferidas varias veces en medio MAC (Anexo I) suplementado con el concentrado de cobre, con el objetivo de adaptar el cultivo a las condiciones experimentales, ya que, como se indicó en la sección 2.3.5, las células adaptadas a crecer con el mineral mostraron un mayor porcentaje de adhesión al concentrado de calcopirita que las células no adaptadas y esto podría incrementar la actividad de los microorganismos sobre el mineral, logrando mejores recuperaciones de cobre.

Para la preparación del inóculo se procedió del mismo modo que para el ensayo de biolixiviación del mineral de Hualilán, descrito previamente en la sección 4.2.1.2.

4.2.2.3. Ensayos de biolixiviación

Los ensayos de biolixiviación del concentrado de Bajo la Alumbraera se realizaron de modo similar a los realizados con el mineral de Hualilán (ver detalles en la sección 4.2.1.3). En esta experiencia se utilizó medio de cultivo MAC pH 2. Alternativamente se utilizó como fuente de energía uno o más de los siguientes compuestos: azufre elemental (10 g/L), tetrionato de potasio (3 g/L), hierro(II) (1 g/L), glucosa (1 g/L) y extracto de levadura (1 g/L). En todos los casos, se utilizó el concentrado de cobre con una

densidad de pulpa del 2% (p/v). La Tabla 4.2 resume las condiciones y denominaciones de los sistemas ensayados. Cada uno de los sistemas biolixivantes se inoculó al 3,33% v/v de modo de alcanzar 1×10^7 células/mL de *A. copahuensis*.

El seguimiento del ensayo se realizó tomando muestras periódicamente y midiendo pH y Eh utilizando electrodos específicos, concentración de hierro(II) mediante el método de la o-fenantrolina. Las concentraciones de hierro total soluble y cobre se determinaron a través de espectroscopia de absorción atómica (ver más detalles en la sección de Anexos).

Tabla 4.2. Denominaciones y condiciones experimentales utilizadas en la experiencia de biolixiviación del mineral de Bajo la Alumbra

Sistema	Fuente de energía				Extracto de levadura (1 g/L)
	S° (10 g/L)	K ₂ S ₄ O ₆ (3 g/L)	Hierro(II) (1 g/L)	Glucosa (1 g/L)	
MAC					
S°	X				
Tet		X			
Fe			X		
Glu				X	
EL					X
S°+EL	X				X
Tet+EL		X			X
Fe+EL			X		X
S°+Fe	X		X		
Tet+Fe		X	X		
Glu+Fe			X	X	
S°+Fe+EL	X		X		X
Tet+Fe+EL		X	X		X

Luego de 50 días de incubación, se tomaron muestras de los residuos lixiviados para analizar los cambios en la superficie mineral durante la lixiviación. Las muestras fueron fijadas tal como se detalla en el Anexo III y posteriormente visualizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Al finalizar el ensayo se analizó la composición de los minerales residuales mediante DRX.

4.2.3. Resultados y discusión

La cantidad de cobre solubilizado, asociado a la disolución de la calcopirita, que es el principal sulfuro presente en la muestra mineral de Bajo la Alumbreira, es un parámetro que permite seguir la evolución de los ensayos de biolixiviación. La Figura 4.8 muestra la evolución del cobre en solución para los sistemas inoculados y para los controles estériles, durante los 120 días de ensayo. El porcentaje de cobre extraído fue calculado en base al contenido de cobre presente en la muestra.

En los controles abióticos (Fig. 4.9, gráficos internos), la cantidad de cobre disuelto no se incrementó significativamente durante la experiencia. Al finalizar el ensayo, se lixivió abióticamente sólo el 20% y 10% del cobre en los controles estériles con y sin adición de hierro, respectivamente. La diferencia generada por la adición de hierro(II) probablemente este relacionada con su oxidación (que, aunque lenta, ocurre a largos tiempos) y el consecuente ataque sobre el mineral. Además el efecto galvánico generado por el contacto directo entre la calcopirita y la pirita presente en el mineral podría contribuir en la disolución de cobre (Li y col., 2013).

A. copahuensis mejoró significativamente la recuperación de cobre a partir de la calcopirita, logrando prácticamente el 100% de disolución de cobre en los ensayos realizados sin sustratos adicionales; este primer resultado observado con esta especie coincide con los resultados de otros trabajos similares realizados con otros microorganismos extremófilos (Abdollahi y col., 2014; Konishi y col., 2001; Liang y col., 2014; Rodríguez y col., 2003c; Vilcáez y col., 2008; Wang y col., 2014). Sin embargo, en nuestro caso la densidad de pulpa fue mayor, los valores de pH no fueron tan bajos y no se realizó ninguna adición externa.

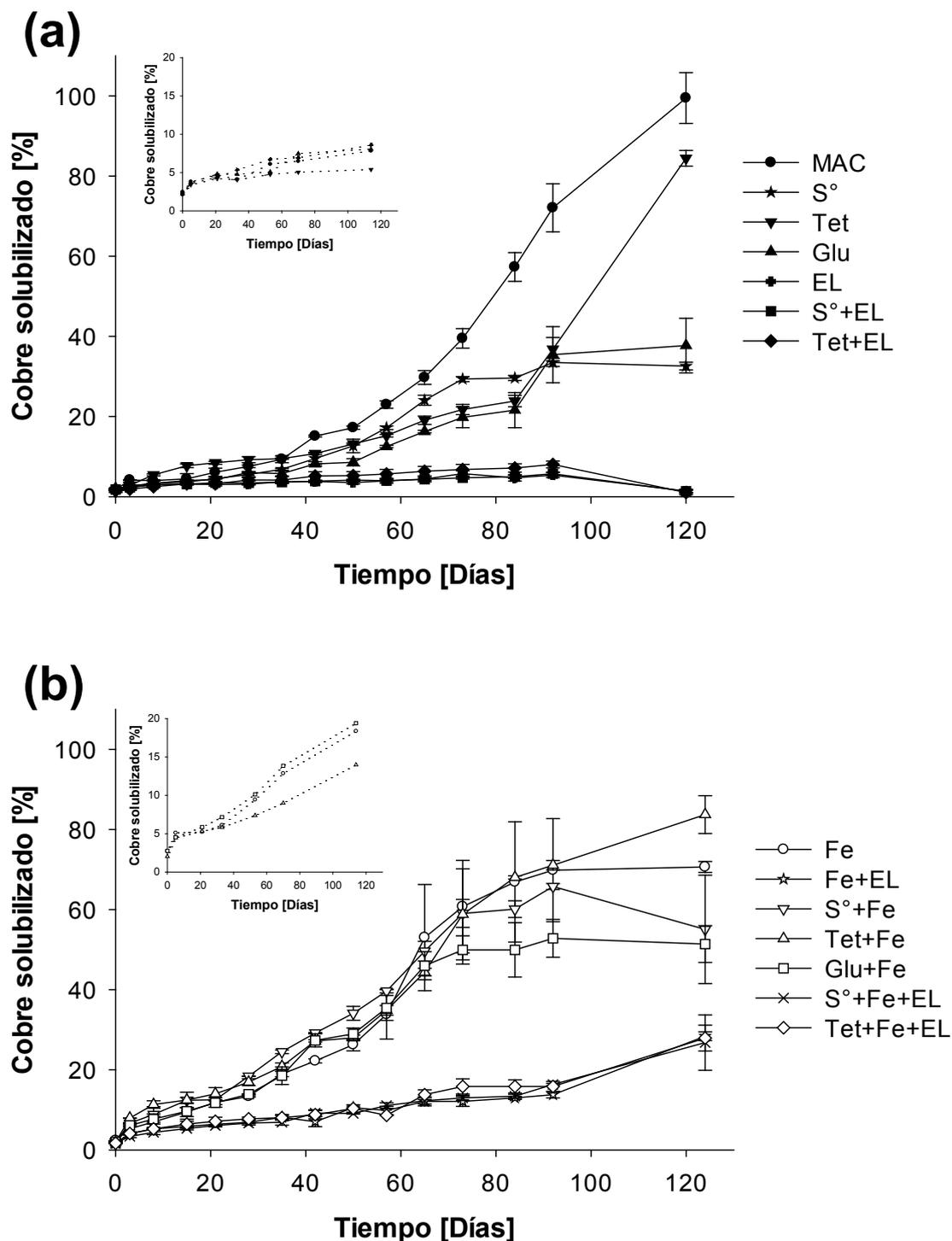


Figura 4.9. Evolución del cobre solubilizado en los cultivos y controles estériles (gráficos internos) durante los ensayos de lixiviación del mineral de Bajo la Alumbraera con *A. copahuensis*: **(a)** sistemas sin agregado de hierro(II); **(b)** sistemas con agregado de hierro(II).

Los cambios mineralógicos en el mineral producidos por la biolixiviación fueron evaluados mediante DRX (Fig. 4.10). Al comparar los diagramas DRX de los residuos provenientes de cultivos con altas recuperaciones de cobre y el mineral sin tratar, se observó que la muestra biolixiviada con *A. copahuensis* cambia significativamente su composición. El cambio más importante es la desaparición de los picos correspondientes a la calcopirita, indicando su disolución durante la experiencia de biolixiviación. Este resultado coincide con los datos de solubilización de cobre. Luego de la experiencia, en los residuos biolixiviados se detectaron compuestos no disueltos como pirita y molibdenita, además de algunos productos de reacción como azufre elemental, jarosita y hematita.

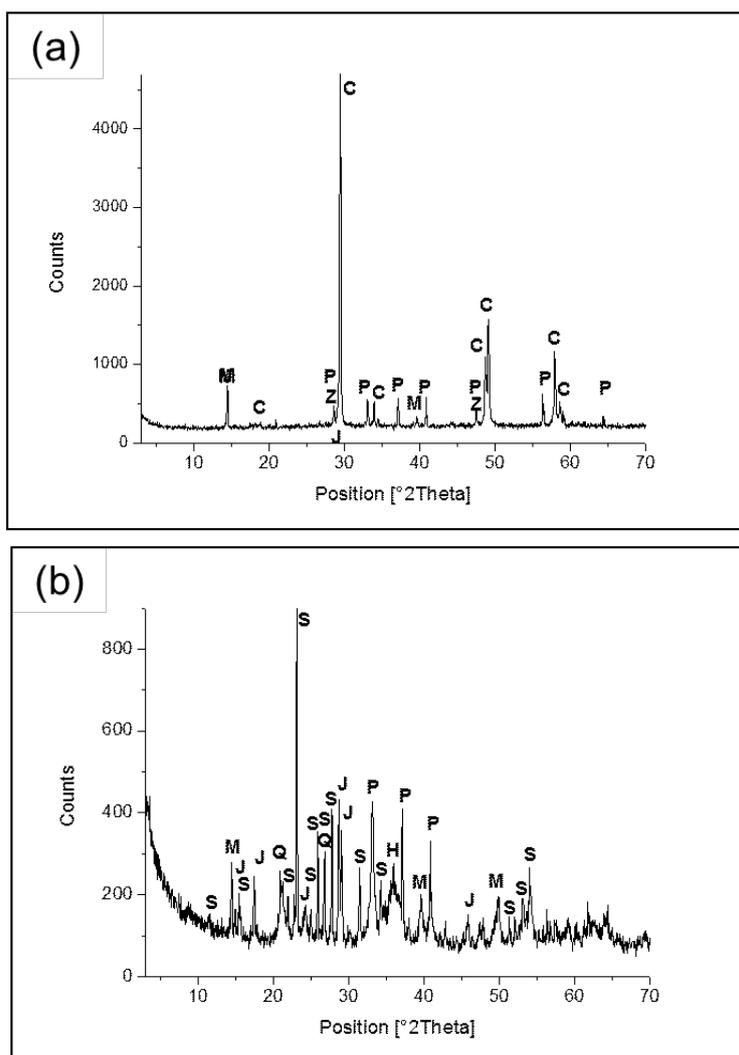


Figura 4.10. Diagrama de difracción de rayos x de: **(a)** muestra mineral sin tratamiento y **(b)** una muestra representativa de un residuo lixiviado por *A. copahuensis* con alta recuperación de cobre. C, calcopirita; H, hematita; J, jarosita; M, molibdenita; P, pirita; Q, cuarzo; S, azufre; Z, esfalerita.

Luego de 50 días de ensayo, los residuos de lixiviación, tanto química como biológica, fueron examinados mediante SEM para estudiar la corrosión de la superficie mineral. Las imágenes de los residuos provenientes del control estéril muestran partículas minerales con superficies limpias y muy poca cantidad de precipitados (Fig 4.11a). Los residuos provenientes de los cultivos muestran un fuerte ataque sobre la

superficie (Fig. 4.11b). No pudieron detectarse células adheridas a la superficie mineral, quizás por alguna cuestión técnica durante la preparación de la muestra o porque los microorganismos se encuentren cubiertos por precipitados depositados sobre la superficie durante el ataque (Fig. 4.11c).

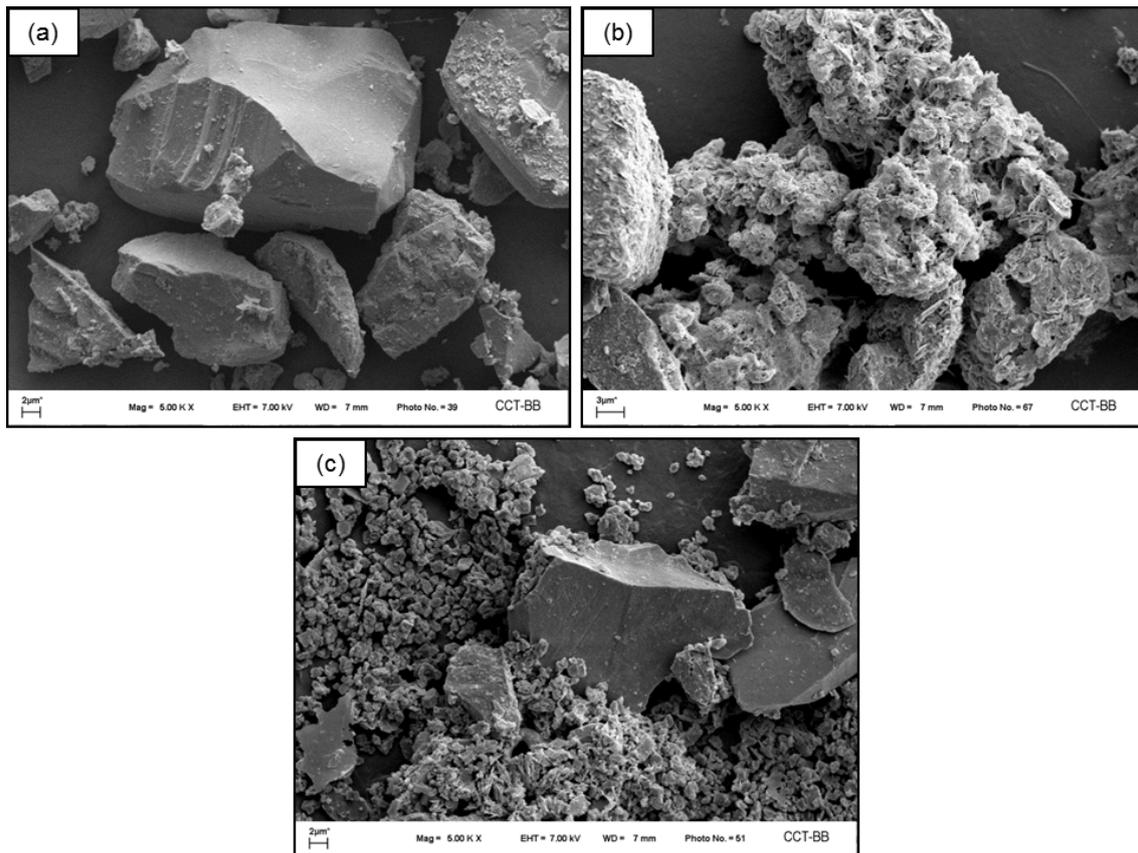
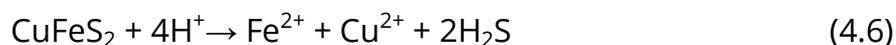
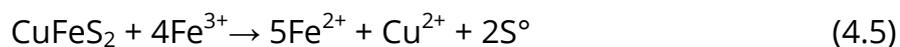


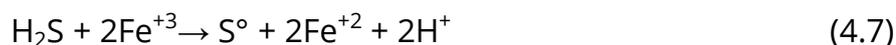
Figura 4.11. Micrografías SEM de las partículas de mineral luego de 50 días de incubación: **(a)** mineral lixiviado químicamente en medio MAC; **(b)** partículas de mineral luego de la interacción con *A. copahuensis* en medio MAC; y **(c)** residuo de un sistema con agregado de hierro(II).

La calcopirita puede disolverse mediante acción oxidativa del hierro(III) sobre el mineral (Ec. 4.5) y/o ataque ácido (Ec. 4.6) mediante el

mecanismo de los polisulfuros (Vera y col., 2013). La disolución puede simplificarse y representarse mediante las siguientes reacciones



El sulfuro de hidrógeno liberado durante el ataque ácido, es oxidado a azufre por el hierro(III) (Ec. 4.7)



En presencia de microorganismos hierro oxidantes, el hierro(II) es oxidado rápidamente a hierro(III) (Ec. 2.6), regenerando el oxidante. Además el azufre generado en la disolución de la calcopirita es metabolizado por microorganismos azufre oxidantes hasta generar ácido sulfúrico como producto final (Ec. 2.1), incrementando la acidez de la solución y evitando la formación de barreras difusionales creadas por deposición de azufre.

Este mecanismo es ampliamente aceptado para microorganismos mesófilos; no está confirmado pero aparentemente también podría aplicarse en los procesos de disolución en los que se utilicen microorganismos termófilos como en este caso.

La completa recuperación de cobre (100%) (Fig. 4.9a), lograda en el sistema sin ninguna fuente de energía adicional, estuvo acompañada por aumento de la concentración de hierro debido a la disolución del mineral, logrando solubilizar aproximadamente 900 ppm de hierro principalmente en forma de hierro(II) (~600 ppm) (Fig. 4.12a). *A. copahuensis* no oxidó completamente el hierro(II) liberado en la disolución del mineral, principalmente debido a su baja capacidad para catalizar dicha reacción.

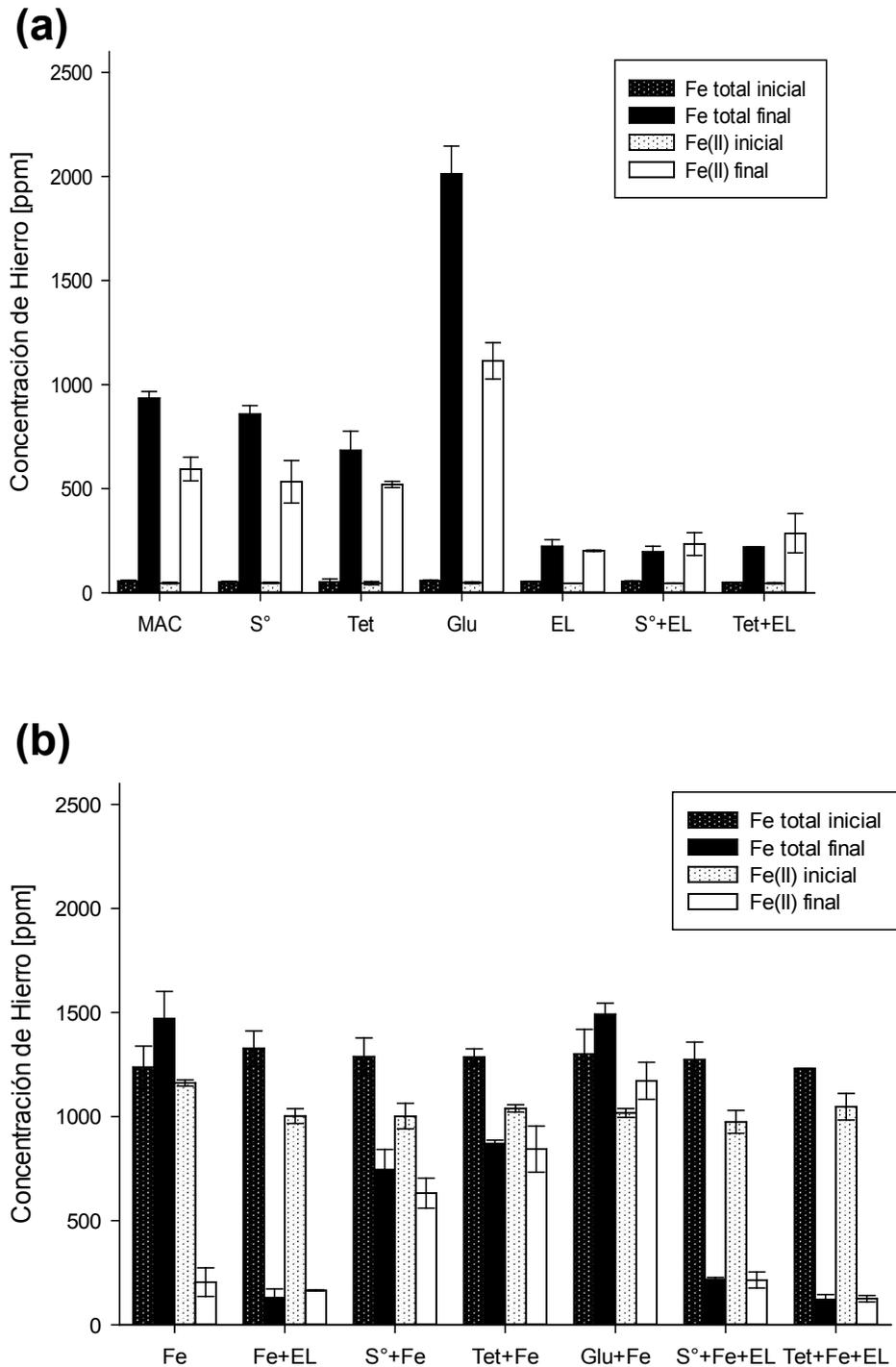


Figura 4.12. Concentración de hierro total soluble y hierro(II) al inicio y final del ensayo de biolixiviación del concentrado de cobre con *A. coaphuensis*: **(a)** sistemas inoculados sin agregado de hierro(II); **(b)** sistemas inoculados con agregado de hierro(II).

Previamente, en la sección 2.3.1 se ha comprobado que esta cepa es capaz de oxidar hierro(II), pero a muy bajas velocidades y con bajos rendimientos, comparado con su crecimiento en otros sustratos. Las bajas concentraciones de hierro(III) en solución se vieron reflejadas en bajos valores de potencial redox (menores a 400 mV) (Tabla 4.3). El potencial redox es un factor muy importante en la lixiviación de calcopirita ya que ésta aparentemente se disuelve a mayores velocidades en condiciones de bajo potencial redox (Córdoba y col., 2008a; Gericke y col., 2010; Li y col., 2013; Watling, 2013). Muchos investigadores han sugerido que esto se debe a que valores de potencial redox elevados durante el inicio del proceso pueden causar una rápida pasivación de la calcopirita impidiendo su posterior disolución (Gericke y col., 2010; Petersen y Dixon, 2006; Zhao y col., 2015). Los experimentos descritos en nuestro trabajo, fueron llevados a cabo sin ningún control de potencial redox externo, pero la baja (aunque no nula) capacidad de *A. copahuensis* de oxidar hierro(II) contribuyó a mantener condiciones con bajo potencial redox favorables para la biolixiviación de calcopirita. Este factor sumado a la disminución del carácter refractario de la calcopirita a altas temperaturas, parecen ser las razones que explican la elevada recuperación de cobre lograda en esta experiencia. La baja actividad hierro oxidante de estas células sugiere que en ausencia de agregado inicial de hierro, la biolixiviación podría estar dirigida mediante un mecanismo de contacto, en el cual las células se encuentran adheridas a la superficie mineral, cercanas al espacio donde se generan productos más adecuados para su desarrollo.

Tabla 4.3. Parámetros fisicoquímicos al inicio y a la finalización del ensayo de biolixiviación del mineral de La Alumbra con *A. copahuensis*: **(a)** sistemas sin agregado de hierro(II); **(b)** sistemas con agregado de hierro(II)

(a)

	Tiempo [Días]	Sistema							Estéril
		MAC	S°	Tet	Glu	EL	S°+EL	Tet+EL	
pH	0	2.00	2.01	2.01	2.03	2.18	2.19	2.20	2.25
	120	1.70	2.40	1.68	2.38	2.66	2.67	2.38	2.19
Eh (mV)	0	367.45	356.35	361.05	355.05	383.55	381.35	372.20	367.30
	120	389.80	390.25	387.50	390.20	361.65	356.45	367.50	370.40

(b)

	Tiempo [Días]	Sistema							Estéril
		Fe	Fe+EL	S°+Fe	Tet+Fe	Glu+EL	S°+Fe+EL	Tet+Fe+EL	
pH	0	2.08	2.17	2.10	2.09	2.05	2.16	2.16	2.22
	120	1.28	2.15	1.70	1.60	2.20	2.19	2.19	1.86
Eh (mV)	0	351.60	357.90	351.00	349.30	352.70	357.90	356.70	372.50
	120	413.85	370.70	390.60	396.55	391.65	379.65	374.20	358.40

Al comparar las extracciones de cobre en las diferentes condiciones estudiadas, el agregado de otras fuentes de energía al medio de cultivo parece reducir significativamente la eficiencia de biolixiviación de *A. copahuensis* (Fig. 4.9). Se lograron recuperaciones de cobre del 84,4%, 83,7%, y 70,6% en los cultivos suplementados con tetrionato de potasio, con tetrionato de potasio-hierro(II) y con hierro(II), respectivamente. El extracto de levadura provocó el mayor efecto negativo en la actividad lixivante de *A. copahuensis*, alcanzando recuperaciones de cobre menores al 30% en los cultivos con este suplemento. Un comportamiento similar se observó en el cultivo que se suplementó solo con azufre elemental (~33% de extracción de cobre). Una recuperación levemente superior se observó en presencia de glucosa (~38%). En estas dos últimas condiciones, la adición de hierro(II) como segundo sustrato incrementó la extracción de cobre a 55% y 51%, respectivamente. Los efectos negativos producidos en las recuperaciones de cobre debido a la adición de sustratos sugieren que las células utilizaron estas fuentes de energía en lugar de oxidar el azufre de la calcopirita. En los cultivos suplementados con extracto de levadura se registraron los valores de potencial redox más bajos (la mayor parte del hierro se encuentra como hierro(II)), mientras que el cultivo suplementado inicialmente con hierro(II) alcanzó el mayor potencial redox (aproximadamente 415 mV) lo que probablemente indujo una alta precipitación de jarosita.

Muchos autores atribuyen las lentas cinéticas de biolixiviación de calcopirita a la formación de una capa pasivante sobre la superficie mineral durante este proceso. Se han propuesto varios productos responsables de dicha pasivación, entre ellos, jarosita, calcocita, covelita y azufre elemental (Li y col., 2013), pero generalmente el azufre y la jarosita son los más usualmente reportados como responsables de la pasivación de la superficie

de la calcopirita (Córdoba y col., 2008b; Bevilaqua y col., 2002; Vilcáez y col., 2008; Wang y col., 2014). Córdoba y col (2008b) han informado que la suplementación de hierro causa una disminución en las cinéticas de biolixiviación de calcopirita, tanto en microorganismos mesófilos como termófilos. Este comportamiento se asoció a la nucleación y precipitación de jarosita. Como ya se detalló anteriormente, al final de la experiencia, en los cultivos con hierro(II) se observó un leve incremento o incluso una disminución en la concentración de hierro total soluble comparado con las concentraciones iniciales (Fig. 4.12b). Teniendo en cuenta que el hierro debería haberse solubilizado simultáneamente con el cobre, en una relación, al menos, igual a la estequiométrica presente en la calcopirita, esta información indica una intensa precipitación de hierro. El aumento de picos correspondientes a la jarosita (y en algunos casos la aparición de algunos correspondientes a hematita) en los residuos provenientes de los sistemas de biolixiviación en el análisis realizado por DRX, confirman esta precipitación de hierro (Fig. 4.10). Sumado a esto, las observaciones de los residuos mediante SEM confirmaron la presencia de grandes cantidades de precipitados cubriendo parte de la superficie de la calcopirita e impidiendo el ataque de los microorganismos sobre el sulfuro metálico (Fig. 4.11c). La adición externa de hierro(II) al medio de cultivo en los ensayos con *A. copahuensis*, contribuyó a la formación de barreras difusionales de jarosita sobre la superficie mineral, impidiendo el acceso microbiano y limitando la difusión de agentes lixiviantes hacia el sólido, lo cuál limita la recuperación de cobre. Esto también limitó el mecanismo de lixiviación por contacto.

El agregado de tetratiónato de potasio no provocó un descenso tan pronunciado en la extracción de cobre. Como ya se mencionó anteriormente, *A. copahuensis* prefiere otras fuentes de energía en lugar de hierro(II), lo que conlleva a una menor oxidación de hierro(II), manteniendo

valores de Eh y pH bajos, condiciones en las cuales hay una menor precipitación de jarosita y mejores recuperaciones de cobre.

En la mayoría de los cultivos ensayados, el pH se incrementó registrándose valores mayores a 1,8. Esto sugiere que en ningún cultivo se evitó la precipitación de jarosita, teniendo presente que incluso por debajo de aquel valor, puede haber una precipitación significativa (Pogliani y Donati, 2000).

El agregado de azufre a los cultivos disminuyó la extracción de cobre. Probablemente, la presencia de una superficie adicional donde las células pueden adherirse, genera una menor cantidad de células sobre el mineral, disminuyendo la contribución del mecanismo de biolixiviación por contacto. Además, las células mayoritariamente oxidan el azufre externo sobre el que están adheridas y no el azufre que puede generarse por la disolución de la calcopirita, que termina siendo pasivada por ese producto. Bevilaqua y col (2002) y Vilcáez y col (2008) informaron en forma semejante, que la adición de azufre produce efectos negativos en las biolixiviaciones de calcopirita realizadas con *A. thiooxidans* y *S. metallicus*, respectivamente. En nuestro caso, el agregado adicional de hierro(II) permitió aumentar la extracción de cobre a través del incremento del mecanismo de lixiviación de no contacto.

El agregado de una fuente orgánica redujo la extracción del cobre, seguramente porque habilitó el crecimiento heterotrófico de los microorganismos. La preferencia de estos microorganismos por las fuentes orgánicas (crecimiento heterotrófico por encima del autotrófico) se ha descrito anteriormente en la sección 2.3.1, y los resultados indican que este comportamiento afecta notablemente la eficiencia de biolixiviación de *A. copahuensis*.

4.2.4. Conclusiones

A. copahuensis logró una disolución completa de cobre luego de 120 días de biolixiviación del concentrado de flotación del mineral de Bajo de la Alumbraera, superando claramente a los controles estériles. El agregado de otras fuentes de energía a los cultivos, en general, disminuyó la extracción de cobre; siendo el extracto de levadura el causante del efecto más negativo.

A. copahuensis mantuvo bajos valores de potencial redox (principalmente en los cultivos sin adición de hierro), que permitieron una mayor recuperación de cobre a partir de la calcopirita; esta satisfactoria extracción de cobre fue realizada a pH 2 (mayor valor que los usados con otros microorganismos termófilos eficientes) donde la contribución por lixiviación química es menos importante a esta temperatura.

4.3. Conclusiones generales del capítulo

En este capítulo se presentaron los resultados de las biolixiviaciones de minerales provenientes tanto de una antigua explotación minera (Hualilán) como de un concentrado de mina en actividad (Alumbrera). La composición química y, especialmente las especies mineralógicas en las que se encuentran las especies de interés, son determinantes en la eficiencia del proceso de solubilización catalizado por los microorganismos.

Las experiencias permitieron comprobar la eficiencia de *A. copahuensis* en procesos de biolixiviación, particularmente para la recuperación de cinc y cobre.

En los ensayos realizados con el mineral de Hualilán, el agregado de una fuente de energía adicional a los cultivos, incrementó la solubilización de cinc por *A. copahuensis*. Este incremento varió de acuerdo a los sustratos suplementados. En general, se observó que el agregado de tetrionato de potasio al medio de cultivo favorece la actividad de estos microorganismos sobre el mineral, logrando extracciones de cinc del 100%. En estas condiciones los valores de pH se mantuvieron más bajos que en el resto de los cultivos, evitando la precipitación tan abundante de hierro y disminuyendo la formación de barreras difusionales sobre la superficie mineral que limitan la recuperación de metales. Al aplicar los modelos cinéticos, se comprobó que en las condiciones de máxima recuperación el control del proceso de biolixiviación es por reacción química.

A. copahuensis también logró una importante biolixiviación del concentrado mineral de Bajo de la Alumbrera. En ese caso se consiguió una recuperación total (100%) de cobre luego de 120 días de incubación. La condición más favorable fue sin agregado de otras fuentes de energía, que sumado a las bajas concentraciones de hierro, bajos pH y la capacidad de *A.*

copahuensis de mantener bajos valores de potencial redox limitaron la formación de barreras difusionales, favoreciendo de este modo la extracción de cobre.

Conclusiones generales y perspectivas futuras

CONCLUSIONES GENERALES

Durante este Trabajo de Tesis Doctoral, se ha focalizado en el estudio de la interacción de *A. copahuensis* con distintas superficies minerales, así también como en la aplicación de esta arquea termoacidófila en procesos de recuperación de metales mediante biolixiviación.

A. copahuensis demostró su capacidad de crecer en medios suplementados con diferentes fuentes de energía, como azufre, tetrionato, hierro(II), pirita, glucosa y extracto de levadura. Sin embargo presenta un mejor crecimiento cuando se utilizan compuestos de azufre como fuentes de energía. De acuerdo a las condiciones para cultivar las células, se observan algunos cambios morfológicos, principalmente relacionados a la superficie celular.

La adhesión de *A. copahuensis* sobre distintos minerales ocurre inmediatamente cuando las células comienzan a estar en contacto con el mineral y depende del mineral utilizado y las condiciones de cultivo de las células. Estudios adicionales corroboraron la formación de biofilms de *A. copahuensis* sobre superficies minerales. El incremento en la adhesión y colonización de la superficie mineral se vio reflejado en una mayor disolución del mineral.

Tanto la cantidad como la composición de los EPS producidos por *A. copahuensis* varían de acuerdo a la fuente de energía utilizada para cultivar las células. La mayor producción de EPS se observó en células cultivadas en pirita. Las variaciones en la composición de EPS podrían influenciar la adhesión de las células sobre superficies sólidas.

La presencia de un sobrenadante o un biofilm inactivo de *A. copahuensis* o *S. metallicus*, afectan negativamente la adhesión y actividad

biolixiviantes entre diferentes especies de arquea. Este es el primer trabajo en el que se ha reportado la existencia de interacciones entre distintas especies de arqueas termoacidófilas, así como también la primera vez que se han visualizado células de una especie específica formando parte de un biofilm mixto entre arqueas acidófilas.

A. copahuensis mostró ser altamente eficiente en la biolixiviación de minerales de cinc permitiendo la recuperación casi completa del metal. La eficiencia de *A. copahuensis* la muestra como potencialmente adecuados para ser usados en aplicaciones a nivel comercial aunque con las restricciones propias que impone la temperatura de trabajo de los mismos.

Esta nueva especie de arquea también fue capaz de biolixiviar eficientemente un concentrado de cobre refractario, que por sus características resulta difícil de lixiviar mediante el empleo de microorganismos mesófilos. La disolución total de cobre, alcanzada en algunas condiciones, muestran a esta cepa potencialmente útil en aplicaciones a nivel comercial.

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

- ✓ Verificación de la amplia flexibilidad metabólica de la especie *A. copahuensis*
- ✓ Caracterización morfológica de los cultivos *A. copahuensis* desarrollados con distintas fuentes de energía
- ✓ Verificación de la adhesión y visualización de biofilms sobre diversas superficies minerales y en distintas condiciones
- ✓ Caracterización de la producción y composición de los EPS producidos por *A. copahuensis* en distintas condiciones metabólicas

- ✓ Vinculación de los procesos de adhesión, colonización y formación de biofilms con la actividad biolixivante de *A. copahuensis*
- ✓ Verificación de la adhesión y actividad biolixivante de *A. copahuensis* y *S. metallicus* utilizando minerales previamente colonizados
- ✓ Comprobación de interacciones antagónicas entre diferentes especies de arqueas
- ✓ Biolixiviación de un mineral regional de cinc con *A. copahuensis*, obteniendo recuperaciones cercanas al 100%
- ✓ Biolixiviación de un mineral refractario de cobre con *A. copahuensis*, logrando una recuperación del 100%

PERSPECTIVAS FUTURAS GENERADAS POR ESTE TRABAJO DE TESIS

A partir de los estudios y discusiones presentadas en esta Tesis Doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en tres direcciones.

En un primer lugar estarían los trabajos destinados a completar los aspectos de caracterización mostrados. Concretamente, la presencia de apéndices celulares en una especie perteneciente al género *Acidianus* fue demostrada por primera vez en este trabajo de tesis. Sin embargo, las características y funciones de estos apéndices son aún desconocidas. Resulta interesante el estudio de estas estructuras que podrían intervenir en procesos de adhesión sobre superficies sólidas o en la transferencia de electricidad a escala nanométrica (*nanowires*). También es de interés continuar con el estudio fisiológico de comunidades planctónicas y sésiles, que en este trabajo mostraron comportamientos distintos, con el objetivo de comparar de la toxicidad de diferentes metales o de diferentes iones y la influencia de la deshidratación y salinidad sobre las células libres y sobre los biofilms.

En segundo lugar, se encontrarían los trabajos orientados a estudiar la interacción entre distintas especies de arqueas, así como también entre especies de arqueas y bacterias. En los que se incluyen los estudios de los posibles fenómenos de QS durante la formación de biofilms en arqueas, mediante la búsqueda de autoinductores en los cultivos de especies de arqueas. También resulta de interés, determinar el efecto de autoinductores y de inhibidores de quórum sensing reconocidos para bacterias sobre la formación de biofilms en arqueas. Otro aspecto

importante es estudiar la posible producción y el efecto de toxinas del tipo sulfolobocinas en otras especies de arqueas.

Finalmente, debido a que la utilización de *A. copahuensis* en procesos de biolixiviación resultó muy eficaz, sería interesante continuar con estudios sobre su aplicación en procesos de biolixiviación y biooxidación utilizando otros minerales y condiciones.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA VINCULADA CON ESTE TRABAJO DE TESIS

A partir del presente Trabajo de Tesis Doctoral surgieron las siguientes publicaciones científicas:

- ✓ Improving zinc recovery by the thermoacidophilic archaeon *Acidianus copahuensis* using tetrathionate
Castro C., Donati E.
Transaction of Nonferrous Metals Society of China. Aceptado

- ✓ Effects of different energy sources on cell adhesion and bioleaching of a chalcopyrite concentrate by extremophilic archaeon *Acidianus copahuensis*
Castro C., Donati E.
Hydrometallurgy. 2016 162:49-56

- ✓ Draft Genome Sequence of the Novel Thermoacidophilic Archaeon *Acidianus copahuensis* Strain ALE1, Isolated from the Copahue Volcanic Area in Neuquén, Argentina
Urbieta S., Rascovan N., **Castro C.**, Revale S., Giaveno A., Vázquez M., Donati E.
Genome Announcements. 2014 2(3): e00259-14

- ✓ Visualization of attachment and colonization of pyrite surfaces by a novel species of *Acidianus*
Castro C., Vera M., Donati E., Sand W.
Advanced Material Research. 2013 825:70

- ✓ Biofilm formation and interspecies interactions in mixed cultures of the thermoacidophilic archaea *Acidianus* spp. and *Sulfolobus metallicus*

Castro C., Zhang, R., Liu, J., Bellenberg, S., Neu, T.R., Donati, E., Sand, W., Vera, M.

Research in Microbiology. En evaluación

Anexos

ANEXO I

Medios de cultivo

Medio 88 (M88)

El medio de cultivo denominado medio 88, es un medio de cultivo líquido recomendado por la colección de cultivos alemana DSMZ (<http://dsmz.de/media/media88.htm>).

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 los sustratos orgánicos (glucosa, extracto de levadura, etc) como las 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)	Componentes	(mg/L)
(NH₄)₂SO₄	1,30	ZnSO₄·7H₂O	0,22
KH₂PO₄	0,28	CuSO₄·7H₂O	0,08
MgSO₄·7H₂O	0,25	Na₂MoO₄·2H₂O	0,01
CaCl₂·2H₂O	0,07	VaSO₄·2H₂O	0,01
FeCl₃·6H₂O	0,02	CoSO₄·7H₂O	0,02
Extracto de levadura	1,00	Na₂B₄O₇·10H₂O	4,50
		MnSO₄·H₂O	1,53

Medio Mackintosh (MAC)

En la Tabla 2 se detalla la composición del medio de cultivo MAC (Mackintosh, 1978). Se preparó mediante disolución de las sales y posterior esterilización por calor húmedo a 121 °C y 1 atm de sobrepresión durante 20 min.

Tanto los sustratos orgánicos (glucosa, extracto de levadura, etc) como las otras fuentes de energía utilizadas, fueron esterilizados por separado y se adicionaron al medio de cultivo en el momento de efectuar la dilución correspondiente.

Tabla 2. Componentes del medio MAC

Componentes	(mM)	Componentes	(μ M)
(NH₄)₂SO₄	1,00	ZnCl₂	0,5
KH₂PO₄	0,20	MnCl₂	0,5
CaCl₂.2H₂O	1,00	CoCl₂	0,5
		H₂BO₃	0,5
		Na₂MoO₄	0,05
		CuCl₂	0,05
		MgSO₄	125

ANEXO II

Métodos analíticos

Determinación de la población celular

En todas las experiencias se utilizó un microscopio equipado con dispositivo de contraste de fase y una cámara de conteo celular Thoma.

Procedimiento: La cámara cargada se colocó en el microscopio y el recuento se realizó una vez que el preparado se estabilizó. La cámara Thoma está construida de manera tal que pueden observarse 16 celdas con una dimensión unitaria de $0,0025 \text{ mm}^2$ de superficie y $0,02 \text{ mm}$ de profundidad. Se realizó el recuento celular en 5 celdas no contiguas. Luego, el total de células se dividió por el volumen total de dichas celdas a fin de obtener el resultado expresado como células/mL.

Cálculos:

$$\text{volumen de celda} = (0,02 \times 0,0025) \text{ mm}^3 = 5 \times 10^{-5} \text{ mm}^3 = 5 \times 10^{-8} \text{ mL}$$

$$\text{células/mL} = \text{células contadas} \times 2 \times 10^8 / (5 \times 16)$$

$$\text{células/mL} = \text{células contadas} \times 2,5 \times 10^6$$

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

Determinación de Fe(II) mediante el método colorimétrico de la o-fenantrolina

El método espectrofotométrico 1,10-fenantrolina fue utilizado para determinar hierro(II) en concentraciones menores a 2 g/L .

Preparación de reactivos

- Buffer Acetato de amonio: se pesaron 250 g de acetato de amonio y se colocaron en un vaso de 1 L. Se añadieron 150 mL de agua destilada, 700 mL de ácido acético glacial y se colocó en agitación bajo campana. Una vez disuelto se transfirió a una botella limpia color caramelo para preservarlo.
- Solución de 1-10 fenantrolina monohidratada: se pesaron 100 mg de 1-10 fenantrolina monohidratada y se añadieron a un matraz de 100 mL conteniendo un volumen de agua y 2 gotas de HCl concentrado. Se transfirió a un vaso de precipitado y se mantuvo en agitación hasta su total disolución. La solución se colocó nuevamente en el matraz y se llevó hasta el aforo con agua destilada.
- Patrón de hierro(II) - 500 ppm: Se pesó en una balanza analítica 0,3502 g de sal de Mohr la cual se colocó en un matraz de 100 mL conteniendo agua destilada y 2 gotas de HCl concentrado. Se transfirió a un vaso de precipitado y se mantuvo en agitación hasta su total disolución. La solución se puso nuevamente en el matraz y se llevó hasta el aforo con agua destilada.

Preparación de las muestras

En un tubo de vidrio de 5 mL se colocó un volumen entre 0,1 y 0,3 mL de muestra dependiendo de la concentración de hierro(II) presente. Se agregó un volumen entre 1,4-1,2 mL de HCl 1:20 (dependiendo de la cantidad de muestra) hasta alcanzar un volumen de 1,5 mL. Luego se colocaron 0,5 mL del buffer acetato y finalmente 0,5 mL de la solución de fenantrolina. Los tubos se taparon y agitaron en vórtex para homogenizar su contenido. Se dejaron reposar durante 15 min al reparo de la luz y se midió en un espectrofotómetro a una longitud de 510 nm.

La solución de orto fenantrolina se preparó en cada oportunidad, lo mismo que el patrón de hierro. A partir de la solución de 500 ppm se hizo una dilución 1:10 y se construyó la curva de calibración.

Espectrofotometría de absorción atómica

La espectrofotometría de absorción atómica con llama es un método analítico para la determinación cuantitativa de elementos, basado en la absorción luminosa específica por átomos libres en estado fundamental.

Al introducir una solución de un elemento metálico, en forma de niebla (pequeñas gotitas) en el seno de una llama adecuada ocurren los siguientes procesos: volatilización del solvente; el soluto desolvatado funde; el soluto se volatiliza; el soluto se disocia total o parcialmente para formar un vapor atómico. Estos átomos libres, que se encuentran en el estado fundamental, pueden pasar al primer estado excitado absorbiendo luz de determinada longitud de onda (λ), la cual es característica del elemento y del salto energético.

Si la llama es adecuada, las condiciones de la misma hacen que la mayor parte de los átomos que constituyen el vapor atómico se encuentren en el estado fundamental y sean capaces de absorber la radiación característica.

En espectrofotometría de absorción atómica, se utiliza la primera línea de resonancia que es la que conduce al primer estado excitado ya que es la más sensible. Se pueden usar otras menos sensibles cuando el elemento a determinar se encuentra en mayores proporciones.

Cuando un haz de luz monocromático (de longitud de onda correspondiente a la línea de resonancia de un elemento) se hace pasar a

través de la llama, la intensidad del haz decrecerá como resultado de la absorción, si es que en el paso de la luz se encuentran átomos del elemento. La absorción de la luz es proporcional a la concentración de los átomos en la llama, por lo que puede utilizársela como una medida de la concentración del elemento.

Con respecto a las medidas, debe construirse primero la curva de calibración con patrones que contengan cantidades conocidas del elemento a determinar. Luego se regula la lectura del instrumento en 0,00 de absorbancia mientras se nebuliza agua destilada (el solvente o el blanco). A continuación se nebulizan los patrones en orden creciente de concentración y, por último, las muestras. La interpolación de la curva de calibración con los valores de absorbancia correspondiente a las muestras, permite obtener sus valores de concentración. A continuación, se indican las condiciones de operación del equipo para la determinación de cada uno de los metales

Cobre:

Lámpara de Cu de cátodo hueco

Longitud de onda: 324,8nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 6mA

Ranura: 0,5nm.

Cinc:

Lámpara de Zn de cátodo hueco

Longitud de onda: 213,9nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 8ma

Ranura: 0,5nm.

Hierro:

Parámetros instrumentales:

Lámpara de Fe de cátodo hueco

Longitud de onda: 248,3nm.

Combustible: acetileno

Oxidante: aire

Corrección de background: si

Corriente de lámpara: 10ma

Ranura: 0,5nm.

ANEXO III

Técnicas microscópicas

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La caracterización ultraestructural y morfológica de los cultivos se realizó utilizando microscopia electrónica de transmisión (TEM). Se obtuvieron células planctónicas de los diferentes cultivos mediante centrifugación (8000 g durante 10 min) y lavado con medio de cultivo estéril, hasta obtener un pellet de aproximadamente 2 mm³. Las muestras fueron fijadas con 500 µL de solución fijadora (glutaraldehído 2% en buffer PBS) e incubadas a 4 °C durante 2 h. Luego de la incubación, se eliminó la solución fijadora y las muestras fueron lavadas con PBS (3 veces durante 30 min) para eliminar el exceso de fijador.

Las muestras fueron remitidas al Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, en donde se realizó la posfijación con tetróxido de osmio al 1% en solución buffer, la deshidratación, inclusión e infiltración en la resina y los cortes ultrafinos con un ultramicrotomo Supernova, Reichert-Jung. Antes de la observación por TEM se realizó la tinción de los cortes utilizando una solución de acetato de uranilo. De cada muestra, se tomaron imágenes representativas a distintas magnificaciones. El equipo utilizado fue un Microscopio Electrónico de Transmisión, marca JEOL JEM 1200EX II TEM.

Para la tinción negativa se utilizó el mismo protocolo, pero las células se observaron en suspensión y no se realizaron los pasos de pos fijación, etc. La suspensión conteniendo las bacterias fue teñida con solución de acetato de uranilo y observada por TEM.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras de minerales y cultivos 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.

Las muestras fueron almacenadas a 4 °C y remitidas al Servicio de Microscopía Electrónica de Bahía Blanca (CCT Bahía Blanca-CONICET) donde fueron secadas 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.

De cada muestra, se tomaron imágenes representativas a distintas magnificaciones. El equipo utilizado fue un Microscopio Electrónico de Barrido, marca LEO EVO 40 XVP SEM.

Microscopía de epifluorescencia (EFM)

La adhesión celular y formación de biofilms fue visualizada mediante microscopía de epifluorescencia utilizando sondas fluorescentes. Previo a la tinción, las muestras de mineral y azufre fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril para su neutralización. Las muestras fueron cubiertas e incubadas durante 10 min en oscuridad con una solución de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) 0,01% (p/V) en 2% formaldehído, o Syto 9 6 µM. Estos compuestos se unen específicamente a las moléculas de ADN y ARN, permitiendo la visualización de las células fluorescentes. Luego de la

incubación las muestras fueron lavadas nuevamente con agua destilada estéril para remover el exceso de la solución de tinte. Opcionalmente, los EPS fueron teñidos con lectinas conjugadas a tetrametilrodamina (TRITC) o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para esta tinción, las muestras fueron cubiertas con una solución de lectina de 50 µg/mL e incubadas durante 30 min en oscuridad. Posteriormente las muestras fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril filtrada para eliminar el exceso de lectina. Las muestras fueron cubiertas con Citifluor para prevenir la pérdida de fluorescencia. Finalmente las muestras fueron montadas sobre cubreobjetos y visualizadas utilizando un Microscopio de Epifluorescencia, marca Zeiss® Axiomager A1m.

En el caso de células planctónicas, muestras de cultivos fueron filtradas a través de membranas de policarbonato (0,22 µm de diámetro de poro) para retener las células. Luego se utilizaron porciones de membrana para realizar las tinciones, previamente detalladas.

Microscopía confocal de barrido láser (CLSM)

Las muestras fueron preparadas del mismo modo y utilizando los mismos fluorocromos que para microscopía de epifluorescencia.

La examinación de las muestras teñidas fue realizada con un microscopio Axiovert 100 MBP, acoplado a un módulo laser LSM 510 Carl Zeiss® Jena.

Bibliografía

- Abdollahi, H., Shafaei, S.Z., Noaparast, M., Manafi, Z., Niemelä, S.I., Tuovinen, O.H., 2014. Mesophilic and thermophilic bioleaching of copper from a chalcopyrite-containing molybdenite concentrate. *Int. J. Miner. Process.* 128, 25–32.
- Africa, C.J., van Hille, R.P., Sand, W., Harrison, S.T.L., 2013. Investigation and in situ visualization of interfacial interactions of thermophilic microorganisms with metal-sulphides in a simulated heap environment. *Miner. Eng.* 48, 100–107.
- Afzal Ghauri, M., Okibe, N., Johnson, D.B., 2007. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: The significance of species and strain variations. *Hydrometallurgy* 85, 72–80.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., San Martín-Úriz, P., Amils, R., 2008. Extracellular matrix assembly in extreme acidic eukaryotic biofilms and their possible implications in heavy metal adsorption. *Aquat. Toxic.* 88, 257–266.
- Ahmadi, A., Mousavi, S.J., 2015. The influence of physicochemical parameters on the bioleaching of zinc sulfide concentrates using a mixed culture of moderately thermophilic microorganisms. *Int. J. Min. Process.* 135, 32–39.
- Albers, S.-J., Meyer, B.H., 2011. The archaeal cell envelope. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 414–426.
- Alumbrera Limited, 2016. Disponible en www.alumbrera.com.ar
- Arsène-Ploetze, F., Koechler, S., Marchal, M., Coppée, J.Y., Chandler, M., Bonnefoy, V., Brochier-Armanet, C., Barakat, M., Barbe, V., Battaglia-Brunet, F., Bruneel, O., Bryan, C.G., Cleiss-Arnold, J., Cruveiller, S.,

- Erhardt, M., Heinrich-Salmeron, A., Hommais, F., Joulain, C., Krin, E., Lieutaud, A., Lièvreumont, D., Michel, C., Muller, D., Ortet, P., Proux, C., Siguier, P., Roche, D., Rouy, Z., Salvignol, G., Slyemi, D., Talla, E., Weiss, S., Weissenbach, J., Médigue, C., Bertin, P.N., 2010. Structure, function, and evolution of the *Thiomonas* spp. genome. PLoS Genet. 6: e1000859. doi: 10.1371/journal.pgen.1000859.
- Baker, B.J., Comolli, L.R., Dick, G.J., Hauser, L.J., Hyatt, D., Dilld, B.D., Land, M.L., VerBerkmoes, N.C., Hettich, R.L., Banfield, J.F., 2010. Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 8806–8811.
- Ballester, A., 2005. Mecanismos de biolixiviación. En: Acevedo, F., Gentina, J.C. (editores). Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, pp. 25–43.
- Barahona, S., Dorador, C., Zhang, R., Aguilar, P., Sand, W., Vera, M., Remonsellez, F., 2014. Isolation and characterization of a novel *Acidithiobacillus ferrivorans* strain from the Chilean Altiplano: attachment and biofilm formation on pyrite at low temperature. Res. Microbiol. 165, 782–793.
- Barreto, M., Gehrke, T., Harneit, K., Sand, W., Jedlicki, E., Holmes, D., 2005. Unexpected insights into biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* revealed by genome analysis and experimental approaches. En: Harrison, S.T.L., Rawlings, D.E., Petersen, J., (editors). Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium. Compress, Ciudad del Cabo, pp. 817–825.
- Bellenberg, S., Díaz, M., Noël, N., Sand, W., Poetsch, A., Guiliani, N., Vera, M., 2014. Biofilm formation, communication and interactions of leaching

- bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. Res. Microbiol. 165, 773–781.
- Bellenberg, S., Leon, C.F.M., Sand, M., Vera, M., 2012. Visualization of capsular polysaccharide induction in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Hydrometallurgy 129-130, 82–89.
- Bellon-Fontaine, N.-M., Rault, J., van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. Colloids Surf. B Biointerfaces 7, 47–53.
- Bevilaqua, D., Leite, A.L.L.C., Garcia O.Jr., Touvinen, O.H., 2002. Oxidation of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. Process Biochem. 38, 587–592.
- Blumenkrantz, N., Asobe-hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. Anal. Biochem. 54, 484–489.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Brierley, C.L., Brierley, J.A., 2013. Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 7543–7552.
- 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. Arch. Mikrobiol. 84, 54–68.
- Bromfield, L., Africa, C.J., Harrison, S.T.L., van Hille, R.P., 2011. The effect of temperature and culture history on the attachment of *Metallosphaera*

- hakonensis* to mineral sulfides with application to heap bioleaching. Miner. Eng. 24, 1157–1165.
- Cámara Argentina de Empresarios Mineros, 2016. Minería Argentina, todas las respuestas, minerales. Disponible en www.caem.com.ar
- Castro, L., Zhang, R., Muñoz, J.A., González, F., Blázquez, M.L., Sand, W., Ballester, A., 2014. Characterization of exopolymeric substances (EPS) produced by *Aeromonas hydrophila* under reducing conditions. Biofouling 30, 501–511.
- Chen M.-L., Zhang, L., Gu, G.-H., Hu, Y.-H., Su, L.-J., 2008. Effects of microorganisms on surface properties of chalcopyrite and bioleaching. Trans. Nonferrous Met. Soc. China 18, 1421–1426.
- Chiacchiarini, P., Lavalle, L., Giaveno, A., Donati, E., 2010. First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue-Caviahue system. Hydrometallurgy 104, 334-341.
- Chimileski, S., Dola, K., Naor, A., Gophna, U., Papke, T., 2014. Extracellular DNA metabolism in *Haloferax volcanii*. Front. Microbiol. 5:57. doi: 10.3389/fmicb.2014.00057.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties. Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. Enzyme Microb. Technol. 38, 237–245.
- Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008a. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part II: Effect of redox potential. Hydrometallurgy 93, 86–93.

- Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., 2008b. 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.
- Dahl, C., Prange, A., 2006. Bacterial sulfur globules: occurrence, structure and metabolism. En: Shively, J.M. (editor). *Inclusions in prokaryotes*, Springer, Heidelberg, pp. 21–51.
- Deveci, H., Akcil, A., Alp, I., 2004. Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. *Hydrometallurgy* 73, 293–303.
- Di Meglio, L., Busalmen, J.P., Pastore, J.I., Ballarín, V.L., Nercessian, D., 2014. Hyperhalophilic archaeal biofilms: growth kinetics, structure, and antagonistic interaction in continuous culture. *Biofouling* 30, 237–245.
- Diao, M., Taran, E., Mahler, S., Nguyen, T.A., Nguyen, A.V., 2014. Quantifying adhesion of acidophilic bioleaching bacteria to silica and pyrite by atomic force microscopy with a bacterial probe. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 115, 229–236.
- Donati E.R., Sand W. (Eds.), 2007. *Microbial processing of metal sulfides*, Springer, Dordrecht.
- Dong, Y., Lin, H., Xu, X., Zhou, S., 2013. Bioleaching of different copper sulfides by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its adsorption on minerals. *Hydrometallurgy* 140, 42–47.
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2079-2088.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Eichinger, I., Schmitz-Esser, S., Schmid, M., Fisher, C.R., Bright, M., 2014. Symbiont-driven sulfur crystal formation in a thiotrophic symbiosis from deep-sea hydrocarbon seeps. *Environ. Microbiol.* 6, 895-901.
- Farah, C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C., Guiliani, N., 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7033-7040.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623-633.
- Florian, B., Noël, N., Thyssen, C., Felschau, I., Sand, W., 2011. Some quantitative data on bacterial attachment to pyrite. *Miner. Eng.* 24, 1132-1138.
- 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 the sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5285-5292.
- Franz, B., Lichtenberg, H., Hormes, J., Modrow, H., Dahl, C., Prange, A., 2007. Utilization of solid "elemental" sulfur by the phototrophic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*: a sulfur-edge X-ray absorption spectroscopy study. *Microbiology* 153, 1268-1274.

- Freitas, F., Alves, V.D., Torres, C.A.V., Cruz, M., Sousa, I., Melo, M.J., Ramos, A.M., Reis, M.A.M., 2011. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. *Carbohydr. Polym.* 83, 159–165.
- Frolund, B., Suci, P.A., Langille, R.M., Weiner, G.G., 1996. Influence of protein conditioning films on binding of a bacterial polysaccharide adhesion from *Hyphomonas* MHS-3. *Biofouling* 10, 17–30.
- Gericke, M., Govender, Y., Pinches, A., 2010. Tank bioleaching of low-grade chalcopyrite concentrates using redox control. *Hydrometallurgy* 104, 414–419.
- Ghafoor A., Hay, I.D., Rehm, B.H.A., 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *App. Env. Microbiol.* 77, 5238–5246.
- Ghosh, B., Mukhopadhyay, B., Bairagya, H., 2012. Effect of amino acids on bioleaching of chalcopyrite ore by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 1991–1996.
- Giaveno, A., Lavallo, 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.
- Giaveno, M.A., Urbieta, M.S., Ulloa, J.R., González Toril, E., Donati, E.R., 2013. Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina. *Microb. Ecol.* 65, 336–346.

- 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. *Environ. Microbiol.* 7, 1277-1288.
- Gómez, C., Blázquez, M.L., Ballester, A., 1999. Bioleaching of a Spanish complex sulphide ore bulk concentrate. *Miner. Eng.* 12, 93-106.
- Gorlas, A., Marguet, E., Gill, S., Geslin, C., Guigner, J.-M., Guyot, F., Forterre, P., 2015. Sulfur vesicles from Thermococcales: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie* 118, 356-364.
- Haghshenas, D.F, Alamdari , E.K., Bonakdarpour, B., Darvishi, D., Nasernejad, B., 2009. Kinetics of sphalerite bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 99, 202-208.
- Harneit, K., Goksel K., 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.
- He, H., Yang, Y., Xia, J.-I., Ding, J.-N., Zhao, X.-J., Nie, Z.-Y., 2008. Growth and surface properties of new thermoacidophilic archaea strain *Acidianus manzaensis* YN-25 grown on different substrates. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 18, 1374-1378.
- He, Z., Gao, F., Zhong, H., Hu, Y., 2009. Effects of L-cysteine on Ni-Cu sulfide and marmatite bioleaching by *Acidithiobacillus caldus*. *Bioresour. Technol.* 100, 1383-1387.
- He, Z.-G., Yang, Y.-P., Zhou, S., Hu, Y.-H., Zhong, H., 2014. Effect of pyrite, elemental sulfur and ferrous ions on EPS production by metal sulfide bioleaching microbes. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 24, 1171-1178.

- He, Z.-G., Zhao, J.-C., Liang, W.-J., Hu, Y.-H., Qiu, G.-Z., 2011. Effect of L-cysteine on bioleaching of Ni-Cu sulphide by *A. manzaensis*. J. Cent. South Univ. Technol. 18, 381–385.
- Hu, Y.-H., He, Z.-G., Hu, W., Peng, H., Zhong, H., 2004. Effect of two amino acids on bioleaching metal sulfide. Trans. Nonferrous Met. Soc. China 14, 794–797.
- Hubber, G., Stetter, K.O., 1991. *Sulfolobus metallicus*, sp. Nov., a novel strictly chemolithoautotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. Syst. Appl. Microbiol. 14, 372–378.
- Huber H., Prangishvili D., 2004. *Sulfolobales*. En: Dworkin, M. (editor). The Prokaryotes: an evolving resource for the microbiological community, Springer-Verlag, New York, pp. 1994–2004.
- Huber, G., Spinnler, C., Gambacorta, A., Stetter, K., 1989. Metallosphaera sedula gen. and sp. Nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacterial. Syst. Appl. Microbiol. 12, 38–47.
- Huber, H., Küper, U., Daxer, S., Rachel, R., 2012. The unusual cell biology of the hyperthermophilic Crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis*. Antonie Van Leeuwenhoek 102, 203–219.
- International Copper Study Group, 2016. Disponible en www.icsg.org
- International Lead and Zinc Study Group, 2016. February 2015 Zinc - Annual Review 2014. Disponible en www.ilzsg.org.
- International Zinc Association, 2016. Disponible en www.zinc.org
- Jahn, U., Gallenberger, M., Junglas, B., Eisenreich, W., Stetter, K.O., Rachel, R., Huber, H., 2008. *Nanoarchaeum equitans* and *Ignococcus hospitalis*:

- new insights into a unique, intimate association of two archaea. *J. Bacteriol.* 190, 1743–1750.
- Jerez, C.A., 2011. Bioleaching and Biomining for the Industrial Recovery of Metals. En: Murray, M.Y. (editor). *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, pp. 717–729.
- Johnson D.B., Hallberg K.B., 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 154, 466-473.
- Johnson, D.B., 2014. Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr. Opin. Biotec.* 30, 24–31.
- Kletzin, A., 2008. Oxidation of sulfur and inorganic sulfur compounds in *Acidianus ambivalens*. En: Dahl, C., Friedrich, C.G. (editors). *Microbial sulfur metabolism*. Springer, Berlin, pp. 184–201.
- Koerdt, A., Gödeke, J., Berger, J., Thormann, K.M., Albers, S.V., 2010. Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *Plos One* 5(11), e14104.
- Konishi, Y., Tokushige, M., Asai, S., Suzuki, T., 2001. Copper recovery from chalcopyrite concentrate by acidophilic thermophile *Acidianus brierleyi* in batch and continuous-flow stirred tank reactors. *Hydrometallurgy* 59, 271–282.
- Lamarche, M.G., Wanner, B.L., Crepin, S., Harel, J., 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 461–473.

- 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.
- Levenspiel O., 1986. Ingeniería de las reacciones químicas. Reverté S.A., Barcelona.
- Li, L., Lv, Z., Yuan, X., 2013. Effect of L-glycine on bioleaching of collophanite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 156–165.
- Li, L., Zhong, H., Hu, Y., Zhao, J., He, Z., Gu, G., 2014. Bioleaching of a low-grade nickel-copper sulfide by mixture of four thermophiles. *Bioresour. Technol.* 153, 300–306.
- Li, Y., Kawashima, J., Li, J., Chandra, A.P., Gerson, A.R., 2013. A review of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite. *Adv. Colloid Interface Sci.* 197–198, 1–32.
- Liang, C.L, Xia, J.L, Nie, Z.Y, Shu, S.J., Xu, B.Q., 2014. Effect of initial pH on chalcopyrite oxidation dissolution in the presence of extreme thermophile *Acidianus manzaensis*. *T. Nonferr. Metal. Soc.* 24, 1890–1897.
- Liu, L.-J., You, X.-Y., Guo, X., Liu, S.-J., Jiang, C.-Y., 2011. *Metallosphaera cuprina* sp. nov., an acidothermophilic, metal-mobilizing archaeon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2395–2400.
- Liu, Y., Beer, L.L., Whitman, W.B., 2012. Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. *Env. Microbiol.* 14, 2632–2644.
- Logan, M.A.V., 2000. Mineralogy and geochemistry of the Gualilán skarn deposit in the Precordillera of western Argentina. *Ore Geology Reviews* 17, 113–138.

- Marchevsky, N., Urbieta, M.S., Bernardelli, C., Mas, M., Donati, E.R., 2015. Zinc recovery during refractory ore biooxidation by an indigenous consortium. *Int. J. Miner. Process.* 138, 30–37.
- Mehrabani, J.V., Shafaei, S.Z., Noaparast, M., Mousavi, S.M., Rajaei, M.M., 2013. Bioleaching of sphalerite sample from Kooshk lead-zinc tailing dam. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 23, 3763–3769.
- Meyer, B.H., Albers, S-V., 2013. Hot and sweet: protein glycosylation in Crenarchaeota. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 384–392.
- Mishra M., Singh S., Das T., Kar R.N., Rao K.S., Sukla L.B., Mishra B.K., 2008. Bio-dissolution of copper from Khetri lagoon material by adapted strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Korean J. Chem. Eng.* 25, 531–534.
- Müller, F.H., Bandejas, T.M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M., Kletzin, A., 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate: quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* 53, 1147–1160.
- Natarajan, K.A., Das, A., 2003. Surface chemical studies on '*Acidithiobacillus*' group of bacteria with reference to mineral flocculation. *Int. J. Miner. Process.* 72, 189–198.
- Navarro, C.A., von Bernath, D., Jerez, C.A., 2013. Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biol. Res.* 46, 363–371.
- Neu, T.R., Swerhone, G.D.W., Lawrence J.R., 2001. Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiol.* 147, 299–313.

- Noël, N., 2013. Attachment of acidophilic bacteria to solid substrata. Tesis doctoral, Aquatische Biotechnologie, Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen.
- O'Connor, E.M., Shand, R.F., 2002. Halocins and sulfolobocins: The emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 23-31.
- Orell, A., Fröls, S., Albers, S.-V., 2013. Archaeal Biofilms: The Great Unexplored. *Annu. Rev. Microbiol.* 67, 337–354.
- Orell, A., Navarro, C.A., Rivero, M., Aguilar, J.S., Jerez, C.A., 2012. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their posible functions. *Extremophiles* 16, 573–583.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79.
- Pachón, 2016. Disponible en www.elpachon.com.ar
- Paggi, R.A., Martone, C.B., Fuqua, C., De Castro, R.E., 2003. Detection of quorum sensing signals in the haloalkalophilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 49–51.
- Pecina, T., Franco, T., Castillo, P., Orrantia, E., 2008. Leaching of a zinc concentrate in H₂SO₄ solutions containing H₂O₂ and complexing agents. *Miner. Eng.* 21, 23–30.
- Peltola, M., Neu, T.R., Raulio, M., Kolari, M., Salkinoja-Salonen, M.S., 2008. Architecture of *Deinococcus geothermalis* biofilms on glass and steel: a lectin study. *Environ. Microbiol.* 10, 1752–1759.
- Petersen, J., Dixon, D.G., 2006. Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite. *Hydrometallurgy* 83, 40–49.

- Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J.K., Zillig, W., 2000. Sulfolobocins, Specific Proteinaceous Toxins Produced by Strains of the Extremely Thermophilic Archaeal Genus *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* 182(10), 2985-2988.
- Protze, P., Müller, F., Lauber, K., Naß, B., Mentele, R., Lottspeich, F., Kletzin, A., 2011. An extracellular tetrathionate hydrolase from the thermoacidophilic archaeon *Acidianus ambivalens* with an activity optimum at pH 1. *Front. Microbiol.* 2, 68–12.
- Rawlings, D.E., Johnson, D.B., 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiol.* 153, 315–324.
- Remonsellez, F., Orell, A., Jerez, C.A., 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiol.* 152, 59–66.
- Rijnaarts, H.H.M., Nordeb, W., Lyklemab, J., Zehnder, A.J.B., 1995. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 4, 191–197.
- Rivas, M., Seeger, M., Jedlicki, E., Holmes, D.S., 2007. Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3225–3231.
- Rodríguez, Y., Ballester, A; Blázquez M.L., González, F., Muñoz, J.A., 2003a. Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite and sphalerite. *Geomicrobiol. J.* 20, 131–141.

- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, F., Muñoz, J.A., 2003b. New information on the sphalerite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71, 57–66.
- Rodríguez, Y., Ballester, A.; Blázquez M.L., González, F., Muñoz, J.A., 2003c. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71, 47–56.
- Rojas-Chapana, J.A., Tributsch, H., 2000. Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. *Process Biochem.* 35, 815–824.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33.
- Sandy, Y.M., Zolghadr, B., Driessen, A.J.M., Albers, S.-J., Jarell, F., 2008. Cell Surface Structures of Archaea. *J. Bacteriol.* 190, 6039–6047.
- Schippers, A., Hedrich, S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W., Willscher, S., 2014. Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 144, 1-47.
- Schopf, S., Wanner, G., Rachel, R., Wirth, R., 2008. An archaeal bi-species biofilm formed by *Pyrococcus furiosus* and *Methano pyruskandleri*. *Arch. Microbiol.* 190, 371–377.
- Seegerer, A., Neuner, A., 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 archaeobacterial. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 559–564.
- Seufferheld, M.J., Alvarez, H.M., Farias, M.E., 2008. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 867–874.

- Shand, R.F., Leyva, K., 2007. Peptide and Protein Antibiotics from the Domain Archaea: Halocins and Sulfolobocins. En: Riley MA, Chavan MA (Eds), *Bactericins: Ecology and Evolution*, Springer, Berlin, pp 93-109.
- Sharma, P.K., Dasb, A., Hanumantha Raoa, K., Forssberg, K.S.E., 2003. Surface characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown under different conditions. *Hydrometallurgy* 71, 285–292.
- Shiers, D.W., Ralph, D.E., Bryan, C.G., Watling, H.R., 2013. Substrate utilization by *Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera hakonensis* and *Sulfolobus metallicus* in mixed ferrous ion and tetrathionate growth media. *Minerals Engineering* 48, 86–93.
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 199–210.
- United States Geological Survey (USGS). Mineral Industry Survey, 2015. Disponible en www.minerals.usgs.gov
- Urbietta, M.S., González Toril, L., Aguilera, A., Giaveno, M.A., Donati, R., 2012. First prokaryotic biodiversity assessment using molecular techniques of an acidic river in Neuquén, Argentina. *Microb. Ecol.* 64, 91-104.
- Urbietta, M.S., Rascovan, N., Castro, C., Revale, S., Giaveno, M.A., Vazquez, M., Donati, E.R., 2014. Draft genome sequence of the novel thermoacidophilic archaeon *Acidianus copahuensis* strain ALE1, isolated from the Copahue volcanic area in Neuquén, Argentina. *Genome Announc.* 2, doi:10.1128/genomeA.00259–14.
- Vera, M., Schippers, A., Sand, W., 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7529-7541.

- Vilcáez, J., Suto, K., Inoue, C., 2008. Response of thermophiles to the simultaneous addition of sulfur and ferric ion to enhance the bioleaching of chalcopyrite. *Miner. Eng.* 21, 1063–1074.
- Vilcáez, J., Yamada, R., Inoue, C., 2009. Effect of pH reduction and ferric ion addition on the leaching of chalcopyrite at thermophilic temperatures. *Hydrometallurgy* 96, 62–71.
- Wang, Y., Zeng, W., Chen, Z., Su, L., Zhang, L., Wan, L., Qiu, G., Chen, X., Zhou, H., 2014. Bioleaching of chalcopyrite by a moderately thermophilic culture at different conditions and community dynamics of planktonic and attached populations. *Hydrometallurgy* 147–148, 13–19.
- Watling, H.R., 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – A review. *Hydrometallurgy* 84, 81–108.
- Watling, H.R., 2013. Chalcopyrite hydrometallurgy at atmospheric pressure: 1. Review of acidic sulfate, sulfate–chloride and sulfate–nitrate process options. *Hydrometallurgy* 140, 163–180.
- Weisener, C. G., Smart, R. S. C., Gerson, A. R., 2004. A comparison of the kinetics and mechanism of acid leaching of sphalerite containing low and high concentrations of iron. *Int. J. Miner. Process.* 74, 239–249.
- Wheaton, G., Counts, J., Mukherjee, A., Kruh, J., Kelly, R., 2015. The confluence of heavy metal biooxidation and heavy metal resistance: implications for bioleaching by extreme thermoacidophiles. *Minerals* 5, 397–451.
- Xia, J-I, Zhao, X-J, Liang, C-L, Yang, Y, Nie, Z-Y, Tang, L., Ma, C-Y, Zheng, L., Zhao, Y-D, Qiu G-Z., 2012. Sulfur speciation transformation during bioleaching of pyrite-containing sphalerite concentrate by

- thermophile *Sulfolobus metallicus* at 65 °C. Journal of Central South University of Technology 19, 1961–1966.
- Xiang, X-X, Gu, G-H, Ban, J-R, Li, S-K, 2015. Bioleaching and electrochemical property of marmatite by *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Trans. Nonferrous Met. Soc. China 25, 3103–3110.
- Zerulla, K., Chimileski, S., Nather, D., Gophna, U., Papke, R.T., Soppa, J., 2014. DNA as a phosphate storage polymer and the alternative advantages of polyploidy for growth or survival. PLoS ONE 9: e94819. doi:10.1371/journal.pone.0094819.
- Zhang, G., Zhang, F., Ding, G., Li, J., Guo, X., Zhu, J., Zhou, L., Cai, S., Liu, X., Luo, Y., Zhang, G., Shi, W., Dong, X., 2012. Acyl homoserine lactone-based quorum sensing in a methanogenic archaeon. ISME J. 6, 1336-1344.
- Zhang, R., Bellenberg, S., Castro, L., Neu, T.R., Sand, W., Vera, M., 2014. Colonization and biofilm formation of the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum*. Hydrometallurgy 150, 245–252.
- Zhang, R., Neu, T.R., Zhang, Y., Bellenberg, S., Kuhlicke, U., Li, Q., Sand, W., Vera, M., 2015. Visualization and analysis of EPS glycoconjugates of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 7343–7356.
- Zhao, H., Wang, J., Yang, C., Hu, M., Gan, X., Tao, L., Qin, W., Qiu, G., 2015. Effect of redox potential on bioleaching of chalcopyrite by moderately thermophilic bacteria: An emphasis on solution compositions. Hydrometallurgy 151, 141–150.

Zhu, J.Y., Yang, P., Li, B.M., Zhang, J.X., Huang, Q.X., 2008. Microcalorimetric studies of interaction between extracellular polymeric substance and sulfide minerals. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* 18, 1439–1442.

Zolghadr, B., Klingl, A., Koerdt, A., Driessen, A.J., Rachel, R., Albers, S.-V., 2010. Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 192, 104–110.