

Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica

BACTERIA ISOLATION FROM ACID DRAINAGE WATERS AT THE SURROUNDINGS OF RECUPERADA AND JULCANI MINING UNITS, HUANCAVELICA

Vladimir Arias A.¹, Carlos Rodríguez V.¹, Pablo Ramírez R.², Eduardo Nonones V.³, Danica Salazar I.³ Juan Gil R., Jackelyn Paredes R.³, Gustavo Jamanca L.⁴

RECIBIDO: 12/12/2012 – APROBADO: 25/02/2013

RESUMEN

Los efluentes de roca y de mina son caracterizados por su acidez y contenido de metales disueltos, por lo general son hábitat natural de bacterias del género *Acidithiobacillus* y *Thiooxidans*, bacterias ampliamente estudiadas por su importancia en la biooxidación de minerales y capaces de obtener energía de la catálisis oxidativa de compuestos de azufre, hierro y sulfuros metálicos. Las muestras de estudio provienen de la región Huancavelica de las inmediaciones de las unidades mineras de Julcani y Recuperada; lográndose el aislamiento en medios líquido 9k modificado y sólido de agar FeO e identificado mediante microscopía óptica la presencia de un consorcio de bacterias oxidantes acidófilas. La contrastación de estos resultados se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa a un 98% de probabilidad.

Palabras clave: aislamiento de bacterias, tinción Gram, medios de cultivo, , caracterización morfológica

ABSTRACT

Rock mass and mine effluents are characterized by acidity and contents of dissolved metal. This environment is usually natural habitat of *Acidithiobacillus* *Ferrooxidans* and *Thiooxidans* bacteria genus, widely studied for their intervention in the bio oxidation of minerals and also their capacity of obtaining energy from the oxidative catalysis of sulfur and iron compounds and metal sulfides. Samples for study come from Recuperada and Julcani mining units surroundings in Huancavelica Region. Bacteria isolation in modified 9k liquid media and agar FeO solid was achieved. The identification of a consortium of oxidizing acidophilic bacteria was obtained by opticalmicroscopy. The contrasting of these results was performed at 98 percent probability, by chain reaction of the polymerase.

Keywords: bacteria isolation, Gram stain, growing substrates, , morphological characterization

1 Docente y responsable del Laboratorio de Biometalurgia, EAP Ingeniería Metalúrgica, UNMSM. E-mail: variasa@unmsm.edu.pe.
2 Docente y responsable del laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM. E-mail: pramirezr@unmsm.edu.pe.
3 Estudiantes de pregrado: Metalurgia, Química y Biología
4 Estudiante de posgrado en Ciencias con mención en Geometalurgia.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la biotecnología se ha convertido en una alternativa viable para el procesamiento de diversos materiales y derivados, una de sus áreas de desarrollo es la biohidrometalurgia, que se refiere a la oxidación de azufre elemental, y minerales sulfurados Cu, Pb, Zn, Fe, Ni mediante microorganismos de tipo acidófilas (Misari, Fidel; 1985), usándose también en el pretratamiento oxidante de menas de oro refractarias; tornándola disponible para los procesos subsecuentes, como la lixiviación con cianuro (Hernández, G. *et al.*, 1998), proceso alternativo y sostenible frente a la calcinación y oxidación por presión.

Los drenajes ácidos de mina (DAM) caracterizados por acidez extrema (pH 2.5-4.0) y altas concentraciones de metales pesados, contienen poblaciones nativas de bacterias oxidantes, responsables de la oxidación progresiva de los sulfuros. Dentro de los microorganismos encontrados en los ambientes ácidos y dentro de la familia de los **procariotas** se ha identificado las bacterias del género de *Thiobacillus*, *Leptospirillum* y *acidophilium* (Segura, D., 1998), capaces de contribuir en la degradación de sulfuros metálicos.

Las bacterias de género **thiobacillus** tienen gran avidez por compuestos sulfurados metálicos, obteniendo su fuente energética a partir de la oxidación de sulfuros reducidos y sales ferrosas (Jagnow, G; 2003) y en medio con temperatura moderada (mesófilos) y acidez en el rango de 0.5 a 4 pH, obteniendo crecimiento óptimo a pH entre 1.5 a 2.5.

Las bacterias de género **Leptospirillum** se desarrollan oxidando al hierro ferroso en compuestos férricos como la pirita (Hallberg, K; 2003). Este género de bacterias consideradas como aerobias estrictas se desarrollan en el rango 1.5 a 4.0 pH, están ampliamente distribuidas en depósitos de minerales alterados y en drenajes que se generan a través de ellos (Abanto, M; 2008).

Las bacterias del género **Acidophilium** son células de forma de bacilos rectos, Gram-negativos, mesófilas, quimiorganotrofas obligadas que se inhiben a partir de determinadas concentraciones de materia orgánica. Estas bacterias pueden vivir a condiciones anaeróbicas bajo el mecanismo de intercambio iónico de los compuestos de hierro favoreciendo la lixiviación de sulfuros de cobre.

En el género *Acidithiobacillus* se han estudiado las *Acidithiobacillus Thiooxidans*, *Acidithiobacillus Caldas* y *Acidithiobacillus Ferroxidans*; son caracterizadas por su evolución favorable a temperaturas entre 28 y 35 °C, utilizan CO₂ como fuente de carbono y obtienen energía de la oxidación del azufre, hierro y sulfuros metálicos. (Silverman, M. P., 1959 y Mena, J. *et al.*, 2003).

La *A. Ferroxidans* es la bacteria más ampliamente estudiada en procesos de biolixiviación. Aislada por primera vez de drenajes ácidos en minas de carbón (Colmer y Hinkle, 1947) y de hábitat común en drenajes ácidos de mina. Son bacterias no patógenas, Gram-negativas no forman esporulación, tiene forma de bastón y tamaño promedio de 0.5 a 0.6 µm de ancho y 1 a 2 µm de largo, con extremos redondeados (Panos 1996, Iglesias 1997, Rossi, 2001, Bosecker, 2001, Ho Lock 2004).

II. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

La evaluación morfológica de un consorcio de bacterias aisladas para su clasificación, está basada en observaciones microscópicas para determinar su forma, emparejamiento.

2.1. Identificación por tinción Gram

Una coloración diferencial ampliamente usada en bacteriología es la denominada tinción Gram y está en función a la adsorción de su pared celular, a una coloración de contraste (Gram positivas o negativas). Se utilizan colorantes para teñir las células y aumentar así su contraste facilitando su observación (Madigan, 2008). La respuesta celular de la bacteria a colorearse o no frente a un tinte orgánico específico. Un microorganismo Gram positivo debe presentar en su pared celular una capa de peptidoglicano externa a su membrana celular, a diferencia del Gram negativo, que tiene dos capas celulares entre las cuales se encuentra el peptidoglicano. La importancia del tipo de pared celular para la retención o el escape de un colorante orgánico.

Varias son las teorías emitidas para explicar el mecanismo de la tinción de Gram. basadas en la combinación química entre el colorante y las proteínas de las bacterias. Las proteínas y aminoácidos son cuerpos anfóteros, esto es, tienen la facultad de reaccionar con ácidos y con bases, gracias a sus grupos amino y carboxilo; en soluciones ácidas, reaccionan con los ácidos, y en soluciones alcalinas lo hacen con las bases (Segura D., 1998).

2.2. Mecanismo de tinción

1. Adicionar un colorante (cristal de violeta), este colorea a los microorganismos cargados negativamente por tratarse de un colorante básico.
2. Añadir el mordiente (lugol) para fijar el cristal de violeta. En las células Gram negativas, los lípidos de la pared se disuelven por este tratamiento facilitando su expulsión.
3. Luego se agrega el decolorante que es un solvente orgánico (alcohol-acetona). El alcohol y/o acetona empleados para aclarar, deshidrata las paredes de los microorganismos Gram positivos, tratados con mordiente.
4. Finalmente, se adiciona un contracolor (safranina) buscando contrastar con el cristal de violeta.

Una vez terminada la tinción de Gram, las bacterias Gram positivas aparecen de color morado mientras que las Gram negativas presentan color rosado (Figura N.º 1) estas diferencias en la tinción de Gram se debe a diferencias en la estructura de la pared celular. (Wistreich, G. A. *et al.*, 1983).

2.3. Medios de cultivo

Se ha desarrollado una gran variedad y tipos de medios de cultivo específicos dependiendo de las necesidades de cada bacteria para proveer el ambiente bioquímico adecuado. Los medios de cultivo son empleados para el aislamiento, mantenimiento de cultivos puros e identificación de bacterias, de acuerdo a sus propiedades bioquímicas y fisiológicas.

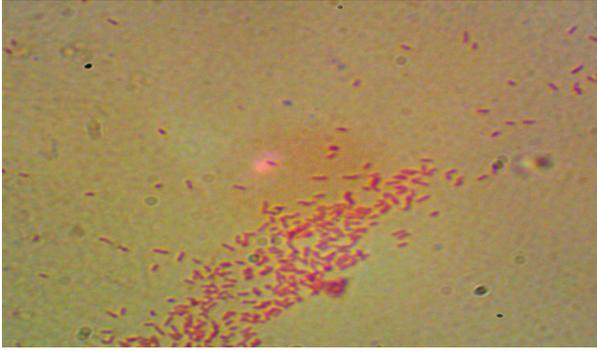


Figura N.º 1. Bacterias tipo Gram negativas, obtenidas a partir de soluciones ácidas.

Los medios de cultivo, 9k y T&K, son los medios más empleados para el crecimiento de los *Acidithiobacillus* (Barrie, J., 2006). Muchos autores concuerdan en que para este tipo de bacterias Ferroxidans (*Acidithiobacillus* y *Leptosirillum*), la obtención de cultivos a partir de minerales y soluciones pueden efectuarse usando el medio nutriente 9k líquido y sólido. (Álvarez, M. T., 2005).

Los medios líquidos son utilizados para el aislamiento y crecimiento de consorcios bacterianos, mientras que los medios sólidos son preferentemente utilizados para el aislamiento de cepas puras (Arias, V. y col., 2012).

III. DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Toma de muestras de drenajes ácidos emitidos por labores mineras con alta presencia de metales disueltos y acidez.
2. Aislamiento y generación del consorcio microbiano de organismos acidófilos mediante concentración progresiva en medio líquido.
3. Selección de la cepa bacteriana *Acidithiobacillus Ferroxidans* en medio sólido, por morfología de las colonias
4. Siembra de las colonias aisladas como *Acidithiobacillus Ferroxidans* en medio líquido.
5. Caracterización morfológica de la bacteria aislada mediante tinción Gram y observación microscópica.
6. Caracterización del crecimiento bacteriano por velocidad de oxidación y conteo manual de población bacteriana frente a la variación de pH y concentración de sulfato de hierro.

IV. MATERIALES Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

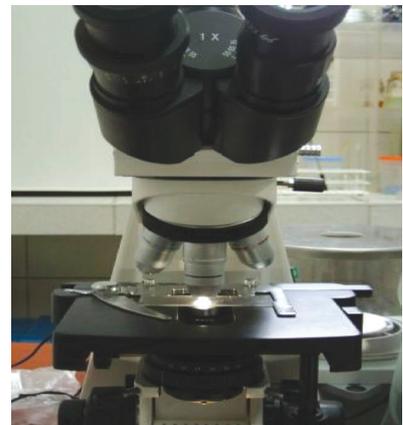
El laboratorio de Biometalúrgia de la EAP de Ingeniería Metalúrgica fue implementado con un mínimo de materiales y equipos básicos, a fin de satisfacer las necesidades y cumplir con los objetivos de la investigación.



(a)



(b)



(c)

Figura N.º 2. Equipos para laboratorio de Biometalúrgia (a) Autoclave de esterilización, (b) Incubadora, (c) Microscopio trinocular.

4.1. Implementación del laboratorio

El compromiso y esfuerzo de cada uno de los integrantes del grupo de investigación se ha traducido en la implementación y funcionamiento del laboratorio de biometalúrgia, logrando la adquisición de los siguientes equipos: microscopio trinocular, incubadora, autoclave, biodigestor, agitador centrífugo, agitador-rotador, etc. (Ver Figura N.º 2).

4.2. Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas de las inmediaciones de las unidades mineras de Julcani y Recuperada, remitidas por el departamento de Medio Ambiente de la Cía. de Minas Buenaventura. En todas ellas se obtuvieron resultados favorables (Figura N.º 3, 4 y 5).

Tabla N.º 1. Aguas ácidas de las unidades mineras de Julcani, Recuperada y Antapite, Huancavelica

MUESTRA	pH	T (°C)
Bocamina abandonada, Rio Huachocolpa	4.7	12.2
Mina Esperanza, Nv 520	4.5	9.7
U. Julcani, NV 420	3.0	No medido
U. Julcani, NV 580	3.0	No medido
Ingreso PT Palcas	4.55	9.7
U. Antapite NV 3285	3.77	13.4
P. T. Antapite - NV 3240	3.3	17.4



(a)



(b)

Figura N.º 3. Drenaje ácido Huachocolpa. a) Bocamina abandonada de antigua labor minera; y b) Muestreo de efluente ácido.



(a)



(b)

Figura N.º 4. Drenaje ácido de mina U. Antapite. a) Interior de Bocamina Nv. 3525; y b) Caja de captación de efluentes ácidos Nv. 3240.



Figura N.º 5. Muestreo de aguas ácidas Nv. 420 y 580, U. Julcani.

4.3. Aislamiento en medio líquido 9k modificado

El cultivo de bacterias se ha realizado en matraces de 250 ml usando como nutriente 100 ml de solución 9k preparada a las condiciones requeridas de esterilización, posteriormente se adiciona 10 ml de solución ácida (agua ácida). Ver Figura N.º 6.

Las muestras se agitaron a 180 rpm, a temperatura ambiente (20-25 °C), provistas de tapones con algodón para facilitar la oxigenación y evitar el ingreso de microorganismos.



Figura N.º 6. Solución de medio líquido 9k modificado.



Figura N.º 7. Solución en proceso sembrada en proceso de maduración, adquiere coloración rojiza como indicio de la oxidación del ferroso a férrico por acción bacteriana.



Figura N.º 8. Solución final después de 96 horas de inoculación (luego de la 8.ª resiembra) de matiz rojo óxido intenso por la formación del férrico y la colmatación bacteriana del medio.

Cada etapa de resiembra concluye cuando el medio vire a color rojizo, debido a la oxidación del hierro ferroso a férrico. Transcurrido lo anterior, se toma una alícuota de 10 ml, esta vez de la solución de siembra para adicionarlo nuevamente a un medio líquido 9k fresco (Figuras N.º 7 y 8).

El procedimiento se repite hasta obtener organismos completamente adaptados al medio y con la finalidad por reducir el tiempo de viraje al mínimo. En la Tabla N.º 2 se presenta tiempos de respuesta de crecimiento frente a resiembras sucesivas.

Tabla N.º 2. Resiembras sucesivas con tiempo de viraje como respuesta del crecimiento bacteriano.

Resiembra	Tiempo de crecimiento (días)
Siembra	30
1.ª resiembra	20
2.ª resiembra	16
3.ª resiembra	10
4.ª Resiembra	8
5.ª Resiembra	6
6.ª Resiembra	4
7.ª Resiembra	4
8.ª Resiembra	4

El crecimiento bacteriano estuvo monitoreado por tinción Gram, observándose la morfología y población de un consorcio de bacterias.

4.4. Aislamiento en medio sólido – Obtención de cepa bacteriana *Acidithiobacillus Ferroxidans*

El medio sólido FeO es vertido sobre placas Petri a razón de 10 ml/un, y dejados gelificar por enfriamiento. Se adicionó 0.1 ml de cepa bacteriana proveniente de cultivo líquido (resiembrado 8) y diseminado mediante asa de siembra. Se coloca en una incubadora a 28 °C por espacio de 05 a 10 días. La evaluación del crecimiento es por observación directa a partir del 5.º día (Figura N.º 9).



Figura N.º 9. Placa de Petri luego de 6 días de cultivo sólido, los puntos rojos indican colonias de bacterias acidófilas. Acchilla.



Figura N.º 10. Desarrollo de colonia bacteriana. a) Cultivo bacteriano al 6.º día, caracterizado macroscópicamente, coloración marrón rojizo. Muestra Mina Esperanza. b) cultivo bacteriano al 6.º día caracterizado macroscópicamente, coloración marrón rojizo. Muestra ingreso PT placas.

La selección de las colonias de *Acidithiobacillus Ferroxidans* se hizo de manera visual, de acuerdo a características físicas como color y morfología (redondeada). Estas colonias fijadas sobre el gel son pequeñas y de color marrón rojizo (Figura N.º 10), debido a la formación de hierro férrico. La colonia identificada es resiembrada en medio líquido fresco, lográndose así el enriquecimiento de la cepa y la obtención de las características intrínsecas del *A. Thiooxidans*. En ambos aislamientos se usa el hierro debido a que es un micronutriente esencial para las bacterias, ya que por sus propiedades redox actúa como transportador de electrones y como cofactor de muchas enzimas.

Posteriormente una cepa pura ha sido enviada al laboratorio de biología molecular de la UNMSM para la identificación y caracterización final mediante la técnica biológica molecular del PCR.

4.5. Identificación morfológica mediante tinción de Gram

Como resultado se obtiene bacterias Gram negativas de forma bacilar. Las resiembras en medio líquido y sólido fueron monitoreadas mediante esta técnica. Además, se observaron hongos y esporas de diferente tamaño y forma. (Ver Figura N.º 11).

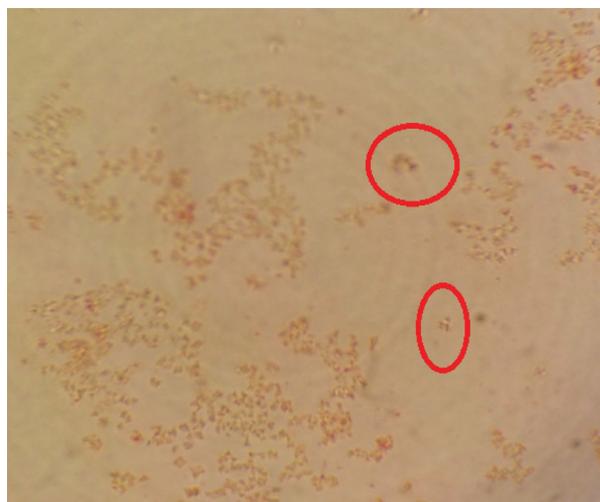


Figura N.º 11. Visualización de esporas fúngicas obtenidas en las primeras siembras en medio líquido. 1000 X.

Los tipos de spora fueron eliminándose mediante resiembras líquidas. La presencia de hongos fue observada hasta la 3.ª siembra junto a bacterias de tipo *Acidithiobacillus Ferroxidans* (Figura N.º 12).

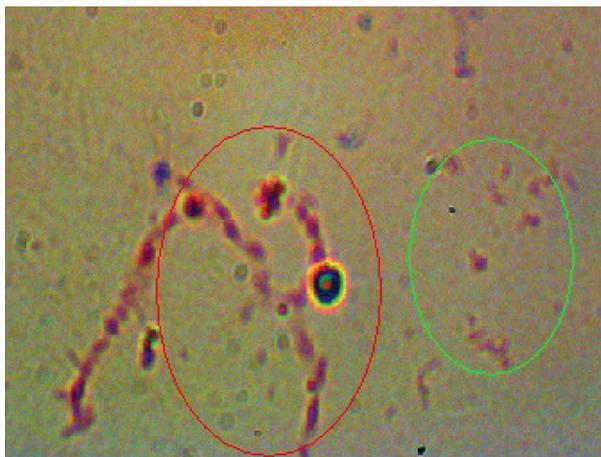


Figura N.º 12. Identificación morfológica de hongos (círculo rojo), adaptados a las condiciones del 9k líquido junto con bacterias (círculo verde). 1000 X.

La presencia de residuos de safranina y cristal violeta fue observada en las pruebas preliminares de tinción. Se debe cuidar el orden y el tiempo de contacto de cada reactivo para evitar interferencias visuales (Figura N.º 13).



Figura N.º 13. Bacterias y cristales de safranina residuales por excesivo tiempo de contacto con la muestra. Magnificación: 1000 X.

La obtención de la cepa pura (Figura N.º 14) es caracterizada por una gran población bacteriana de igual morfología. Esta fue contrastada con la morfología y propiedades químicas de la *A. Ferroxidans*, dando una similitud al 100%.

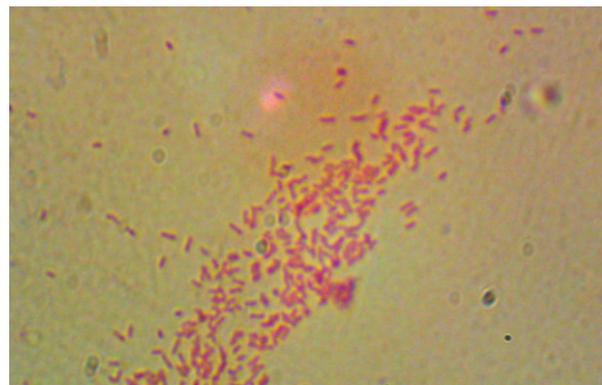


Figura N.º 14. Tinción Gran y visualización microscópica (1000 X), muestra de agua ácida de Mina Esperanza Nv. 520

V. CONCLUSIONES

1. El drenaje ácido de las labores mineras estudiadas (Huancavelica), presenta acidez en un rango de 3.0 a 4.5 pH, con una cantidad importante de metales en solución. Además este medio contiene una serie de microorganismos entre los cuales se encuentra la cepa bacteriana de estudio.
2. La formulación usada como medio de cultivo 9k modificado resultó satisfactorio para conseguir el aislamiento y el crecimiento de la cepa *Acidithiobacillus Ferroxidans*. Su empleo como medio de aislamiento está limitado al tipo de microorganismos acompañantes y su capacidad de adaptación a nuevas condiciones lo que también aumenta con el número de resiembras.
3. El aislamiento de la bacteria en medio sólido es favorecido por la identificación macroscópica de las colonias de bacterias, hongos y esporas, permitiendo su extracción manual y mejora el nivel de aislamiento. La cepa pura es capaz de obtenerse en no menos de 8 resiembras en medio líquido y sólido, alternativamente.
4. El exceso de sulfato ferroso en el medio 9k modificado inhibe el crecimiento bacteriano. El pH ideal está alrededor de 1.8, a mayor grado de acidez se provoca la precipitación de insolubles.

VI. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación, que a través del Consejo Superior de Investigaciones contribuyó económicamente para la realización de los Proyectos de Estudios N.º 111601011 y N.º 121601071, también los integrantes del grupo de estudio en **Biotecnología Metalúrgica**, por su entrega en la realización de cada una de las tareas que implicaron la consecución

de los resultados. Asimismo, al Departamento de Medio Ambiente de la Compañía de Minas Buenaventura por proveernos muestras de aguas ácidas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez M. T. (2005). Microbial Treatment of heavy metal leachates. Doctoral thesis. Suecia.
2. Barrie J. (2006). Biohydrometallurgy and the environment: Intimate and important interplay. *Hydrometallurgy*, 2006; 83: 153-166.
3. Segura, D. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, España.
4. Misari F. (1985). Tecnologías de Lixiviación Bacteriana de Minerales. Lima-Perú.
5. Hernández G. *et al.* (1998). Aislamiento y caracterización de bacterias tiosulfato reductoras no sulfato reductoras en digestores anaerobios mesofílicos. V Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento anaerobio 10 de aguas residuales, Viña del Mar, Chile. Pp 1-8
6. Jagnow, G., Dawid, W. (2003). Biotecnología. Introducción con Experimentos Modelo.
7. Hallberg K, Johnson B. (2003). Novel Acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hidrometallurgy*, vol. 71 Issue 1, pages 139-148.
8. Mena, J. *et al.* (2003). Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Universidad de Camagüey. *Rev. Biotecnología Aplicada*; Vol. 20, N.º 4, pp. 248-252.
9. Abanto Marin (2008). Diversidad molecular de bacterias oxidadoras de hierro aisladas de drenaje. Tesis de grado, Unidad de posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM
10. Silverman, M.P., Lundgren D.G. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cellular yields, *J. Bacteriol.*, 77, 642-647.
11. Mackintosh, M. E. (1977). Nitrogen Fixation by thiobacillus ferrooxidans. *BJ Biochemical Journal Abstract. Microbiology*.
12. Madigan. M. *et al.* (2008). Biología de los microorganismos. Ed. Pearson, Madrid, España. Pp. 58-59.
13. Arias, V. y col. (2012.) Informe de Proyecto de Investigación: Aislamiento y caracterización de thiobacillus thiooxidans a partir de drenaje ácido. Universidad nacional Mayor de San Marcos. Perú.
14. Wistreich, G.A. y Lechtman, M.D. (1983). Prácticas de laboratorio en microbiología. Ed. Limusa México.