

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y  
BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



***“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ADAPTACIÓN AL CuS DE UN  
CONSORCIO BACTERIANO TERMÓFILO AISLADO EN EL CAMPO  
GEOTERMAL DEL VALLE DEL COLCA, AREQUIPA-PERÚ”***

***Tesis presentada por la bachiller:***

*Rosell Paredes, Leyla Yrene*

***Para obtener el Título Profesional de:***

*Ingeniera Biotecnóloga*

***Asesor:***

*PhD. José Villanueva Salas*

Arequipa – Perú

2015

## DEDICATORIA

*A todas las personas guerreras...*

*Sólo como guerrero puede uno soportar el camino del conocimiento. Un guerrero no puede quejarse o lamentarse por nada. Su vida es un interminable desafío, y los desafíos no pueden ser buenos o malos. Los desafíos son simplemente desafíos. Carlos Castañeda*

- A ti mi señor supremo por regalarme la vida y permitirme contemplar el don de la sabiduría.
- A dos seres maravillosos, mi mamá *Juana* y mi papá *Juan* que con tanto esfuerzo y sacrificio me han regalado grandes momentos de felicidad.
- A mis segundos padres Teodoro y Nelly, a mi hermana *Diana*, mi hermano *Juan Diego*, a mis primas *Mariluz* y *Cecilia* y a todos mis familiares que con su comunicación y apoyo siempre han estado presentes durante mi formación académica.
- A ti *Oscar* que con mucho Amor me has enseñado a ser perseverante, me brindas todo tu cariño y tiempo para desafiar la vida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antofagasta Chile y a la Universidad Católica de Santa María mi alma mater.

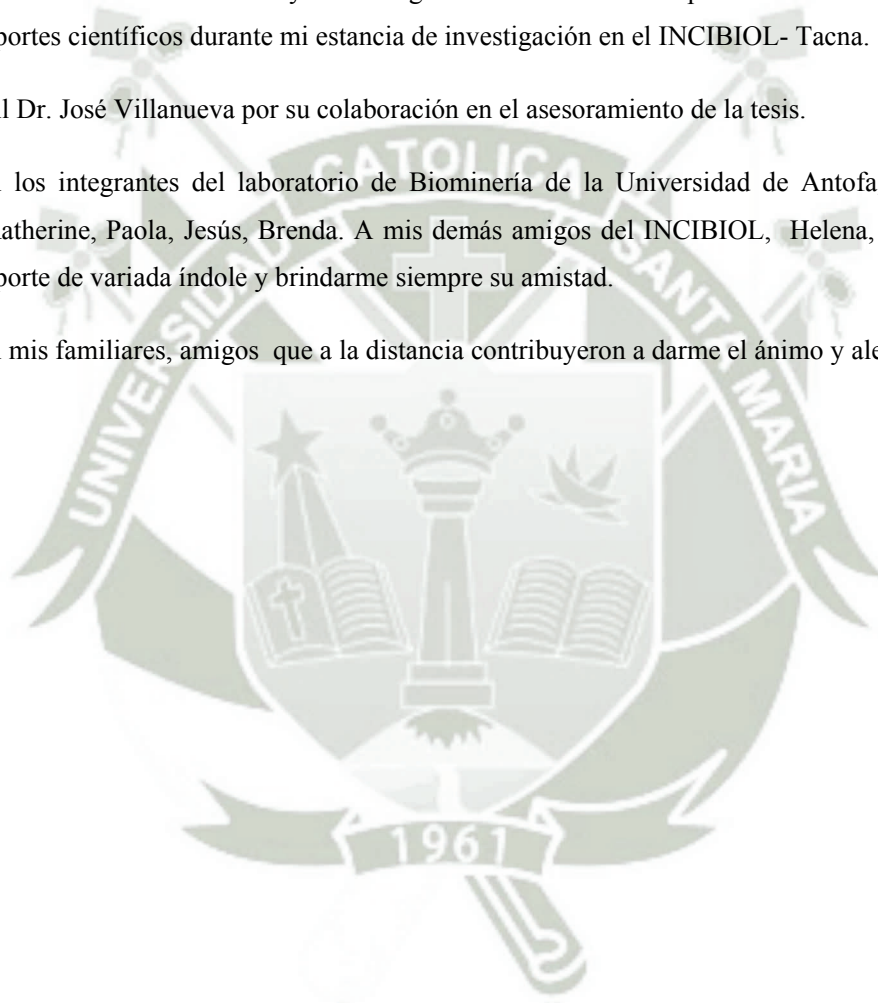
Al Dr. Mario Esparza, por su amistad, enseñanzas y por la confianza que depositaron en la realización de esta Tesis.

Al Dr. Roberto Castellanos y a los integrantes de su laboratorio por brindar su colaboración y aportes científicos durante mi estancia de investigación en el INCIBIOL- Tacna.

Al Dr. José Villanueva por su colaboración en el asesoramiento de la tesis.

A los integrantes del laboratorio de Biominería de la Universidad de Antofagasta Chile, Katherine, Paola, Jesús, Brenda. A mis demás amigos del INCIBIOL, Helena, Luis por su aporte de variada índole y brindarme siempre su amistad.

A mis familiares, amigos que a la distancia contribuyeron a darme el ánimo y alegría.



## INDICE GENERAL

<b>CAPÍTULO I</b> .....	14
<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
OBJETIVO GENERAL .....	18
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	18
HIPÓTESIS .....	19
<b>ABREVIATURAS</b> .....	20
<b>CAPÍTULO II</b> .....	22
<b>II.MARCO TEÓRICO</b> .....	22
2.1 Ambientes extremófilos.....	22
2.2 Microorganismos extremófilos.....	23
2.3 Metalurgia.....	25
2.3.1 Mineralurgia.....	27
2.3.2 Reducción de tamaño.....	27
2.3.3 Concentración de minerales.....	27
2.3.4 Operaciones de lixiviado .....	28
2.3.5 Solventes lixiviantes .....	28
2.4 Biooxidación bacteriana .....	29
2.4.1 Microorganismos quimiolitótrofos responsables en el proceso de biooxidación .....	29
2.5 Mecanismos de la biooxidación .....	31
2.5.1 Mecanismo directo.....	33
2.5.2 Mecanismo indirecto .....	33
2.5.3 Rol de los microorganismos en procesos de biooxidación.....	34
<b>2.5.4..... Factores que influyen en la actividad bacteriana y el proceso de biooxidación</b> .....	35
2.5.4.1 pH y Potencial Redox (Eh) .....	35
2.5.4.2 Temperatura .....	36
2.5.4.3 Oxígeno y dióxido de carbono .....	36
2.5.4.4 Nutrientes e inhibidores .....	36
2.5.4.5 Mineral y tamaño de partícula.....	37
2.6 Microorganismos termófilos en procesos de biooxidación.....	37
2.7 Bioreactores.....	37
2.8 Aplicación de la bioinformática para identificación de microorganismos.....	38

<b>CAPÍTULO III</b> .....	41
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
3.1 Lugar de ejecución .....	41
3.2 Materiales .....	41
3.3 Metodología.....	44
3.3.1 Obtención de muestra .....	44
3.3.2 Caracterización microbiológica de las muestras.....	46
3.3.2.1 Procesamiento de las muestras.....	46
3.3.2.2 Observación al fresco .....	47
3.3.2.3 Tinción Gram .....	47
3.3.2.4 Caracterización macroscópica.....	47
3.3.3 Pruebas Enzimáticas .....	48
3.3.3.1 Amilasas .....	48
3.3.3.2 Celulasas .....	48
3.3.4 Adaptación en medio ácido con $Fe_2 SO_4$ a diferentes temperaturas y Aislamiento de los cultivos microbianos.....	49
3.3.5 Producción de biomasa (consorcio LK) .....	50
3.3.6 Medición del crecimiento celular .....	50
3.3.7 Análisis de parámetros fisicoquímicos .....	51
3.3.7.1 Determinación de pH .....	51
3.3.7.2 Determinación de potencial redox .....	51
3.3.7.3 Determinación de temperatura .....	52
3.3.8 Pruebas de biooxidación .....	52
Tras haber obtenido el consorcio adaptado en medio ácido con sulfato ferroso, se procedió al estudio de biooxidación en mineral sulfurado.....	52
3.3.8.1 Preparación del mineral .....	52
3.3.8.2 Concentraciones de cobre, sulfato, $FeT$ .....	52
3.3.8.3 Análisis granulométrico .....	52
3.3.9 Pruebas de tolerancia a mineral .....	53
3.3.9.1 Construcción del prototipo de bioreactor con agitación .....	53
3.3.10 Pruebas de biooxidación .....	54
3.3.10.1 Análisis Químico.....	55
3.3.10.2 Determinación de hierro total.....	55
3.3.11 Estequiometría .....	56
3.3.12 Análisis molecular.....	57
3.3.12.1 Obtención de pellet limpio .....	57
3.3.12.2 Extracción de ADN.....	58
3.3.12.3 Identificación molecular.....	60

<b>CAPÍTULO IV</b> .....	61
<b>IV.RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	61
4.1 Sitio de muestreo .....	61
4.2 Caracterización fisicoquímica de sedimentos .....	62
4.3 Caracterización microbiológica.....	63
4.4 Caracterización enzimática.....	64
4.5 Adaptación en medio ácido con Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a diferentes temperaturas y Aislamiento de los cultivos microbianos.....	65
4.6 Producción de biomasa (LK).....	70
4.6.1 Cultivo de enriquecimiento para el consorcio LK.....	70
4.6.2 Generación de biomasa del consorcio LK .....	71
4.7 Pruebas de biooxidación.....	74
4.7.1 Análisis granulométrico.....	74
4.7.2 Análisis químico, FeT y Cu.....	74
4.8 Evaluación del pH y ORP .....	75
4.9 Evaluación de la concentración de Hierro Total .....	78
4.10 Análisis Cualitativo de los cultivos de biooxidación y experimento control.....	79
4.10 Cinética microbiana del consorcio microbiano termófilo en el proceso de biooxidación .....	80
4.11 Estequiometria microbiana.....	81
4.11.1 Crecimiento microbiano .....	82
4.11.2 Cinética de crecimiento, modelo Monod.....	82
4.12 Análisis estadístico .....	83
4.13 Análisis molecular.....	89
<b>CAPÍTULO V</b> .....	93
<b>V.CONCLUSIONES</b> .....	94
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	96
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	96
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	97
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	97
<b>CAPÍTULO VIII</b> .....	103
<b>VIII. ANEXOS</b> .....	103

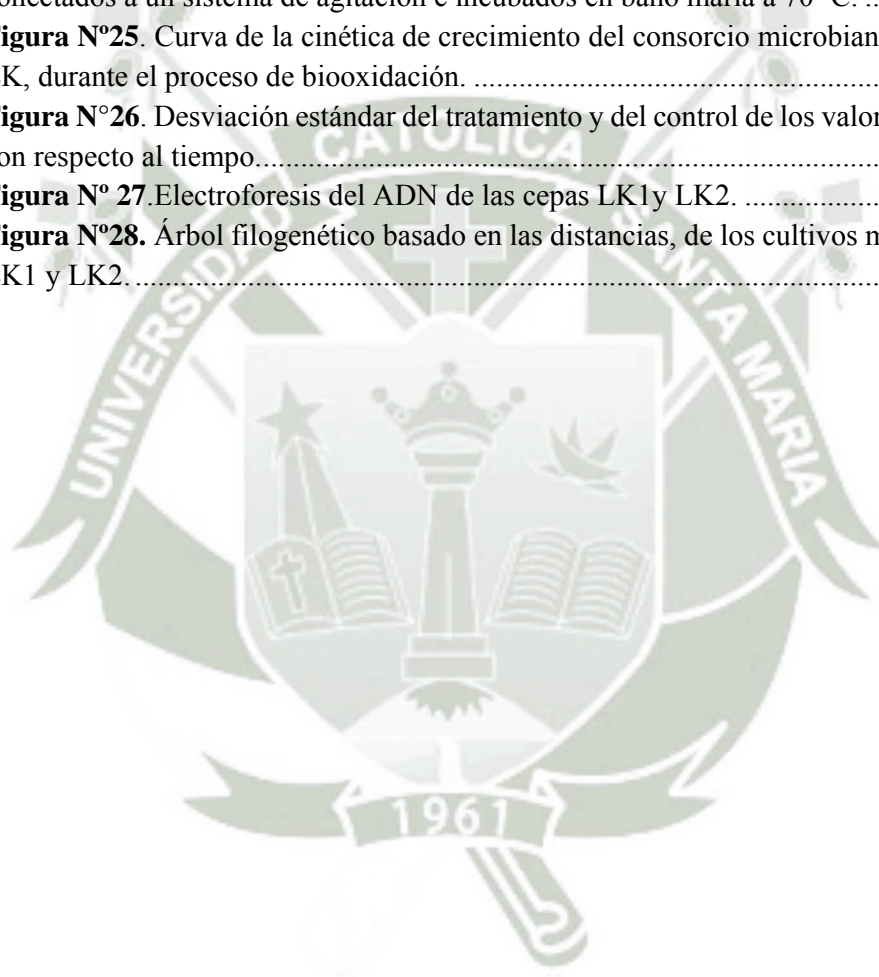
## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1.</b> Tipos de bacterias que participan en la lixiviación de minerales.....	30
<b>Tabla N° 2.</b> Formulación Mix PCR.....	60
<b>Tabla N° 3.</b> Monitoreo de temperatura, pH, ORP, medidos en diferentes puntos dentro del campo geotermal Valle del Colca. ....	62
<b>Tabla N°4.</b> Composición química de una muestra representativa del campo geotermal Valle del Colca. ....	62
<b>Tabla N°5.</b> Caracterización macroscópica y microscópica de los sedimentos del campo geotermal del Valle del Colca. ....	63
<b>Tabla N°6.</b> Resultados de los parámetros de pH, ORP (mV) y temperatura.....	67
<b>Tabla N°7.</b> Resultados de los parámetros de pH, ORP (mV) y temperatura.....	68
<b>Tabla N°8.</b> Parámetros evaluados en los sistemas de control. ....	68
<b>Tabla N°9.</b> Resultados de la cinética microbiana del consorcio LK a 50 °C, 60 °C y 70 °C de temperatura.....	69
<b>Tabla N°10.</b> Peso de mineral que pasó por la malla N°400.....	74
<b>Tabla N°11.</b> Resultados del análisis de FeT, Cu y Sulfatos.....	75
<b>Tabla N°12.</b> Resultados de la medición de pH en el proceso de biooxidación. ....	76
<b>Tabla N°13.</b> Resultados de la medición de ORP en el proceso de biooxidación.....	77
<b>Tabla N°14.</b> Análisis de FeT en solución presente como ión $Fe^{+2}$ y $Fe^{+3}$ .....	79
<b>Tabla N°15.</b> Resultados de la cinética de crecimiento del consorcio microbiano termófilo LK, durante el proceso de biooxidación.....	80
<b>Tabla N°16.</b> Cinética de Monod.....	82
<b>Tabla N°17.</b> Resumen del Análisis de Varianza de FeT del tratamiento. ....	84
<b>Tabla N°18.</b> Resumen del Análisis de Varianza de FeT del control. ....	84
<b>Tabla N°19.</b> Resumen del Análisis de Varianza de ORP del tratamiento. ....	86
<b>Tabla N°20.</b> Resumen del Análisis de Varianza de ORP del control.....	86
<b>Tabla N°21.</b> Resumen del Análisis de Varianza para pH del tratamiento.....	88
<b>Tabla N°22.</b> Cuadro resumen del Análisis de Varianza para pH del control.....	89
<b>Tabla N°23.</b> Especies identificadas con 100% de identidad para LK1 y LK2.....	90
<b>Tabla N°24.</b> Microorganismos relacionados filogenéticamente con los cultivos LK1 y LK2. ....	93

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°1.</b> Fuente Boletín minero MINEM ,2011.Participacion de empresas mineras con porcentajes de producción de cobre. ....	26
<b>Figura N°2.</b> Ciclo del azufre .....	31
<b>Figura N°3.</b> Oxidación de compuestos de azufre Thiobacillus ferroxidans, enzimas que participan en la ruta 1.titrionato hidrolasa.2.tiosulfato deshidrogenasa, 3.tetrionato hidrolasa, 5: enzima sulfito oxidante.4, 6,7: aún en estudio. ....	32
<b>Figura N°4.</b> Mecanismos directo e indirecto de biolixiviación; según Rodríguez <sup>55</sup> ..	35
<b>Figura N°5.</b> Puntos de muestreo en el géiser Pinchollo a 4600 m.s.n.m., A. cráter de 90 cm de diámetro, B. cráter de 40 cm de diámetro, C. zona de actividad del géiser Pinchollo. ....	45
<b>Figura N°6.</b> Esquematización de la metodología utilizada. ....	46
<b>Figura N°7.</b> Cámara de Neubauer y sus divisiones. (A) Cámara de Neubauer. (B) vista panorámica de los cuadrantes. (C) Cuadrante central. ....	51
<b>Figura N°8.</b> A: Mineral sulfuro de cobre alta ley, B: molienda en batan, C: tamizado de mineral, D: mineral pulverizado. ....	52
<b>Figura N° 9.</b> Prototipo de bioreactor .....	53
<b>Figura N°10.</b> Sistema de biooxidación a 70°C. ....	54
<b>Figura N°11.</b> A: Cráter de 20 cm de diámetro, con pigmentaciones rojas –anaranjadas, presente en el campo geotermal Valle del Colca. B: Sólidos tomados del géiser Pinchollo, se puede observar precipitación de coloración amarilla, siendo esto una característica física del azufre. ....	61
<b>Figura N°12.</b> Actividad cualitativa de las amilasas evidenciada por zonas de hidrólisis de los microorganismos aislados del campo geotermal Valle del Colca. ....	64
<b>Figura N°13.</b> Actividad cualitativa de la celulasa evidenciada por zonas de hidrólisis por los microorganismos aislados de los diferentes puntos muestreado del campo geotermal Valle del Colca. ....	65
<b>Figura N°14.</b> Muestra los dos cultivos microbianos quimiolitótrofos, A: colonia LK1 y B: colonia LK2. ....	66
<b>Figura N°15.</b> Cinética microbiana del consorcio microbiano termófilo LK, a diferentes temperaturas. ....	70
<b>Figura N°16.</b> A: Medio mínimo de sales en un tiempo 0, B: inoculación del consorcio de microorganismos LK después de un periodo de 25 días. ....	71
<b>Figura N°17.</b> Oxidación del medio de cultivo, producido por el consorcio LK durante 30 días. ....	72
<b>Figura N°18.</b> Medio tiosulfato inoculado con el consorcio LK, durante 30 días a 70 °C. ....	72
<b>Figura N° 19.</b> Actividad oxidativa del consorcio LK. A: medio sólido tiosulfato, B: medio sólido 9K-Fe. ....	73
.....	73

<b>Figura N°20.A:</b> Bacilos Gram positivos para la colonia LK1, B: Bacilos Gram positivos para la colonia LK2. ....	73
<b>Figura N°21.</b> Medición del pH en la solución durante el proceso de biooxidación, realizado por triplicado en la experimentación. ....	76
<b>Figura N°22.</b> Medición de ORP (mV) en la solución durante el proceso de biooxidación, realizado por triplicado la experimentación. ....	78
<b>Figura N°23.</b> Variación de la concentración de FeT (ppm) en la solución durante el proceso de biooxidación comparando el tratamiento con el control. ....	79
<b>Figura N°24.</b> Se muestran dos tanques uno como control de color plomo por el mineral, el otro tanque es el tratamiento de color anaranjado por la formación de jarosita, conectados a un sistema de agitación e incubados en baño maría a 70 °C. ....	80
<b>Figura N°25.</b> Curva de la cinética de crecimiento del consorcio microbiano termófilo LK, durante el proceso de biooxidación. ....	81
<b>Figura N°26.</b> Desviación estándar del tratamiento y del control de los valores del FeT, con respecto al tiempo. ....	86
<b>Figura N° 27.</b> Electroforesis del ADN de las cepas LK1y LK2. ....	90
<b>Figura N°28.</b> Árbol filogenético basado en las distancias, de los cultivos microbianos LK1 y LK2. ....	92



## RESUMEN

La importancia del estudio de la diversidad microbiana, actualmente se está enfocando en la investigación de microorganismos eficientes que ayuden a resolver problemas ambientales, dentro de ellos se encuentran los microorganismos termófilos hierro-oxidantes, que son capaces de lixiviar completamente una muestra de calcopirita, en comparación de los mesófilos que atacan escasamente el mineral. Además, estos microorganismos, permiten la disolución de minerales refractarios, a la par que son una alternativa amigable con el medio ambiente.

En el presente trabajo de investigación, se realizó el aislamiento de un consorcio conformado por microorganismos extremófilos, a partir de los sedimentos muestreados dentro del área del geiser Pinchollo, el cual está ubicado en el Valle del Colca, en la Ciudad de Arequipa, provincia de Chivay, con una altura de 4600 m.s.n.m. Se recolectaron sedimentos del géiser Pinchollo, cuyos parámetros fisicoquímicos evaluados fueron: pH en un rango de 3 a 5, temperatura entre 60-80 °C, un promedio de 0,557 ppm de hierro total (FeT) y del ión  $\text{SO}_4^{2-}$  en un rango desde 288,7 hasta 1264,2 ppm.

Se realizó la caracterización microbiológica general de las muestras recolectadas tanto en medios sólidos selectivos como en medio líquidos para la caracterización morfológica, de los sedimentos muestreados.

Se seleccionó los microorganismos quimiolitótrofos, aislando dos cultivos bacterianos termófilos en medio sólido, los cuales presentaron una adaptación significativa en medio ácido con sulfato ferroso 0,12 M, para luego cultivarlos en un medio ácido con

un 32% de sulfuro de cobre, realizándose pruebas de biooxidación del ión  $\text{Fe}^{+2}$  a escala de laboratorio en un sistema batch con agitación continua.

Los cultivos bacterianos termófilos seleccionados se los denominaron LK1 y LK2, respectivamente.

Se conformó un inóculo, mezclando los dos cultivos microbianos LK1 y LK2; obtenidos en la fase logarítmica de cada cultivo, en una relación 1:1 de volumen.

Las pruebas de biooxidación del ión  $\text{Fe}^{+2}$ , se realizaron en un sistema a escala laboratorio, conformado por bioreactores batch con agitación continua. Se utilizó como fuente de energía para los microorganismos el sulfuro de cobre en una concentración del 32 % por bioreactor y un volumen de 250 mL de solución ácida. Se incubó a una temperatura de  $70\pm 5^\circ\text{C}$ , por un periodo aproximado entre 60 y 70 días. Se obtuvo los siguientes valores para los parámetros monitoreados durante el proceso de biooxidación:

El promedio del conteo celular del consorcio microbiano en la fase logarítmica fue de  $1,4 \times 10^8$  cel/mL a los 40 días, monitoreado cada 48 horas durante la incubación, el pH varió desde 6 hasta 2,5, la concentración promedio de FeT fue de 5,69 ppm, a los 1308 horas, muestreando cada 336 horas la solución obtenida del proceso de biooxidación siendo analizado por técnicas de adsorción atómica.

Para la cinética microbiana, se utilizó la ecuación de Monod obteniendo los valores de velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ , la Constante de Monod ( $K_s$ ) de 13508,950 g/L, el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 50,59 h.

En el análisis molecular se realizó la detección del gen ARNr 16S de los cultivos microbianos termófilos LK1 y LK2, presentando una similitud con el gen ARNr 16S de *Geobacillus thermodenitrificans.KP764940* Al 100% y con el de *Bacillus sp.KC748390* al 100% para los dos cultivos respectivamente tras su secuenciamiento parcial. Esto indica que el campo geotermal del Valle del Colca presenta biodiversidad microbiana útil para estudios en aplicaciones biotecnológicas, como trabajos futuros.

**Palabras clave:** *Geobacillus thermodenitrificans.KP764940*, *Bacillus sp. sp.KC748390*, quimiolitótrofos, bioreactor batch, lixiviantes.

## ABSTRACT

The importance of the study of microbial diversity, currently is focusing on the research of efficient microorganisms that help solve environmental problems, among them are the iron-oxidizing, thermophilic microorganisms which are capable of leaching completely a sample of chalcopyrite in comparison of mesophilic scarcely attack the mineral. Furthermore, these microorganisms enable the dissolution of refractory ores, at the same time are a friendly alternative environment.

In this research, the isolation of a consortium of extremophile microorganisms was carried out from within the sediments sampled Pinchollo geyser area, which is located in the Colca Valley in Arequipa City, Province Chivay, with a height of 4600 m.s.n.m. Geyser Pinchollo sediment were collected, whose physicochemical parameters evaluated were: pH in the range 3 to 5, temperature 60-80 °C, an average of 0,557 ppm total iron (FeT) and the  $\text{SO}_4^{2-}$  ion in a range from 288.7 to 1264.2 ppm .

General microbiological characteristics of the samples collected both on selective solid media and in liquid medium for the morphological characterization of the sampled sediment were performed.

Chemolithotrophs selected microorganisms, isolating two thermophilic bacterial cultures on solid media, which presented a significant adjustment in acidic medium with 0,12 M ferrous sulfate, and then grow them in an acid with 32% copper sulphide medium, performing tests biooxidation  $\text{Fe}^{+2}$  ion laboratory scale in continuous stirred batch system.

Selected thermophilic bacterial cultures are the called LK1 and LK2 respectively.

An inoculum was formed by mixing the two microbial cultures LK1 and LK2; obtained in the logarithmic phase of each culture on a 1: 1 volume.

Testing biooxidation of  $\text{Fe}^{+2}$  ion is conducted in a laboratory scale system, comprising continuously stirred batch bioreactors. It was used as an energy source for microorganisms copper sulfide in a concentration of 32% by volume bioreactor and 250 mL of acid solution. It was incubated at a temperature of  $70 \pm 5$  ° C for an approximate period of 60 to 70 days.

The following values for the monitored parameters were obtained during biooxidation: The average cell count of the microbial consortium in the logarithmic phase was  $1,4 \times 10^8$  cells/mL at 40 days, monitored every 48 hours during incubation, Ph to 6 decreased to at 2, the average concentration was 5.69 ppm FeT, at 1308 hours, sampling every 336 hours the solution obtained bio-oxidation process being analyzed by atomic absorption techniques.

Monod equation was used to obtain the values of specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of 0.01 h<sup>-1</sup>, the Monod constant (Ks) of 13,508.950 g/L, the doubling time for microbial kinetics (td) 50.59 h.

Molecular analysis in detecting 16S rRNA gene of thermophilic microbial cultures LK1 and LK2 performed, presenting a similarity to the 16S rRNA gene of *Geobacillus thermodenitrificans* at 100% and the *Bacillus sp.* 100% for the two crops respectively after their partial sequencing. This indicates that the geothermal field Colca Valley presents useful microbial biodiversity for studies in biotechnology applications, as future work.

Keywords: *Geobacillus thermodenitrificans*.KP764940, *Bacillus sp.*, KC748390, chemolithotrophs, batch bioreactor, leaching.

## CAPÍTULO I

### I. INTRODUCCIÓN

Desde el origen de la vida en la Tierra, los primeros microorganismos existentes fueron los extremófilos, los cuales participaron activamente durante el proceso evolutivo del planeta tierra, siendo parte de los ciclos naturales y bioquímicos. La investigación de estos microorganismos, nos permite conocer las rutas bioquímicas y ciclos biogeoquímicos del medio ambiente; mediante técnicas moleculares donde permite saber que genes están involucrados, enzimas, nuevas especies, expresión génica, interacciones proteína-proteína, y modelado de la evolución.

El estudio de la biodiversidad de microorganismos extremófilos y la aplicación biotecnológica, no es tarea sencilla, ya que estos microorganismos de ambientes extremos crecen en condiciones difíciles de reproducir experimentalmente en laboratorio ya que algunos tienen requerimientos nutricionales que se desconoce además hay escasas técnicas de microbiología y biología molecular para poder realizar el estudio de dichos microorganismos. Es por eso que las técnicas de biología molecular específicas y cultivo-independientes se vuelven herramientas indispensables.

La aplicación biotecnológica de microorganismos termófilos con modos metabólicos comprendiendo desde quimiolitótrofos a quimioorganótrofos, están relacionados en los procesos de biooxidación de compuestos químicos, o metales, son aplicados en estudios de biominería aplicable en minerales refractarios y biorremediación de lugares contaminados con metales pesados.<sup>1</sup> La biominería hace uso de la capacidad de ciertos microorganismos acidófilos de producir Fe(III) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que crean las condiciones para la oxidación y disolución de sulfuros metálicos y otros minerales.

Las interacciones de los minerales con estos microorganismos, están muy ligadas de tal manera que uno a menudo no puede existir sin el otro en la naturaleza. Estos procesos microbianos juegan un papel en el ciclo de los elementos y de absorción de metales <sup>2, 3, 4, 5, 6, 7</sup>.

La ciudad de Arequipa, tiene una zona de ambiente extremo, siendo el Valle del Colca, en el cual están ubicados varios volcanes, el río Colca y diversas manifestaciones

geotermales dentro de ellos los más conocidos y accesibles son; el Géiser Pinchollo, los baños termales “La Calera”, están conformados mayormente por compuestos de hierro y azufre. Estos son lugares que tienen distintas temperaturas y características fisicoquímicas termales que hasta la fecha no hay algún tipo de reporte en el monitoreo de parámetros.

Mayormente estos hábitats están colonizados por microorganismos termófilos quimiolitótrofos. Siendo estos de interés de estudio para aplicaciones en biotecnología ambiental, simular procesos de biooxidación, biolixiviación, biorremediación. La biorremediación, en particular la de sitios contaminados con metales pesados, es otra área de aplicación de sumo interés para los microorganismos acidófilos. Esta clase de contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes en la actualidad debido a que muchas industrias, como la minera o la del curtido de cueros, producen y descargan sus residuos en el ambiente, y los mismos poseen elevados contenidos de metales pesados. Esto ha provocado un creciente interés en desarrollar procesos capaces de remover o neutralizar los efectos tóxicos de los metales en suelos, sedimentos y cursos de agua. A diferencia de lo que ocurre con los contaminantes orgánicos que pueden ser degradados completamente desde el punto de vista químico, los metales pesados no pueden ser destruidos. Para remediar el impacto producido por la contaminación con metales pesados, sólo es posible utilizar procesos a través de los cuales se modifique su movilidad o su toxicidad, cambiando de especie química o de estado de oxidación. Los microorganismos, y en particular los extremófilos, son una herramienta muy importante para la biorremediación de sitios contaminados con metales pesados, ya que son capaces de solubilizar metales por lixiviación ácida o por complejación, inmovilizarlos por acumulación o precipitarlos a través de la producción de metabolitos que pueden reaccionar con los metales para dar compuestos insolubles. Estos procesos biológicos pueden ser utilizados para el tratamiento de sólidos contaminados y efluentes líquidos debido a la flexibilidad de los microorganismos extremófilos para adecuarse a diferentes condiciones fisicoquímicas, tal cual pueden encontrarse en los efluentes. Además, estos procesos suelen ser selectivos y poco costosos <sup>8</sup>.

Lo que falta por resolver, es el poco interés sobre investigaciones sobre microorganismos extremófilos, empezando por Latino América sobretodo en Perú , no

hay centros de investigación donde se realicen este tipo de estudios, falta dar a conocer la biodiversidad microbiana de los campos geotermales del Perú, siendo de interés científico extranjero.

Siendo el Perú, el tercer productor mundial de cobre, sin embargo en el 2016, se proyecta a ser el segundo productor debido a los nuevos proyectos<sup>9</sup> y otros minerales, por ende la minería es la economía principal y con el tiempo se va agotando los recursos, provocando daños ambientales. Frente a esta problemática nos lleva a la búsqueda de nuevas alternativas amigables con el medio ambiente. Este proceso representa una alternativa económica viable para la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley o “residuos” de la minería que no pueden ser recuperados mediante métodos pirometalúrgicos, y posee ciertas ventajas sobre dichos métodos ya que es un proceso llevado a cabo naturalmente por lo que es amigable con el medio ambiente, no requiere la alta cantidad de energía usada durante el proceso de disolución y permite eliminar emisiones de SO<sub>2</sub> y la emisión de otros gases dañinos en el tratamiento de los minerales sulfurados<sup>10,11</sup>.

La importancia de este proceso reside en la oxidación microbiológica de especies reducidas de hierro y azufre presente en los minerales. Los microorganismos termófilos e hipertermófilos tienen gran relevancia a nivel biotecnológico por el uso de sus macromoléculas y especialmente de las enzimas. Su alta estabilidad térmica y tolerancia a la desnaturalización por temperatura las convierte en una versión mejorada de los clásicos catalizadores químicos. Además, las enzimas presentan varias ventajas sobre los catalizadores químicos, ya que son biodegradables, tienen mejor comportamiento frente a materiales sin pre-tratamientos y generan menor cantidad de productos de desecho. El uso de termo-enzimas disminuye la posibilidad de contaminación con otras enzimas o microorganismos que puedan generar subproductos indeseables debido a la alta temperatura a la que actúan. Probablemente, en estas condiciones los microorganismos contaminantes tengan muy baja actividad o directamente estén inactivados. Los procesos a alta temperatura presentan otros beneficios tales como disminuir la viscosidad del medio de reacción y aumentar la solubilidad de determinados sustratos o productos.

La biodiversidad de estos ambientes, en donde aún no ha llegado el hombre para proceder estudios como por ejemplo: los procesos evolutivos que tuvieron lugar en la tierra, conocer los mecanismos metagenómicos y proteómicos .Además de entender como participan en los procesos biogeoquímicos del ambiente, esto constituye un patrimonio que debe conocerse y valorarse.



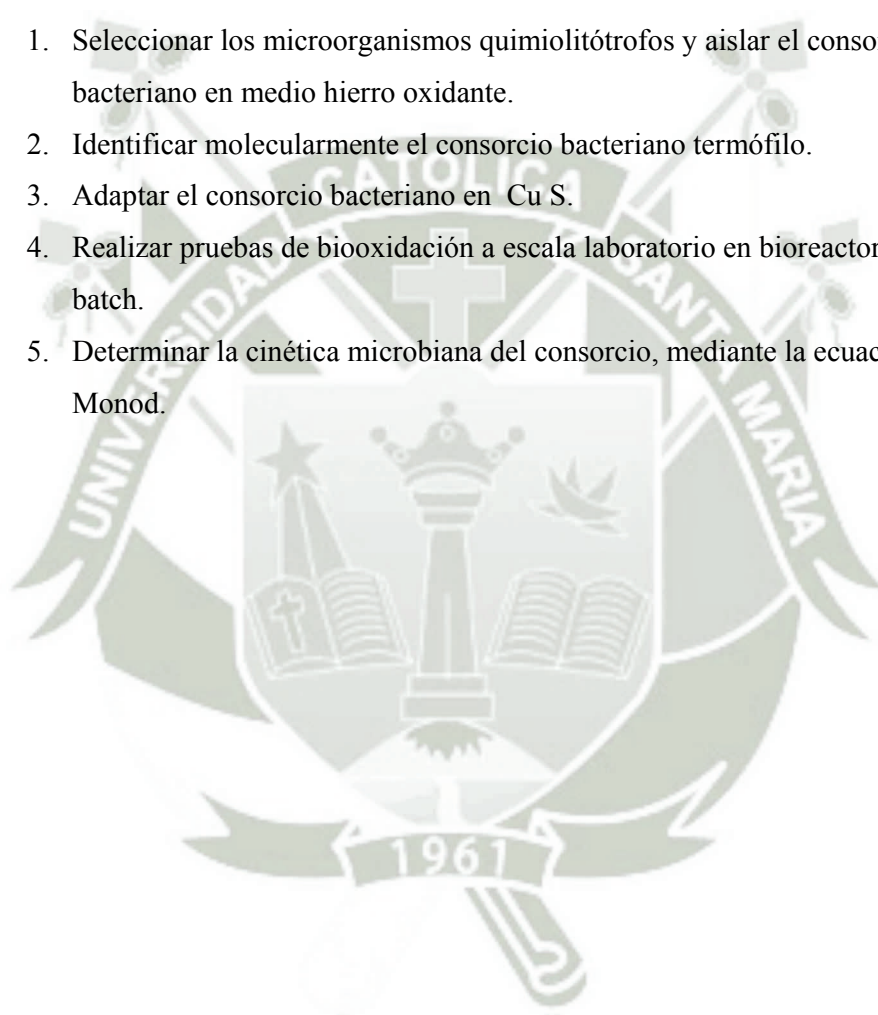
## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Identificar molecularmente y adaptar al Cu S de un consorcio bacteriano termófilo aislado en el campo geotermal del Valle del Colca.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Seleccionar los microorganismos quimiolitótrofos y aislar el consorcio bacteriano en medio hierro oxidante.
2. Identificar molecularmente el consorcio bacteriano termófilo.
3. Adaptar el consorcio bacteriano en Cu S.
4. Realizar pruebas de biooxidación a escala laboratorio en bioreactores tipo batch.
5. Determinar la cinética microbiana del consorcio, mediante la ecuación de Monod.



## HIPÓTESIS

Dado que en el campo geotermal Valle del Colca, existe una gran biodiversidad de microorganismos extremófilos siendo algunos de metabolismo quimiolitótrofo es posible que tengan capacidad de biooxidación del ión  $Fe^{+2}$ , pudiendo utilizar elementos inorgánicos como fuente para su crecimiento y desarrollo, siendo esto aprovechado para realizar el proceso de biooxidación de minerales refractarios, dándole una aplicación diferente e innovadora.



## ABREVIATURAS

- T: Temperatura(°C)
- pH: Potencial de hidrógeno
- Eh: Potencial relativo al electrodo de hidrógeno (mV)
- mV: Milivoltios
- ppm: Partes por millón(mg/L)
- rpm: Revoluciones por minuto
- t:Tiempo(h,s)
- K<sub>s</sub>: Constante de Monod(g/L)
- P: Concentración De producto(g/L)
- S: concentración de sustrato(g/L)
- t<sub>d</sub>: Tiempo De Duplicación(h)
- V: Volumen (L, mL)
- X:Concentración De biomasa(g/L)
- Y<sub>x/s</sub>: Rendimiento biomasa sustrato
- Y<sub>p/s</sub>: Rendimiento producto- sustrato
- μ: Velocidad Especifica de crecimiento(h<sup>-1</sup>)
- μ<sub>m</sub>: Velocidad especifica de crecimiento máxima(h<sup>-1</sup>)
- PCR: Reacción En cadena de polimerasa.
- ADN: Acido desoxirribonucleico
- ARN: Ácido Ribonucleico
- atm : Atmosférica
- ATCC: American Type Culture Collection
- CuFeS<sub>2</sub>: Calcopirita
- Fe<sup>+2</sup>: Ión Ferroso
- Fe<sup>+3</sup>: Ión Férrico
- ng : Nanogramos
- μl: Microlitro
- nm: Nanómetros
- ppm: Partes Por Millón
- %: Porcentaje
- °C: Grados Celsius
- dNTPs: Desoxiribonucleósido trifosfato

- LB: Luria Broth
- min.: Minutos
- seg.: Segundos
- UV: Luz ultravioleta
- km: Kilómetros
- $\mu\text{m}$ : Micrómetro
- $\mu\text{M}$ : Micromolar
- p/v: Concentración Porcentual De Peso En Volumen
- v/v: Concentración porcentual Volumen en Volumen
- CSTR: Tanque de flujo continuo agitado
- PFTR: Plug Flow Tube Reactor
- Batch: Reactor Agitado
- ATCC: American Type Culture Collection y el número corresponde a su ubicación en el catálogo de esta colección de cultivos de referencia internacional.
- DSMZ: colección de microorganismos y cultivos celulares, (instituto de Leibniz).
- M: Molaridad(Mol/L)
- V: Voltaje

## CAPÍTULO II

### II.MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Ambientes extremófilos

Los ambientes extremos se definen como aquellos en los que una o más características fisicoquímicas que se encuentran fuera de los parámetros normales, tomando valores considerados límites para la vida.<sup>12</sup> Es necesario aclarar, que la definición así planteada hace referencia a los parámetros normales para la vida humana; obviamente para las especies que se desarrollan en esos ambientes extremos, dichas condiciones son las normales. Las variables más importantes que pueden afectar las funciones y estructuras de componentes celulares (como membranas, ácidos nucleicos y proteínas) y, por lo tanto, las que permiten definir un ambiente como extremo, son temperatura, pH, presión, disponibilidad de oxígeno, salinidad y exposición a la radiación.

Las especies capaces de desarrollarse en ambientes extremos son denominadas extremófilas. En los ambientes extremos se han encontrado organismos pertenecientes a los 3 dominios, Bacteria, Archaea y Eukarya, aunque en la mayoría de los casos, las especies procariotas son las más diversificadas y mejor adaptadas, siendo capaces de sobrevivir en condiciones más adversas que los eucariotas<sup>13</sup>. Dentro de estos lugares existen los microorganismos que viven en zonas geotermales soportan altas temperaturas y, en ciertos casos, bajos valores de pH y/o altas concentraciones de metales<sup>14</sup>.

Para la biología evolutiva, los microorganismos extremófilos aportan conocimiento sobre las estrategias de adaptación de las especies a distintas condiciones fisicoquímicas y permiten estudiar cómo distintas estructuras celulares y rutas metabólicas han evolucionado para asegurar la supervivencia y colonización de nichos específicos. El estudio de los ambientes extremos y los extremófilos ha tenido un gran impulso por su relación con el origen de la vida en la Tierra y potencialmente en otros planetas. Dichos estudios también son importantes debido a las numerosas aplicaciones biotecnológicas tanto de las especies extremófilas aisladas como las dispuestas en consorcios y de sus metabolitos y macromoléculas incluyendo las

extremo enzimas. Ambos temas serán abordados más adelante para el caso particular de los ambientes de alta temperatura y bajos valores de pH.

Finalmente, los estudios de biodiversidad, en particular de ambientes extremos, son importantes por la gran posibilidad de descubrir nuevas especies y nuevas aplicaciones biotecnológicas.<sup>15</sup>

Para algunos ambientes subterráneos que contienen aguas ricas en sulfuros, tienen la siguiente característica, ya que cuando estas aguas entran en contacto con O<sub>2</sub>, se promueve la oxidación microbiana generando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> que disuelve los carbonatos de las rocas y promueve la formación de cavernas. Si este efluente no es neutralizado por minerales básicos, toda la zona presenta fuerte acidez. El complejo de cuevas y cavernas en Frasassi Italia, es un ejemplo representativo de dichos sistemas. En sus aguas, con valores de pH entre 0 y 1, se han descrito biofilms formados por un número reducido de bacterias y arqueas acidófilas vinculadas al metabolismo del azufre.

Los sistemas subterráneos urbanos de aguas residuales pueden presentar una situación similar. Estas aguas son ricas en materia orgánica que puede tener cierto contenido de compuestos de azufre y sulfatos disueltos. Los procesos como la reducción disimilatoria de sulfatos y la desulfuración (producto de la hidrólisis de grupos tiol provenientes, por ejemplo, del aminoácido cisteína) generan H<sub>2</sub>S; éste puede ser oxidado a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por bacterias oxidantes de azufre que crecen formando biofilms en la superficie de los caños. La generación de ácido provoca la corrosión y la perforación de los caños y significa un grave problema para los sistemas de distribución de aguas residuales.<sup>16</sup>

Dentro de la región Arequipa, El Valle del Colca, reúne las características de un lugar extremófilo, ya que está ubicado dentro de un campo geotermal, dentro del lugar se encuentra el géiser Pinchollo, se caracterizan por contener altas concentraciones de minerales debido a su origen volcánico, además de las temperaturas altas registradas.

## 2.2 Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremófilos habitan ambientes que presentan condiciones extremas como altas temperaturas (>45 °C), alta salinidad (>1,0 M NaCl), pH variable

(>pH 8,5; < pH 5,0), temperaturas bajas (<15 °C), presión atmosférica (> 500 atm), entre otras. Estos microorganismos lo conforman los tres dominios de la vida, Bacteria, Arquea y Eukarya.

Los microorganismos termófilos, crecen óptimamente a altas temperaturas (60 °C a 110 °C), y han sido aislado de fuentes termales, áreas volcánicas, fumarolas, géiseres y sistemas hidrotermales marinos.<sup>17</sup>

Para describir una comunidad microbiana termófila de un campo geotermal se emplean técnicas moleculares que permiten identificar bacterias y arqueas. Los hipertermófilos más descritos en estos ambientes pertenecen al dominio bacteria y son *Aquifex pyrophilus* y *Thermotoga marítima*, crecen a 90 °C y 95 °C.

En contraparte el dominio Arquea alberga microorganismos que crecen a temperaturas entre 102 °C y 113 °C, aunque hay excepciones que también crecen a menor temperatura estas pertenecen al filo Crenarqueota (metabolizadores del azufre, nitrificantes) y Euryarqueota (metanógenos, halófilos). Otros miembros de Crenarqueota son los géneros *Pyrolobus*, *Pyrodictium*, *Hyperthermus*, *Pyrobaculum*, *Ignococcus* y *Stetteria*. Son miembros de Euryarqueota los géneros *Methanopyrus* y *Pyrococcus*.<sup>18</sup>

Las investigaciones acerca de microorganismos termófilos han tomado gran importancia debido a las aplicaciones que pueden tener nivel biotecnológico puesto que sus enzimas son estables a altas temperaturas. Un ejemplo lo constituye la ADN polimerasa (ADN pol), que fue obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus* aislada desde los géiseres del Parque Nacional Yellowstone (PNY) en los Estados Unidos. Después de ese hallazgo, se han descrito más enzimas que realizan su función a más de 100 °C (amilasas, galactosidasas, ADN polimerasa y pululanasa).<sup>19</sup>

En cuanto a aplicaciones biotecnológicas, la bacteria *Thermus thermophilus* constituye un microorganismo modelo para estudiar transformaciones naturales a 95 °C porque permite la sobreexpresión de enzimas y también se usa para la selección de mutantes termoestables a partir de proteínas mesófitas.<sup>20</sup>

Los hipertermófilos descritos recientemente y que pertenecen al filo Crenarqueota del dominio Arquea son similares a los de hace 3 billones de años, esta evolución lenta puede ser el resultado de habitar nichos sin competencia. Otros extremófilos, como

ciertos halófilos y psicrófilos parecen haber tenido modos de evolución más rápidos, ya que habitan que no son representativos de las condiciones iniciales de la tierra.<sup>21</sup>

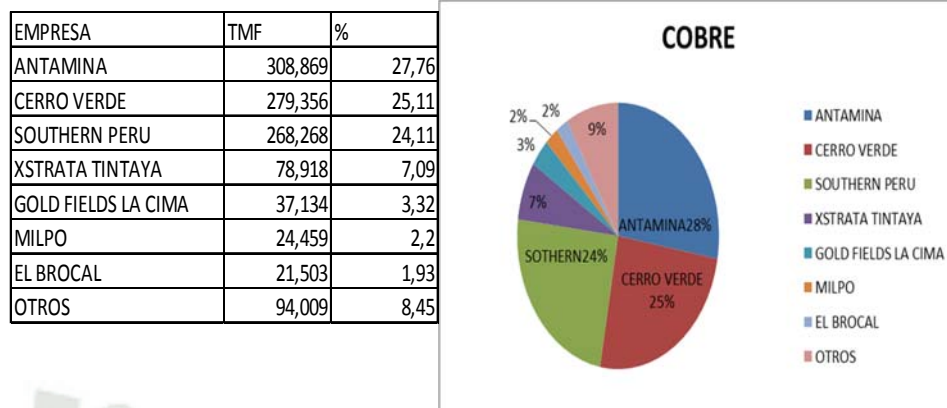
Durante mucho tiempo, la identificación de microorganismos ha dependido de la obtención de cultivos puros mediante la utilización de técnicas de aislamiento y purificación. Sin embargo, el organismo mejor adaptado en los cultivos de laboratorio a menudo es solo un componente minoritario del ecosistema microbiano.<sup>22</sup>

En un estudio realizado por Amann y Cols (1995) hace referencia que solo se llegan a cultivar el 1% del total de los microorganismos unicelulares de una muestra, en la gran mayoría de los casos. Hoy en día, la identificación empleando secuencias de ADN o ARN resulta ser sencilla y fiable. La filogenia microbiana se basa en la información que nos proporciona los ácidos nucleicos, particularmente el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S en procariotas y ARNr 18S en eucariotas). Por las técnicas de biología molecular permiten estudiar la diversidad de un ecosistema, así como también hacer estudios filogenéticos de los organismos que son parte de la comunidad.<sup>23</sup>

Dentro de los microorganismos termófilos son capaces de crecer a temperaturas superiores a los 45 °C.<sup>24</sup> Actualmente existe una clasificación dentro de este grupo donde los termófilos crecen a una temperatura óptima de 45 °C - 70 °C como *Bacillus acidocaldarius* y *Bacillus stearothermophilus*.

### 2.3 Metalurgia

El Perú es el tercer productor mundial de cobre y el 6,84% corresponde con la producción mundial. La producción de cobre en el Perú del 2006. La minería peruana está orientada principalmente al mercado externo y es el sector económico que más contribuye en la balanza comercial, con alrededor de 45% de las exportaciones totales. Sin embargo, dado su reducido encadenamiento productivo e intensidad de mano de obra, representa apenas entre 4 a 5% del PIB nacional y entre 2 a 3% del empleo del país, el Figura N°1, muestra los porcentaje de las empresas con respecto a la producción de cobre.<sup>25</sup>



**Figura N°1.** Fuente Boletín minero MINEM ,2011. Participación de empresas mineras con porcentajes de producción de cobre.

Además, Arequipa una región de mayor productividad en Cobre, tiene el distrito de Acarí que se ubica en el valle del mismo nombre a 167 m. s. n. m. (INEI 2007), siendo atravesado de norte a sur por el río Acarí. El medio ambiente de ésta zona se caracteriza por tener un clima semicálido, sin precipitaciones. Las temperaturas son del orden de los 19 °C promedio y las temperaturas extremas llegan a 9.5 °C. Los cultivos predominantes son el olivo (cultivo permanente), algodón y maíz. La actividad forestal en esta zona está poco difundida (no existe plantaciones masivas), solamente se aprecian cortinas rompe vientos para la protección de los cultivos.<sup>26</sup>

El área de evaluación para el proyecto, se encuentra dentro de la Eco región Desierto del Pacífico <sup>27</sup>. Se caracteriza por la ausencia de lluvias, siendo su terreno desértico. Hay vegetación solo en los valles fluviales y las lomas. De acuerdo a la ONERN (1976), el área se ubica en la zona de vida Desierto desecado Subtropical (dd-S). Corresponde a las planicies y partes bajas de los valles costeros, desde el nivel del mar hasta 1,800 metros de altura. El relieve topográfico es plano y ligeramente ondulado, variando a abrupto en los cerros aislados.

### **2.3.1 Mineralurgia.**

El beneficio de minerales comprende una serie de operaciones unitarias, entre ellas destaca un grupo que no ocasiona ningún tipo de cambios químicos en las especies mineralógicas que se encuentran en proceso. Estas operaciones se agrupan bajo el nombre genérico de operaciones mecánicas y son el objeto de estudio de la Mineralurgia.<sup>28</sup>

### **2.3.2 Reducción de tamaño.**

El mineral que se extrae desde un yacimiento está conformado por variadas especies mineralógicas. Algunas de ellas contienen el compuesto de valor, minerales de mena, pero otras especies no tienen utilidad desde el punto de vista de su valoración económica, mineral estéril o de ganga. Además es frecuente, y es el caso de los yacimientos de cobre, que los minerales en explotación sean de baja ley y que las partículas de mineral útil se encuentren diseminadas en una matriz de material estéril.<sup>29</sup>

Esta operación puede perseguir algunos de los siguientes objetivos:

- Liberar a las partículas de mineral útil de la matriz de ganga a fin que ellas puedan ser separadas en posteriores procesos de concentración.
- Aumentar la superficie expuesta de los minerales útiles.
- Uniformar el tamaño de las partículas.
- Modificar algunas de las propiedades, físicas o fisicoquímicas, que caracterizan a la superficie de las partículas.<sup>30</sup>

### **2.3.3 Concentración de minerales.**

En la etapa de concentración el mineral de alimentación, de baja ley, se separa a lo menos en dos fracciones, una de ellas contiene la especie útil y se denomina como concentrado y la otra contiene los materiales sin valor económico y se denomina como colas o relaves.

Los relaves mineros son desechos, subproductos de los procesos mineros, usualmente son una mezcla de tierra, minerales, agua y roca que contienen altas concentraciones de químicos.

Las variables de respuesta en una concentración son de dos órdenes, una se refiere a la calidad del concentrado, por ejemplo ley y/o contenido de impurezas.<sup>31</sup>

En la mayor parte de los procesos de beneficio el mineral se lleva a la forma de pulpa, mezclándolo con agua o con soluciones, de allí que una vez finalizado el tratamiento, o en alguna etapa intermedia si ello es conveniente, deban separarse los sólidos de los líquidos.<sup>32</sup>

#### 2.3.4 Operaciones de lixiviado

- Disolución, implica el paso de la(s) especie(s) de valor y parte de la ganga desde la mena a una solución.
  - Se han desarrollado experiencias operacionales a nivel industrial de lixiviación bacteriana por película delgada como también de rípios.<sup>33</sup>
  - Se toma la decisión de usar la vía de hidrometalurgia para recuperar las especies de valor comercial por el menor costo de instalación (aproximadamente 15 % con respecto a la inversión total de una planta) y operación que implica la obtención del producto intermedio y final, el mínimo impacto ambiental al entorno y la regeneración en la mayoría de los casos del agente lixivante.<sup>34</sup>
  - Recuperación, es decir, obtener la(s) especie(s) o elemento(s) de valor desde la solución.
  - Los procesos hidrometalúrgicos son relativamente lentos debido a que la especie que se encuentra al interior de la partícula debe difundir hacia el exterior por las fisuras producto de: La tronadura, la trituración o los planos de clivaje o fallas del mineral.<sup>35</sup>

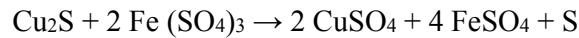
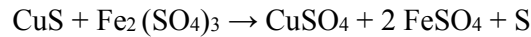
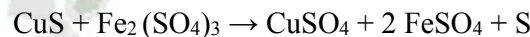
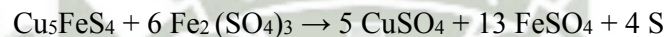
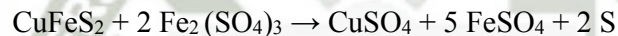
#### 2.3.5 Solventes lixiviantes

Entre los más comunes podemos mencionar:

- Sales en solución acuosa, tales como sulfato férrico usado en la lixiviación de minerales sulfurados de cobre.
- Ácidos, tales como el sulfúrico, nítrico y clorhídrico. En algunos casos el inoculo bacteriano.

Reacciones de lixiviación de minerales de cobre:

Especies sulfuradas<sup>36</sup>

**CALCOSITA: (Cu<sub>2</sub>S ; 79.8% Cu)****COVELITA: ( CuS ; 66.4% Cu)****BORNITA: (Cu<sub>5</sub>FeS<sub>4</sub> ; 63.3% Cu)****CALCOPIRITA: (CuFeS<sub>2</sub> ; 34.6% Cu)****2.4 Biooxidación bacteriana**

Lograr solubilización de algunas especies sulfuradas principalmente, y que está estrechamente ligada a la lixiviación in situ, in place, en botaderos y en pilas<sup>37,38</sup>.

**2.4.1 Microorganismos quimiolitótrofos responsables en el proceso de biooxidación**

Un detallado modelo de evolución orgánica, donde propusieron con base en el descubrimiento de ecosistemas de quimio autotróficos cerca de sistemas hidrotermales marinos, que la vida inició con nutrición quimio autotrófica sobre superficies de pirita situadas en medio ambiente volcánico o hidrotermal.

Sobre la superficie de la pirita, podrían haberse formado secuencialmente, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos con los productos, modificándose las reacciones primarias. Este proceso de crecimiento y retroalimentación, ejemplificando en la formación de lípidos en las membranas y células, caracteriza especialmente el enfoque de desarrollo.

También fue postulado una dinámica interrelación entre el organismo y el medio ambiente, con cambios ambientales transitorios (ejemplo: pH, temperatura, salinidad)

induciendo potencialmente alteraciones a largo plazo en los primeros organismos. La Tabla N°1, clasifica cada tipo de microorganismos con sus respectivos parámetros de crecimiento y los compuestos químicos que oxidan.

**Tabla N° 1. Tipos de bacterias que participan en la lixiviación de minerales**

Bacteria	Oxidán	Temperatura (°C)	pH
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Fe <sup>2+</sup> , S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	28-35	2.0-2.5
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , ZnS	28-30	2.0-3.5
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe <sup>2+</sup> , S <sup>0</sup>	25-35	2.0-3.0
<i>Thiobacillus organoparus</i>	S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	25-35	2.5-3.0
<i>Thiobacillus thioparus</i>	Fe <sup>2+</sup> , S <sup>0</sup>	28	6.6-7.2
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Fe <sup>2+</sup> , S <sup>0</sup>	40-50	2.0-3.0
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Fe <sup>2+</sup> , S <sup>0</sup>	70-75	2.0-3.0
<i>Sulfolobus brierleyi</i>		70-75	2.0-3.0
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		70-75	2.5-8
<i>Geobacillus</i>	Fe <sup>2+</sup> , aún en estudio	55-70	

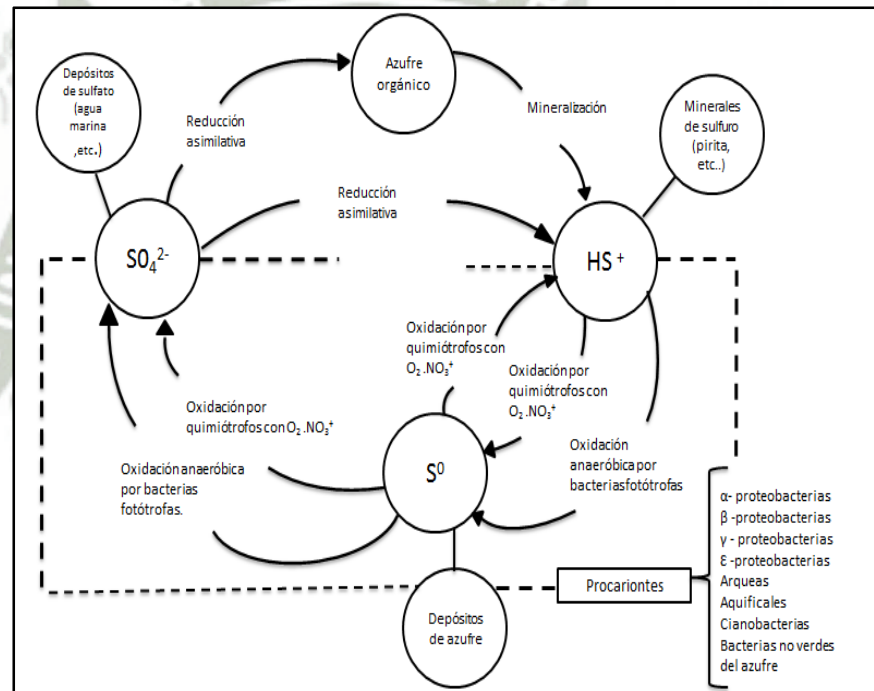
**Fuente: Elaboración propia**

Este tipo de lixiviación se debe a la presencia de bacterias que viven naturalmente en los minerales de cobre, cuya principal función es que ayudan o aceleran el paso del ión ferroso a férrico (*Thiobacillus ferrooxidans*) y del azufre elemental a ión sulfato (*Thiobacillus thiooxidans*). *Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria gram negativa quimiolitotrofa mesófila del género *Acidithiobacilli*.<sup>42</sup> Es la especie mayormente usada en biolixiviación junto con *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*.<sup>43</sup> Fue la primera bacteria descubierta capaz de oxidar minerales, se desarrolla en un rango de temperatura Temperatura ≤ 40 °C y pH entre 1.8-2.0,<sup>44</sup> puede crecer rápidamente en relación a otros microorganismos de la

biominería y es posible adaptarla para crecer fuera de su rango óptimo de temperatura ambiente.<sup>45</sup>

La oxidación de concentrados de pirita, arsenopirita, pirita, y calcopirita tienen mayor progresividad a temperaturas más altas que incluyeron *Sulfolobus brierleyi*, *Sulfolobus solfataricus*.

Estas bacterias obtienen la energía necesaria para su existencia de estas transformaciones (del intercambio de electrones), del oxígeno, nitrógeno y monóxido de carbono del aire y de condiciones de pH y temperatura del sistema como se ha mencionado, mostrado en la siguiente figura como un esquema representativo del ciclo del azufre. La Figura N°2, muestra un esquema representativo del ciclo del azufre con microorganismos quimiótrofos.



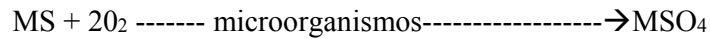
Fuente: Lens, P. N. L. y Kuenen, J. G. (2001).<sup>48</sup>

Figura N°2. Ciclo del azufre

## 2.5 Mecanismos de la biooxidación

La disolución de los elementos metálicos contenidos en los minerales puede deberse a procesos químicos o biológicos.

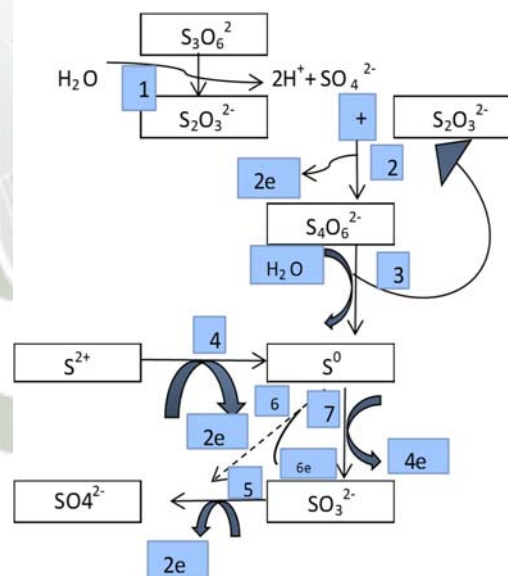
El segundo caso se trataría de un proceso de biolixiviación. Cuando el mineral que se quiere tratar es un sulfuro metálico (MS), la disolución del mismo se puede esquematizar con la siguiente reacción:



- M: mineral

El papel de los microorganismos es catalizar la reacción de disolución del sulfuro metálico, ya sea de forma directa o indirecta, aunque actualmente se acepta que ambos mecanismos influyen de manera simultánea en la solubilización de los minerales.

Estos procesos suponen complejas interacciones entre los microorganismos, los substratos y el medio. La Figura N°3 muestra las enzimas involucradas en el mecanismo de oxidación de compuesto de azufre.



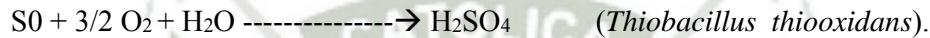
**Figura N°3.** Oxidación de compuestos de azufre *Thiobacillus ferrooxidans*, enzimas que participan en la ruta 1. titionato hidrolasa, 2. tiosulfato deshidrogenasa, 3. tetrationato hidrolasa, 5: enzima sulfito oxidante, 4, 6, 7: aún en estudio.

### 2.5.1 Mecanismo directo

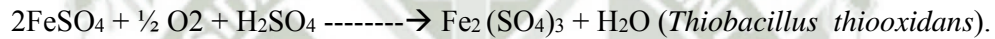
En este caso, se produce, por un contacto físico entre el mineral y el microorganismo lixiviante. Las bacterias tienen que fijarse a la superficie del mineral donde se produce el ataque de los sulfuros metálicos. En el caso de la pirita, la transformación de la teoría de la lixiviación directa ha sido corroborada por diversos estudios experimentales. En este sentido, <sup>51</sup> encontraron alguna evidencia de que el género *Thiobacillus* secretaban algunas sustancias que podrían ayudar al ataque.

Acción o Lixiviación Directa:

Bacteria



Bacteria



Industrialmente, en el caso del cobre, la lixiviación bacteriana se aplica preferentemente en la explotación de minerales de leyes bajas e intermedias, realizándose este proceso en botaderos y pilas. Este proceso tiene la ventaja que las inversiones de capital y los costos de operación son relativamente bajos. Sin embargo, necesita tiempos largos, desde varios meses a años, para extraer el metal con recuperaciones aceptables.<sup>52</sup>

### 2.5.2 Mecanismo indirecto

En este caso, el verdadero agente oxidante son los metabolitos procedentes de la acción bacteriana y especialmente el ión férrico que oxida a los sulfuros metálicos reduciéndose a su vez al estado de ión ferroso. Así mismo, tiene gran importancia el ácido sulfúrico creado por las bacterias y que contribuye a acidificar el medio generando las adecuadas condiciones lixiviantes.

Esto se podría esquematizar mediante la siguiente reacción:

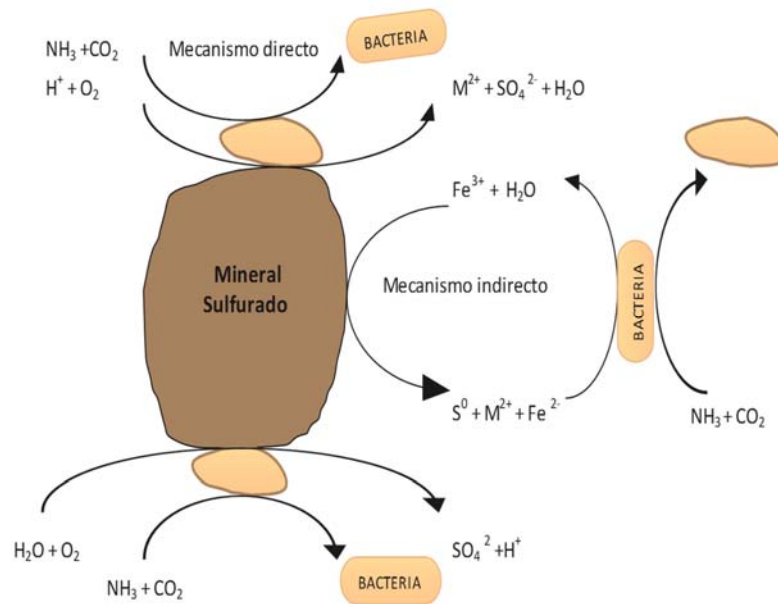


En los últimos años, distintos investigadores han profundizado en esta línea de investigación para tratar de aclarar, sobretodo en la Universidad de Hamburgo (Alemania). Se apoya en técnicas experimentales avanzadas para el análisis de los productos de degradación de degradación que se generan en el ataque de distintos sulfuros minerales y en análisis de Sustancias Poliméricas Extracelulares (SPE) que permiten la adherencia de las bacterias a los sólidos, así como la formación de biopelículas. Estos nuevos experimentos, junto con el conocimiento acumulado durante años, se llevan a proponer un modelo integral de biolixiviación que se resume en lo siguiente.<sup>53</sup>

### 2.5.3 Rol de los microorganismos en procesos de biooxidación

Concentrarlos en la inter fase mineral/célula bacteriana para favorecer y aumentar la degradación del mineral. Consideran entonces que hay un factor determinante: la formación de una capa muy fina de exopolímeros, el glicocálix, con un espesor del orden de nanómetros, que rodea a las células. En esta capa, se postula que tiene lugar los procesos químicos que llevan a la degradación del sulfuro. La catálisis del proceso en presencia de bacterias, en comparación con el proceso químico convencional, se explica por la alta concentración de agentes de lixiviación que se llega a alcanzar en la interfase citada. Además, el modelo no contempla la aparición de enzimas u otras sustancias biológicas que hasta la fecha no han sido detectadas. Basándose en las sustancias intermedias ya detectadas, este grupo de investigadores diferencian dos mecanismos indirectos: uno vía tiosulfato y otro vía polisulfuro, los cuales se describirán a continuación.<sup>54</sup>

La Figura N°4, muestra un esquema representativo de los dos mecanismos de interacción que tienen los microorganismos con el mineral.



**Figura N°4.** Mecanismos directo e indirecto de biolixiviación; según Rodríguez<sup>55</sup>

## 2.5.4 Factores que influyen en la actividad bacteriana y el proceso de biooxidación

El papel que juegan los factores ambientales, biológicos y fisicoquímicos sobre el desarrollo de los microorganismos es fundamental en el rendimiento de extracción de metales en el proceso de biooxidación.<sup>56,57</sup>

### 2.5.4.1 pH y Potencial Redox (Eh)

Este define que bacterias se desarrollaran en el medio. Las bacterias que participan en la biolixiviación son acidófilas por lo que se desarrollan en un rango de pH de 1.5 a 3.5. Otra consideración que puede determinar el pH en la operación es la formación precipitados como la jarosita, la cual se genera a valores de pH mayor a 2 y dificulta la oxidación de los sulfuros del mineral.

El Potencial Redox es otro factor importante, que condiciona tanto la actividad microbiana como la oxidación química de los sulfuros, la extracción de los sulfuros alcanza mayores velocidades una vez que el Eh de la solución básica supera los 450 mV.

#### 2.5.4.2 Temperatura

Los microorganismos se clasifican de acuerdo al rango de temperatura en el cual pueden sobrevivir en mesófilos (rango óptimo entre 25 °C a 40 °C), termófilos (50 °C) moderados y termófilos (70 °C).

Un efecto adicional de las temperaturas elevadas es la disminución de la velocidad de transferencia de oxígeno puesto que la solubilidad de gases disminuye con la temperatura, pero acelera la cinética de oxidación mediante una reacción termodinámica.

#### 2.5.4.3 Oxígeno y dióxido de carbono

La mayoría de las bacterias biooxidantes son aerobias, el aire aporta oxígeno (O<sub>2</sub>) el cual actúa como aceptor final en las reacciones metabólicas (oxidación de compuestos inorgánicos como ión ferroso y azufre reducido) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), como fuente del mismo elemento para la generación de biomasa. Estos gases deben ser proporcionados a velocidades suficientes al sistema de biooxidación para cumplir con las demandas de la población celular pudiendo ser inyectado al medio mediante sistema de ventiladores a baja presión tal como el caso de las pilas o burbujeando aire al fondo de los bioreactores.

En el caso de microorganismos termófilos, la mayoría son anaerobios debido a la poca oxigenación de su ecosistema.

#### 2.5.4.4 Nutrientes e inhibidores

Debido a la característica de quimiolitioautótrofa, obtienen el carbono del CO<sub>2</sub> y la energía de oxidación de un compuesto inorgánico (que pueden obtener del mismo mineral), los otros elementos básicos para la nutrición de estos microorganismos deben estar contenidos en el medio cultivo en forma de sales, los más importantes cuantitativamente son el nitrógeno, generalmente como sal de amonio, el magnesio (sulfato de magnesio), el fósforo (fosfato ácido de potasio) e iones metálicos en cantidades menores; El medio de cultivo más utilizado para el crecimiento de las bacterias biooxidantes es el medio denominado 9K-Fe<sup>58</sup>, el cual se ha ido modificando para minimizar la formación de jarosita.

Durante el proceso de biooxidación, se acumulan metales pesados como zinc, arsénico y hierro en la solución, que a ciertas concentraciones pueden ser tóxicos para

los microorganismos. La formación de precipitados férricos como la jarosita es otro inhibidor.

#### **2.5.4.5 Mineral y tamaño de partícula**

Los minerales como calcopirita que son recalcitrantes al ataque químico y ofrecen gran resistencia a la oxidación microbiana.

Es el tamaño otro parámetro a considerar debido a los costos asociados a la molienda y su influencia en la velocidad de extracción del metal. A menor tamaño de la partícula de mineral, mayor es el área de contacto que tiene el microorganismo, haciendo más efectiva la biooxidación.<sup>59</sup>

### **2.6 Microorganismos termófilos en procesos de biooxidación**

Dentro de los microorganismos que actúan en procesos de biooxidación es imprescindible hacer una mención especial de los microorganismos termófilos. Cada día cobra más fuerza la idea de su utilización como solución a los problemas que actualmente presentan los sistemas de biolixiviación, ya que el aumento de la temperatura conlleva una aceleración de la cinética química del proceso.

En general, el grupo de microorganismos termófilos presenta como problema, para su posible aplicación, la gran sensibilidad de su membrana frente a fenómenos de atrición. Esto obliga a trabajar, en procesos de lixiviación dinámica (reactores), con densidades de pulpa menores que las utilizadas en ensayos con microorganismos mesófilos. El uso de estas bacterias no debería, estar restringido a condiciones de laboratorio o a reactores controlados, puesto que diversos autores comprobaron la existencia en el interior de los montones de lixiviación de temperaturas con valores que oscilan entre los 50 y los 80 °C<sup>60,61</sup>.

Así, se han aislado en estos montones diversos microorganismos termófilos<sup>62,63</sup> con reconocida capacidad lixivante.

### **2.7 Bioreactores**

La atención adecuada se debe prestar a la naturaleza compleja de los lodos reaccionar, compuesta por un líquido acuoso, células en suspensión y adjuntos, sólidos en suspensión, y el aire burbujas<sup>64</sup>. Debido a los grandes volúmenes de material a procesar, biolixiviación y biooxidación se realizan mejor en un modo continuo de

operación en la que volumétrica la productividad es alta y volúmenes de reactor se puede mantener bajo. También Considerando las características cinéticas de microbiana.

Un reactor continuo de tanque agitado, CSTR, aparece como la primera opción.

En procesos de biolixiviación las especies minerales involucrados suelen ser recalcitrantes a la acción microbiana, lo que implica que la afinidad es bastante baja. El sustrato-afinidad microorganismo está relacionada con la saturación de Monod constante,  $K_s$  (Monod, 1949). Altas afinidades se reflejan en los valores de  $K_s$  bajas, del orden de unos pocos miligramos por litros, como en el caso de la mayoría de los azúcares.

Algunos minerales tienen constantes de hasta 3 a 6 g / L, que es la saturación, esta situación afecta a la selección del reactor. Si un alto grado de conversión que se desea, un solo tanque agitado requerirá un volumen muy grande, por lo que una disposición de reactores ser más adecuado <sup>65</sup>. Se puede demostrar que una CSTR seguido por un reactor de flujo de pistón tubular, PFTR, da el volumen de reacción mínimo para alcanzar un cierto conversión <sup>66</sup>. Debido a la necesidad de aireación y la presencia de partículas sólidas hace PFTR poco práctico, su rendimiento puede ser aproximado por una serie de CSTR <sup>67</sup>. Otros tipos de reactores que han sido estudiados por su aplicación en biominería son la columna de la percolación, la Tanque de Pachuca, la columna de aire comprimido, y algunos especiales diseños, tales como reactores rotatorios <sup>68,69,70,71,72,73,74,75,76,77</sup>.

## 2.8 Aplicación de la bioinformática para identificación de microorganismos

Las técnicas de cultivo independientes permiten el análisis exhaustivo de las poblaciones microbianas en aguas termales. Estos planteamientos implican el uso de la amplificación del gen ARNr 16S (Adrados et al., 2014).

El gen ARNr 16S, es un poli ribonucleico, a partir de cuya secuenciación genética se puede obtener información filogenética y taxonómica. Tiene las siguientes características:

- Está presente en todos los organismos y tiene la misma función en todos. Debido a que es un gen altamente conservado, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen variaciones que se concentran en zonas específicas.

- La presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos base, se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un grupo determinado, es por ello que puede utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo.

- Es una herramienta importante para deducir la filogenia, la evolución y la relación entre bacterias, arqueobacterias y organismos eucariotas.

El análisis de secuenciamiento (Thompson et al., 2007) se ha convertido en una herramienta de gran alcance, tanto para la aclaración de la biodiversidad de las muestras complejas y para el estudio de las vías metabólicas.

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S ha facilitado grandemente la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables y la elucidación de sus relaciones naturales, consecuentemente estas pueden ser utilizadas para establecer las relaciones filogenéticas y existentes entre los organismos procariontas.

La amplificación del gen, parte preferentemente del ADN extraído de un cultivo puro de la bacteria, pero también puede conseguirse directamente de una muestra.

El enfoque basado metagenómica del gen 16S parcial (conocida alternativamente como objetivo o metagenómica amplicón) ha sido utilizado a nivel mundial, no sólo para el estudio microbiota residente en aguas termales (Inskeep et al., 2013), sino también para el estudio de las aguas costeras (Somboonna et al., 2012), las muestras de suelo (Fierer et al., 2012), las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (Cai et al., 2013).

- Análisis bioinformático de secuencias ; según la definición del National Center for Biotechnology information (NCBI), las secuencias depositadas en la base de datos disponibles, utilizando herramientas como Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul y col, 1999) y Clustal W(Thompson y col ..1904).

El alineamiento es una herramienta cualitativa que permite dar los primeros pasos hacia la conclusión de que dos o más secuencias son homologas y consiste en hacer coincidir las secuencias en aquellas regiones en las que se repitan el mayor número de monómeros (caracteres) posibles. Esta técnica aparentemente sencilla se hace más

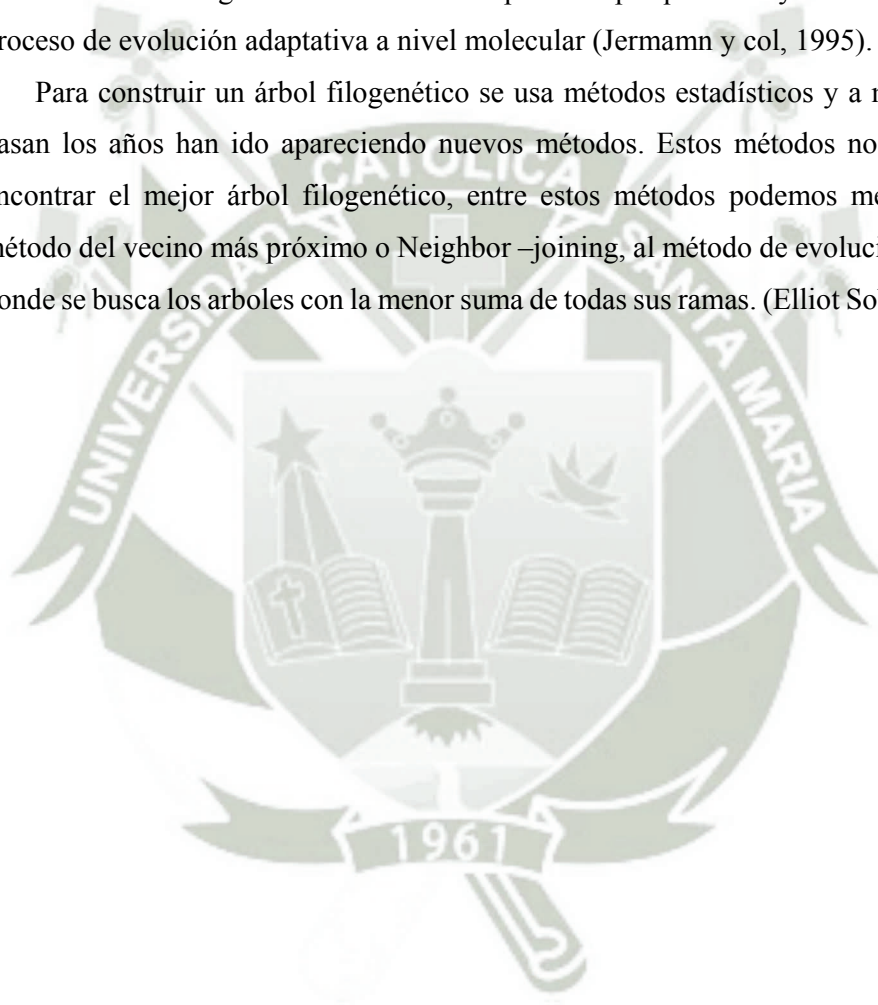
compleja en la medida en que el tamaño de las secuencias a comparar es mayor y más aún cuando se comparan más de dos secuencias.

Árboles filogenéticos

El análisis filogenético de DNA o de secuencias de proteínas se ha vuelto una de las importantes herramientas para estudiar la historia de la evolución de los organismos desde bacterias hasta humanos, pudiendo estudiar las reacciones evolutivas entre especies y la clasificación de estos organismos en familia, género o especie.

El análisis filogenético además es importante porque nos ayuda a entender el proceso de evolución adaptativa a nivel molecular (Jermann y col, 1995).

Para construir un árbol filogenético se usa métodos estadísticos y a medida que pasan los años han ido apareciendo nuevos métodos. Estos métodos nos ayudan a encontrar el mejor árbol filogenético, entre estos métodos podemos mencionar al método del vecino más próximo o Neighbor-joining, al método de evolución mínima donde se busca los arboles con la menor suma de todas sus ramas. (Elliot Sober , 1998).



## CAPÍTULO III

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de ejecución

El trabajo de tesis fue ejecutado en el Laboratorio de Biominería de la Universidad de Antofagasta y los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

#### 3.2 Materiales

- Insumos
  - Sedimentos de campo geotermal Valle del Colca.
  - Mineral sulfurado, procedente de Acarí.
  - Ácido sulfúrico.
  - Agua desionizada.
  - Medios de cultivo 9K-Fe, medio mínimo de sales, medio tiosulfato, medio *Thermus thermophilus* DSMZ 579, medio LB, medio para almidón, medio para celulasas, medio para proteasas.
- Reactivos
  - Agar-agar
  - Agarosa
  - Phytigel
  - Agua destilada
  - Agua mar
  - Cristal violeta
  - Solución cristal violeta (0.1 g), alcohol 95° (20 mL), agua destilada (100 mL)
  - Solución de lugol : yodo en cristales (1.0 g) , yoduro de potasio (2.0 g), agua destilada (100 mL)
  - Decolorantes: acetona (50 mL), etanol (50 mL)
  - Safranina: safranina (0,25 g), alcohol 95°(10 mL), agua destilada (100 mL)
  - Ácido sulfúrico

- Ácido nítrico
- Buffer fosfato
- Fosfato dipotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Extracto de levadura
- Peptona
- Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ )
- Fosfato de sodio ( $\text{NaHPO}_4$ )
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )
- Cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ )
- Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )
- Tiosulfato de sodio ( $\text{NaSO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- Buffer color Green 5X
- Primer Foward y Reverse
- Taq Polimerasa
- Nucleótidos d NTPs
- Cloruro de calcio ( $\text{Ca Cl}$ )
- Coarboxil metil celulosa (CMC)
- Agar nutritivo
- Nitrato de calcio ( $\text{Ca} (\text{NO}_3)_2$ )
- Kit PowerSoil DNA Isolation Kit MOBIO
- Sybergreen
- TAE(1X)
- Equipos de laboratorio
  - Multiparámetro HANNA HI 1953
  - Vórtex Analog vortex mixer VWR
  - Centrifugadora Thermo IEC
  - Microscopio binocular de campo claro ARQUIMED
  - Autoclave vertical FRAVILL
  - Balanza Analítica OHAUS
  - Refrigerador Daewoo
  - Termociclador MJ mini personal thermal cycler

- Cámara electroforética BioRad
- Hot plate Selecta Rotaterm
- Chancadora de mandíbula tipo Blake
- Molino de anillo ESSA trituradora de discos vibrantes para laboratorio
- Transiluminador HEROLAB
- Equipo de baño María BOECO Germany
- Cocina BOSCH
- Incubadora LAB INCUBATOR MODEL IN-010
- Equipo de adsorción atómica
- Material de vidrio de laboratorio
  - Tubo de ensayo (13x100 mm, 16 x 15 mm)
  - Matraz enlermeyer (500 mL, 250 ml, 100 mL)
  - Placas petri (15x100 mm, 15 x 80 mm)
  - Pipetas (2 mL, 5 mL, 10 mL)
  - Probetas (100 mL)
  - Láminas portaobjetos
  - Láminas cubreobjetos
  - Viales de 10 mL
  - Cámara de Neubauer BOECO
  - Botellas tapa azul PYREX de 250 mL, 500 mL y 1L
- Otros materiales
  - Mechero
  - Propipeta
  - Asa de Kolle
  - Micropipeta
  - Tips amarillos, azules
  - Incubadoras de 50 °C y 70 °C (elaboración propia)
  - Micropipeta
  - Gradilla
  - Termómetro de mercurio
  - Agitadores de INOX (elaboración propia)
  - Recipientes de aislamiento térmico

- Cooler
- Parafilm
- Tapones de algodón
- Bolsas Ziploc
- Cuchillos, cucharones
- Alcohol
- Algodón

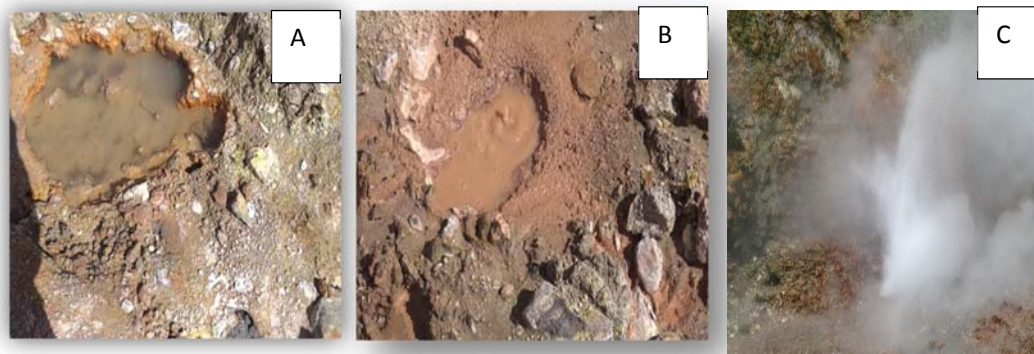
### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Obtención de muestra

El área de estudio comprendió la zona geotermal, Valle del Colca, ubicada en la provincia de Arequipa, al Sur del Perú localizado entre las coordenadas 188000 y 231800 Este y 8284000 y 8256000 Norte .Con altitudes entre 3200 (Rio Colca) y 400 (géiser Pinchollo).con una superficie de 1 225 km<sup>2</sup>.<sup>78</sup>

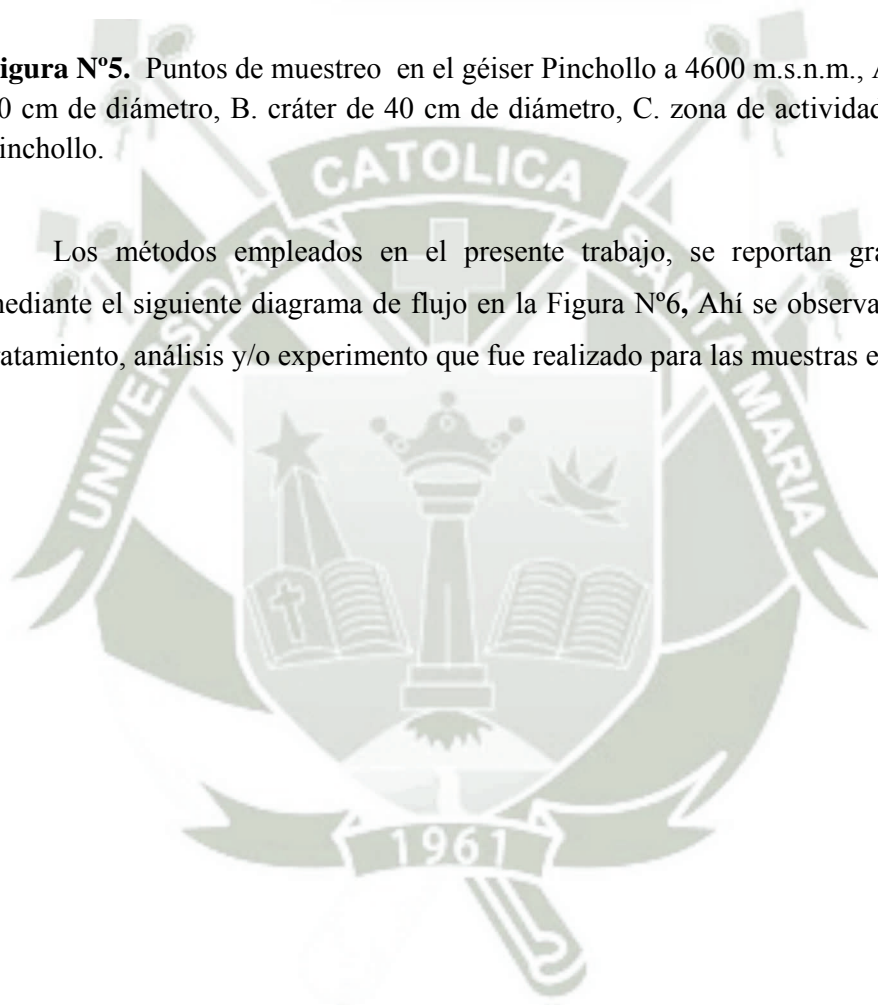
Las muestras colectadas fueron sedimentos del géiser Pinchollo, el cual se encuentra a 4600 m.s.n.m. En esta zona se encuentran diversos cráteres formados generados por fisuras de origen volcánico. Se realizaron tres muestreos, tomando como referencia el color ocre y anaranjado característico de la oxidación del ión Fe<sup>+2</sup>, se recolectaron de tres cráteres de 90 cm, 40 cm de diámetro y dentro de la zona en actividad del géiser Pinchollo. Se tomaron aproximadamente 300 gr de sólidos húmedos, tanto de los bordes de cada cráter con una profundidad de 30 cm y del centro con profundidad de 40 cm, las muestras sólidas se almacenaron en viales resistentes máximo a temperatura de 80 °C guardados en un cooler herméticamente cerrado, manteniendo excelentes características de aislamiento térmico.

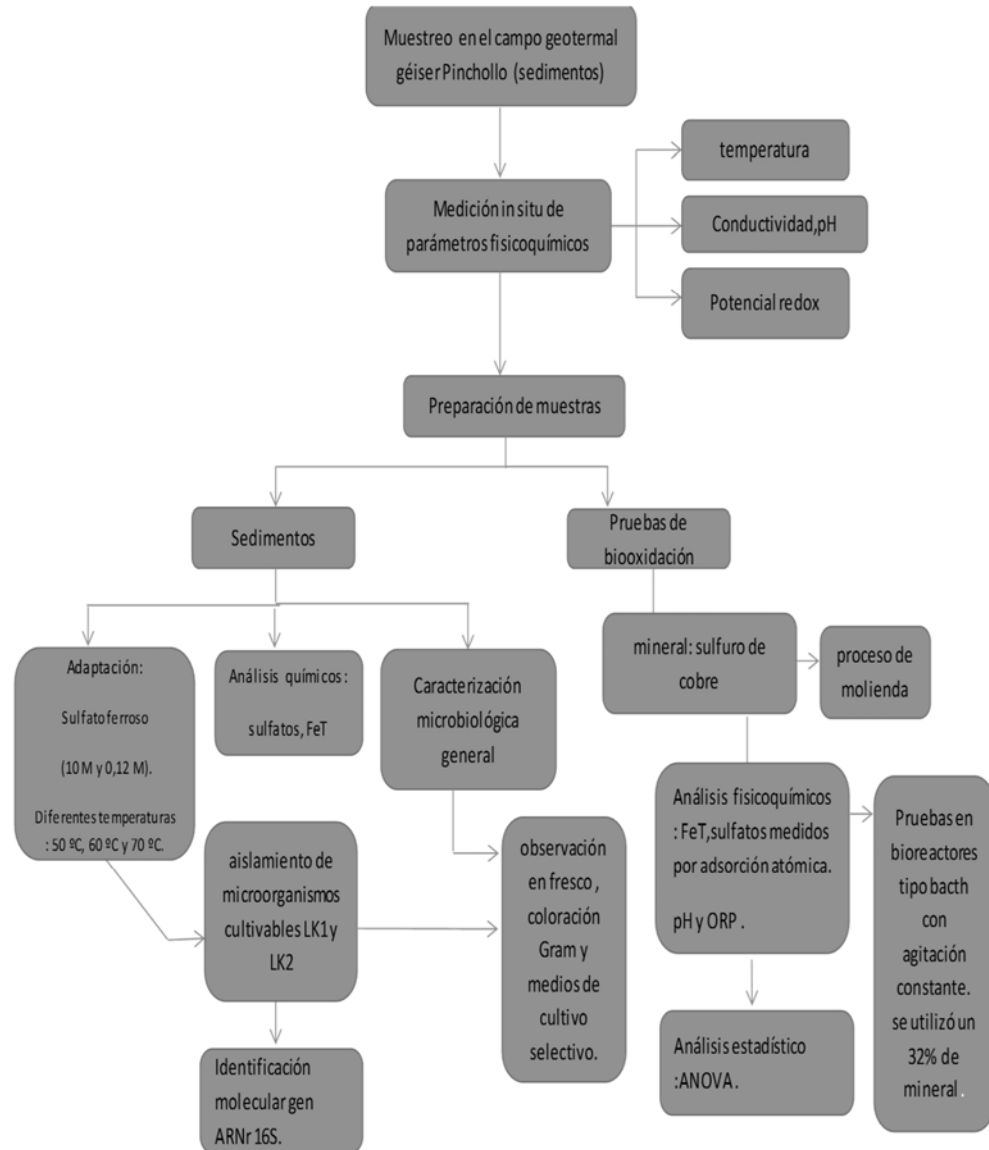
Los sedimentos recolectados, mostraron un registro de altas temperaturas que oscilaban desde 45 hasta 80 °C, se midió la conductividad obteniendo un valor de 480 mV, un pH desde 3 hasta 7, FeT y sulfatos. La Figura N°5, muestra las imágenes tomadas de cada punto de muestreos cercanos al géiser Pinchollo.



**Figura N°5.** Puntos de muestreo en el géiser Pinchollo a 4600 m.s.n.m., A. cráter de 90 cm de diámetro, B. cráter de 40 cm de diámetro, C. zona de actividad del géiser Pinchollo.

Los métodos empleados en el presente trabajo, se reportan gráficamente mediante el siguiente diagrama de flujo en la Figura N°6, Ahí se observa el tipo de tratamiento, análisis y/o experimento que fue realizado para las muestras estudiadas.





*Fuente: Elaboración propia*

**Figura N°6.** Esquematación de la metodología utilizada.

### 3.3.2 Caracterización microbiológica de las muestras

#### 3.3.2.1 Procesamiento de las muestras

Se rotuló cada una de las muestras, con sus respectivas codificaciones.

Se realizó una homogenización manual durante un minuto a cada muestra, luego se dejó reposar para obtener una fase suspendida generada por la humedad

propia de los sólidos recolectados. Después de haber quedado una fase suspendida, se tomó la suspensión con una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$ , depositando en un eppendorf, debidamente rotulado.

### 3.3.2.2 Observación al fresco

Se tomó de la fase sobrenadante 10 $\mu\text{L}$  de volumen, colocando sobre una lámina porta objeto, luego se observó en el microscopio, antes primero se limpió los lentes del microscopio, luego se enfocó en los siguientes aumentos 10 X, 40 X y finalmente enfocado se agregó una gota de aceite de inmersión en el cubreobjetos que dio un aumento de 100X y se observó las muestras.

Después se centrifugó a 8000 rpm por 15 minutos, para obtener biomasa en el fondo del eppendorf, eliminando la fase sobrenadante. Se quedó solo con la biomasa sedimentada, la cual se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

### 3.3.2.3 Tinción Gram

- Se tomó una microgota de 10  $\mu\text{L}$  de la dilución, para colocarla en una lámina portaobjetos, se fijó al calor.
- Primero se agregó una gota de cristal violeta, se dejó reposar durante 1 minuto aproximadamente, luego se lavó con agua destilada.
- Se agregó una gota de lugol como mordiente durante 1 minuto. Luego se lavó con agua destilada.
- Se agregó unas gotas de alcohol acetona, esperando unos 40 segundos y se procedió a lavar con agua destilada.
- Por último se agregó unas gotas de safranina se esperó 30 segundos y se volvió a lavar, se esperó que se secase a temperatura ambiente, para la observación al microscopio.

### 3.3.2.4 Caracterización macroscópica

Se realizó un enriquecimiento de las muestras colectadas de los sedimentos para evaluar toda la biodiversidad procariota termófila cultivable en medios de enriquecimiento, en medio LB y para evaluar la producción de enzimas se prepararon de acuerdo para cada enzima. Se sembró por la técnica de agotamiento.

Se preparó medio Agar LB, como medio general y se sembró por agotamiento. Con la finalidad de generar un primer reporte sobre la caracterización microbiológica del campo geotermal del Valle del Colca.

### **3.3.3 Pruebas Enzimáticas**

Preparación de medios de cultivos:

#### **3.3.3.1 Amilasas**

Se preparó un volumen de 100 mL medio sólido para amilasas que contiene Almidón 1 %, extracto de Levadura 0,2%, peptona 2%, sulfato de magnesio 0,05 %, agar agar 1.7 %, se ajustó a un pH 7, esterilizando a vapor a 121°C.

Se aisló en medio sólido para amilasas un total de 5 placas, para realizar la siembra por la técnica de agotamiento tomado del inóculo enriquecido en el medio LB. Se incubó por 72 horas a 60 °C en la incubadora.

Para realizar las pruebas de microorganismos aminolíticos, se agregó unas gotas de yodo al 0,5 %, previamente esterilizado agregadas sobre las colonias crecidas. En el Anexo N°10 se observa la preparación de los medios para las pruebas enzimáticas.

#### **3.3.3.2 Celulasas**

Se preparó un volumen de 100 mL medio sólido para celulasas que contiene 1% de Carboximetilcelulasa, 0,5% de extracto de levadura 0,5 % de peptona y 0,015% de sales, ajustando con buffer a pH 7, esterilizando a vapor a 121°C.

Se tomaron 10 µl del inóculo enriquecido en el medio LB y se sembraron por agotamiento. Se incubó por 48 horas a 60 °C de temperatura, en la incubadora.

Para observar la producción de celulasa se realizó con rojo fenol (Halo amarillento).

### 3.3.4 Adaptación en medio ácido con $\text{Fe}_2\text{SO}_4$ a diferentes temperaturas y Aislamiento de los cultivos microbianos

Primero se realizó un enriquecimiento de la biodiversidad procarionta termófila a partir de los sedimentos recolectados, agregando el 1% (p/v) de cada muestra de sedimento, en un matraz un volumen 250 mL de medio LB incubado a 65 °C en la incubadora por 72 h para la proliferación de biomasa de todos los sedimentos.

Para la Adaptación, primero se realizó la preparación de dos medios de cultivo selectivos para microorganismos quimiolitótrofos, en un volumen de 500 mL de medio 9k-Fe con una concentración de 0,12 M de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y el medio denominado Medio mínimo de sales con una concentración de 0,012M de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

El medio 9k-Fe 0,12 M de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , modificado por el laboratorio de biominería, Antofagasta, se preparó tomando 2 soluciones por separado; Solución A: la siguiente composición; 0,04 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,15 g/L  $\text{MgSO}_4$ , 0,15 g/L  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 0,75 g/L de KCl, para un volumen de 1000mL, se dispone el pesaje y disolución de las sales en una botella graduada con un volumen de 900 mL de agua destilada el medio es autoclavado a 121 °C por 20 minutos; la solución B: en matraz de 250 mL con volumen 100 mL de agua se adiciona y disuelve 33,3 g/L el  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  bajando el pH hasta 3 en el medio, se realizó la filtración, en otro matraz estéril mediante el uso de filtros de 0.2  $\mu\text{m}$  (milipore), con el fin de eliminar impurezas, cuando la solución A alcanza una temperatura alrededor de 50 °C la solución B es incorporada cuidadosamente y bajo campana a la botella graduada y posteriormente el pH del medio fue ajustado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , hasta un pH 3. Se fue adecuando el medio 9k líquido a una temperatura entre 50, 60 y 70°C.

El medio mínimo de sales con una concentración de 0,012 M de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , se preparó de igual manera que el medio 9k-Fe, tomando la solución A, la solución B con una concentración de 0,012 M disolviendo 3,3 g/L de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , complementando con una solución C : 1 mL de complejo B para 1000 mL

Para evaluar la temperatura óptima de crecimiento y el medio óptimo para la crecimiento celular, se tomó un volumen de 100 mL de cada medio preparado 0,12 M y 0,012 M respectivamente. Se agregó el 10 % (v/v) de las muestras enriquecidas previamente en medio LB, incubando a 50 °C, 60°C y 70 °C, en el Hot air incubator, por un periodo de 15 días aproximadamente, con agitación manual para evitar

sedimentar las muestras. Este tipo de incubadoras hot air, automáticamente se autorregula la temperatura ya que todo está cerrado herméticamente y medido por sensores.

Para el aislamiento de los microorganismos que conforman el consorcio bacteriano, se preparó el medio sólido que contiene el medio mínimo de sales con 2% de phytigel. Se sembró por la técnica de incorporación agregando 1mL de las muestras adaptadas en los medios 9k-Fe 0,12 M de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,012 M de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sobre la placa, agregando un volumen aproximadamente de 12mL del medio solidificándose a temperatura ambiente, se incubó a 70 °C durante una semana. Para evitar que se consuma el medio sólido por el calor se selló con plástico los bordes de las placas.

Las colonias crecidas fueron conservadas a -20 °C en viales que contienen el medio mínimo de sales con 2% de phytigel. Para el posterior análisis molecular.

### **3.3.5 Producción de biomasa (consorcio LK)**

Para la producción de biomasa se tomó las colonias crecidas formando un pellet celular de las dos cepas aisladas a las cuales se las denominó LK1 y LK2.

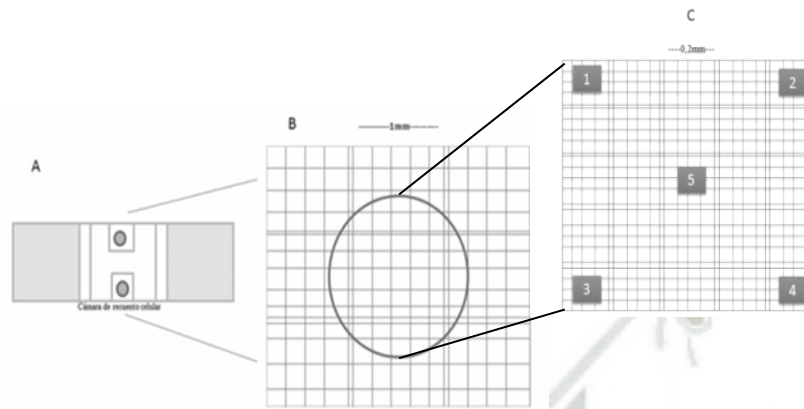
El pellet celular, se disolvió en dos matraces que contenían un volumen de 250 mL de medio mínimo de sales<sup>79</sup>, se incubó en dos hot plates a 120 rpm a 70 °C de temperatura, durante 30 días.

### **3.3.6 Medición del crecimiento celular**

Para evaluar el crecimiento del consorcio se hizo el conteo en la cámara de Neubauer por duplicado siguiendo el protocolo de MADIGAN M. 2012.

Para evitar la observación de contaminantes o sedimentos formados por el propio medio, se hizo una filtración por gravedad, se sacó un volumen de 1,5mL añadiendo en un tubo eppendorf, de 1.5 mL. Se centrifugó a 800 rpm por 3 minutos para eliminar los precipitados de la oxidación del medio de cultivo, luego se traspasó un volumen de 800  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que contiene las células suspendida a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Se volvió a centrifugar para tener mayor concentración de células y menos contaminantes a 8000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Se incubó a 70 °C durante 5 minutos para activar los microorganismos termófilos, luego el pellet resultante se resuspendió, para luego ser

añadido 10  $\mu\text{L}$  a la cámara de Neubauer y se observó al microscopio a 40X de aumento. En la Figura N°7, muestra la esquematización del conteo de microorganismos procariotas.



**Figura N°7.** Cámara de Neubauer y sus divisiones. (A) Cámara de Neubauer. (B) vista panorámica de los cuadrantes. (C) Cuadrante central.

Procedimiento de conteo microscópico directo Según Madigan M. 2012, la ecuación utilizada es:

$$\text{Cel/mL} = \text{promedio de bacterias en los 5 cuadrantes} \times R \times C \times D \times 25$$

$$R: \text{inversa del volumen de la cámara de Neubauer } (0,1 \text{ mm}^3) = 10 \text{ mm}^3$$

$$C: \text{factor de conversión de } \text{mm}^3 \text{ a mL} = 10^3.$$

### 3.3.7 Análisis de parámetros fisicoquímicos

#### 3.3.7.1 Determinación de pH

Se utilizó el equipo HI9126 –HANNA, primero se hizo la calibración, luego se verificó que el electrodo de electrolito gel este limpio, el electrodo fue sumergido en el medio de cultivo para la evaluación respectiva.

#### 3.3.7.2 Determinación de potencial redox

Se utilizó el equipo HI9126 –HANNA, primero se hizo la calibración, luego se verifico que el electrodo de electrolito gel con punta de platino este limpio, realizando la medición respectiva en el medio que contiene el inóculo.

### 3.3.7.3 Determinación de temperatura

Se hizo la medición con un termómetro de mercurio, en un periodo de cada 24 horas, solo para la confirmación.

### 3.3.8 Pruebas de biooxidación

Tras haber obtenido el consorcio adaptado en medio ácido con sulfato ferroso, se procedió al estudio de biooxidación en mineral sulfurado.

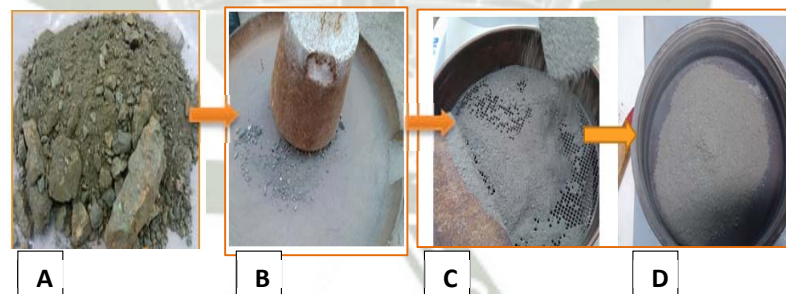
#### 3.3.8.1 Preparación del mineral

Las muestras trabajadas fue sulfuro de cobre de alta ley, proveniente de la mina “La Verde” del distrito de Acarí-Caravelí-Arequipa.

#### 3.3.8.2 Concentraciones de cobre, sulfato, FeT.

Antes de realizar las pruebas de biooxidación, se hizo un pretratamiento del mineral. Se realizó el proceso de molienda, primero se realizó en un batan previamente ambientado con arena, para evitar contaminación de otros minerales. Seguidamente, se hizo el tamizaje de mineral con un tamiz de 8 mm, para volver a moler aquellas partículas grandes que quedaron al no pasar el tamiz.

Para obtener el mineral de menor tamaño, se hizo la pulverización con el molino de anillo ESSA triturada de discos vibrantes para laboratorio, hasta obtener mineral en tamaño de micras. En la Figura N°8, muestra el proceso de molienda del mineral con los diferentes materiales utilizados.



**Figura N°8.** A: Mineral sulfuro de cobre alta ley, B: molienda en batan, C: tamizado de mineral, D: mineral pulverizado.

#### 3.3.8.3 Análisis granulométrico

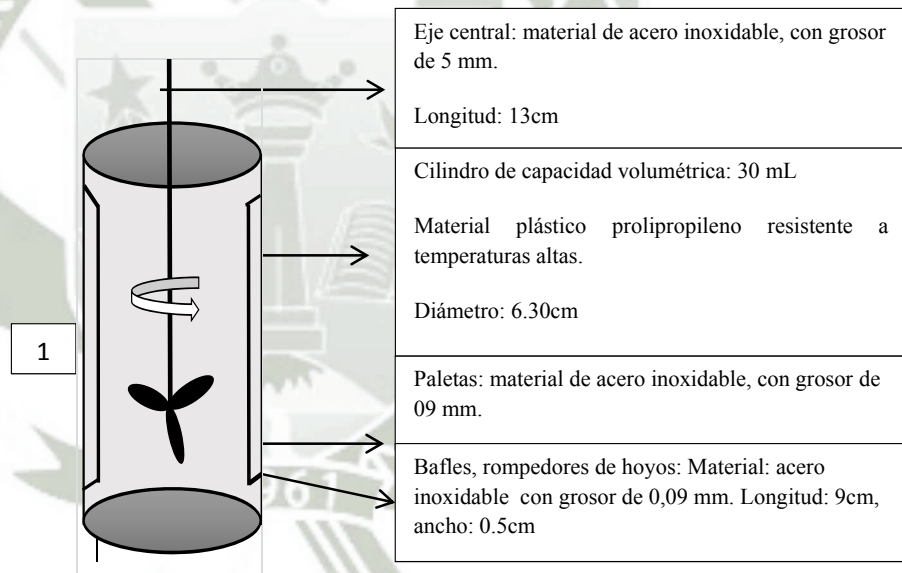
Para el análisis, el mineral pulverizado se moja sobre los tamices con mallas de N°+100 de 150  $\mu\text{m}$  y N° +400 de 38  $\mu\text{m}$ . El mineral con lavados se colocó sobre una bandeja, para luego dejar secar en estufa a 80 °C por 48 horas.

Luego se realizó el pesado de cada bandeja y se sacó el % de tamaño de 150  $\mu\text{m}$  y 38  $\mu\text{m}$ .

### 3.3.9 Pruebas de tolerancia a mineral

#### 3.3.9.1 Construcción del prototipo de bioreactor con agitación

- Primero se determinó las variables que se utilizó:
  - El volumen: 350 mL máximo.
  - Peso de la masa: 5 g. máximo.
  - Temperatura: 70-80 °C.
  - pH: 2-3
  - Rpm:80-120
- Segundo, se hizo un bosquejo del pequeño sistema de agitación. En la Figura N°9, muestra el prototipo del bioreactor batch, con las dimensiones usadas, el tipo de material utilizado.



*Fuente: Elaboración propia*

**Figura N° 9.**Prototipo de bioreactor

En la Figura N°10, muestra el sistema ensamblado utilizando seis frascos, tres para los tratamientos y tres para control, haciendo referencia por triplicado el experimento.



**Figura N°10.** Sistema de biooxidación a 70°C.

Los agitadores están conectados con un motor de 12 V con capacidad de agitación entre 100-200 rpm aproximadamente. Los agitadores son sumergidos en un sistema de baño maría a 70°C.

### 3.3.10 Pruebas de biooxidación

Los ensayos de biooxidación se realizaron en seis bioreactores construidos los cuales contienen agitadores en cada depósito, cada agitador consta de tres paletas con una inclinación de 45 grados, cada paleta es de material acero inoxidable con grosor desde 0,09 mm hasta 5 mm, los agitadores están conectados con un motor de 12 V con capacidad de agitación entre 100-200 rpm aproximadamente. Los agitadores son sumergidos en un sistema de baño maría a 70 °C, el volumen de cada depósito es de 250 mL.

Para las pruebas se utilizó un 32 % (p/v) de mineral en cada tanque con 250 mL de solución ácida. (Es decir se pesó 80 g. de mineral pulverizado con un tamaño de alrededor a 0,38  $\mu\text{m}$ ).

Dividiéndose en tres tanques como control, que contiene 80 g. de mineral y 250 mL de solución ácida (agua destilada y ácido sulfúrico) llegando a un pH de 1,5. Los tres tanques de tratamiento, contiene 80 g de mineral, 230ml de agua ácida (agua

destilada y ácido sulfúrico) llegando a un pH de 1,5 y 20 mL de inóculo de la producción del consorcio LK, adaptado en medio 9k –Fe 0,12 M.

Durante el periodo de prueba con los reactores se realizó el monitoreo del pH siendo ajustado constantemente. Se realizaron mediciones de potencial redox cada 48 h del ensayo por 40 días aproximadamente, visualización microscópica y recuentos bacterianos cada 72 h de la biooxidación mediante cámara de Neubauer. Al término del ensayo de biooxidación se realizaron análisis químicos de las soluciones mediante Adsorción atómica.

#### **3.3.10.1 Análisis Químico**

El muestreo de las muestras se realizó solo tres veces cada 12 días, sacando un volumen de 80 mL de cada bioreactor con su respectiva rotulación.

#### **3.3.10.2 Determinación de hierro total**

Este método se aplicó para rangos de 0,05 a 5,0 mg/L por medio de diluciones de la muestra.

A cada muestra se realizó una digestión con ácido nítrico. Se requirió del espectrofotómetro de adsorción atómica, con lámpara de cátodo hueco multi-elemento para hierro y se empleó una longitud de onda de 248,3 nm.

La muestra es aspirada y atomizada a través de una llama; mediante un monocromador se dirige un rayo de luz a través de la llama y sobre un detector se mide la cantidad de luz absorbida. La absorción depende de los átomos libres no excitados, pero en general la relación entre átomos no excitados y átomos excitados, en un momento determinado es muy alta. Como la longitud de onda del rayo de luz es característica solamente de cada metal por determinar, la energía luminosa absorbida por la llama es una medida de la concentración del metal en la muestra.

La fuente de luz emite un rayo de luz intensa y estable, de una longitud de onda determinada; cada elemento que se analiza posee una longitud de onda característica, la cual absorberá fácilmente; por ello para cada elemento debe usarse una fuente diferente de luz, lo cual constituye una desventaja del método. Inicialmente se hace pasar el rayo de la luz a través de la llama sin muestra y luego con muestra. Como la absorción de luz es proporcional a la concentración del metal, la disminución

en intensidad observada por el aparato permite medir la concentración del metal en la muestra ya sea directamente o por comparación con curvas de calibración preparadas con anterioridad.

La solución estándar de hierro consistió en disolver 1,0 g de hierro puro en 100 mL de HCl (dilución 1:1) con la ayuda del calentamiento para disolver el hierro, enseguida se enfrió y se diluyó en 1 L de agua destilada (1 mL = 0,1 mg de hierro). El combustible que se utilizó el acetileno.

Para la estandarización se prepararon 100 mL de cada uno de los blancos y al menos 4 soluciones estándares para agrupar el rango de concentración de hierro esperado de las muestras a ser analizadas, por medio de la dilución la solución de hierro estándar con  $\text{HNO}_3$  (1:500). Se midieron los tiempos de cada uno de los estándares de la prueba para ser ejecutado el análisis. Se aspiró el blanco y el estándar y se anotó la lectura que registró el equipo. Se aspiró  $\text{HNO}_3$  (1:500) entre cada estándar para calibrar el equipo de manera continua.

Se preparó una curva analítica de absorbancia contra concentración para cada uno de los estándares y se calculó el coeficiente de regresión. Se midieron 100 mL de muestra acidificada bien mezclada dentro de un matraz de 125 mL, se adicionaron 5 mL de HCl a cada una de las muestras.

Los cálculos para la concentración de hierro total en las muestras se dieron en miligramos por litro de hierro de acuerdo a la curva que se preparó y el equipo automáticamente emitió las lecturas de acuerdo a la calibración, según el laboratorio LAS (Laboratorios Analíticos del Sur), donde las muestras se analizaron mediante el equipo de Adsorción atómica.

### 3.3.11 Estequiometría

Un proceso de crecimiento celular implica consumo de sustratos que suministren la energía y la materia prima necesaria para la síntesis del material celular, utilizando la ecuación de Monod.

Para hallar la velocidad específica de crecimiento, se utilizaron los datos tomados durante el crecimiento celular durante 60 días, evaluados en el proceso de biooxidación, se realizó el conteo celular mediante la cámara de Neubauer, hallando

la concentración celular promedio tomados cada 48 h por presentar una cinética de crecimiento celular lenta, según Madigan M. 2012 en cada tiempo, luego se hizo el cálculo en el programa de Excel utilizando las siguientes ecuaciones. La  $\mu$  está definida por la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt}$$

X: concentración de biomasa (g/L)

t: tiempo

Determinación del tiempo de duplicación celular

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

td: tiempo de duplicación

$\mu$ : velocidad específica de crecimiento

Según el Dr. Edgar Donati, confirma que casi no hay estudios estequiométricos de microorganismos termófilos hierro oxidantes, pero se hizo el siguiente estudio estequiométrico.<sup>80</sup>

### 3.3.12 Análisis molecular

#### 3.3.12.1 Obtención de pellet limpio

Para generar biomasa limpia se cultivó 3 mL del cultivo de consorcio microbiano LK, en Medio *thermus thermophilus* DSMZ 579 adaptados en medio 9k-Fe 0,012 M llevado a un volumen de 500 mL, se incubó a 70 °C, observando su fase exponencial en 48 horas.

Se tomó 10 mL de inóculo (biomasa limpia) en tubos eppendorf, se llevó a centrifugación primero a 800 rpm por 5 minutos para eliminar los sedimentos, luego se sacó el sobrenadante a un tubo limpio, donde se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos.

### 3.3.12.2 Extracción de ADN

Con Kit Power Soild

Se agregó 80  $\mu\text{L}$  de la solución C1 al tubo con recolección de pellet, se calentó a 60  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, para evitar precipitación.

La solución C1, contiene SDS del compuesto, realiza la lisis celular, realizando suspensiones celulares suaves sobre el pellet.

Se realizó vórtex por 6 minutos, toques cada momento, luego se agregó 300  $\mu\text{L}$  aproximadamente de buffer beads.

Proceso de Shock térmico, se incubo el tubo a -20  $^{\circ}\text{C}$  aproximadamente durante 10 minutos luego se incubo a 80  $^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, se repitió 4 veces cada shock.

Se centrifugó los tubos a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de 1,5 mL, lo cual se obtuvo un volumen de 400  $\mu\text{L}$ .

Se adicionó 250  $\mu\text{L}$  de solución C2, al sobrenadante y dar vórtex por 5 segundos a 4  $^{\circ}\text{C}$  se incubo por 5 minutos. (3 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$  y 1 -20 $^{\circ}\text{C}$ ).

Se centrifugó los tubos a temperatura ambiente por un minuto a 10 000 rpm. Se observó un precipitado orgánico e inorgánico diferente al ADN precipitando restos de proteínas celulares. Es importante obtener al máximo el precipitado.

Se transfirió el volumen completo del sobrenadante a un tubo de colecta limpio, se obtuvo un volumen final de 400  $\mu\text{L}$ .

Se agregó 500  $\mu\text{L}$  de solución C3, al sobrenadante, se hizo resuspensión, realizando agitación por 5 minutos y se incubo a 4  $^{\circ}\text{C}$  por 8 minutos.

Se cargó 650  $\mu\text{L}$ , aproximadamente del sobrenadante a un spin filter y se centrifugó a 10 000 rpm por 30 segundos, se eliminó el sobrenadante.

Se repitió la muestra dos veces, se elimina el sobrenadante. El ADN, se une selectivamente a la membrana sílice del filtro, los contaminantes pasan a través del

a membrana del filtro y se elimina el sobrenadante, mientras el ADN permanece unido a la membrana.

Se adicionó 700  $\mu$ L de solución C4, se centrifugó a 10 000 rpm por 30 segundos, se sacó el sobrenadante y el filtro se volvió a colectar en un eppendorf de 1,5 mL. Se agregó 300  $\mu$ L de solución C4, se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente.

Se colocó el filtro a un tubo nuevo limpio colector, evitando el salpicado.

Se agregó 500  $\mu$ L de solución C5, al centro de la membrana del filtro y se centrifugó a 10000 rpm por 30 segundos, luego por 1 minuto.

Se sacó el filtro colocándolo a un nuevo tubo donde se agregó 40  $\mu$ l de elución, se centrifugó a 10 000 rpm por un minuto.

**Preparación Mix para PCR:** Se preparó un mix bajo campana de flujo laminar, adicionando los reactivos en un tubo eppendorf de 1,5 mL.

La enzima Taq polimerasa se adicionó al final de todos los reactivos según indica la Tabla N°2. Se almacenó mix de PCR a -20 °C hasta ser utilizado. El mix de PCR se alicuotó en tubos de 0,2 mL, según las reacciones a utilizar o para evitar mayor manipulación del mix, alicuotó y almacenó a -20 °C para reacciones futuras.

Ver el Anexo 11, nos muestra la composición de cada reactivo utilizado, según laboratorios MO BIO.

**Tabla N° 2: Formulación Mix PCR.**

<b>Formulación Mix PCR</b>	
<b>Reactivos</b>	<b>Volumen (10 Rx)</b>
Agua miliQ	60 µL
Buffer color Green 5X	20 µL
MgCl <sub>2</sub> (1-4 mM)	12 µL
Primer F (0,1-1 µm)	1 µL
Primer R (0,1-1 µm)	1 µL
dNTPs (10 mM)	2 µL
Taq Polimerasa	0,5 µL
<b>Volumen total Rx</b>	<b>96,5 µL</b>
<b>ADN templado</b>	<b>Aprox. 0,5 µl</b>

*Fuente: Elaboración propia*

Según las reacciones de PCR por muestra a realizar, se alicuotó 10 µL de mix de PCR en tubos de 0,2 mL. Se adicionó 0,5 µL de ADN extraído por kit Power Soild que se amplificó. El DNA adicionado puede ser extraído desde las células mediante kits de extracción (Promega, Power soild) o realizar PCR directamente desde muestras liquidas o de colonias en medios de cultivos sólidos.

□ Pellet: Con una micropipeta (10 µL) se adicionó el mix de PCR 0,5 µL del pellet, se mezcla por vórtex. Se preparó gel agarosa al 1%, para la corrida electroforética.

### 3.3.12.3 Identificación molecular

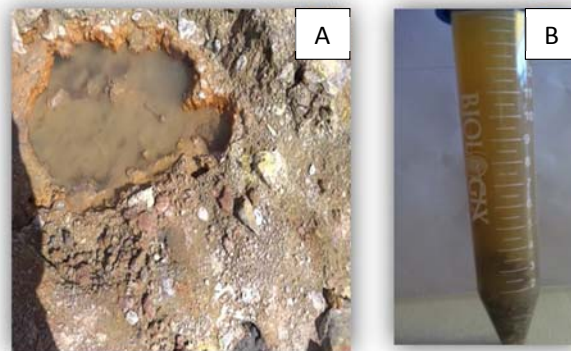
Se confirmó la identidad de los cultivos bacterianos aisladas utilizando las secuencias del ARN ribosomal 16S. La extracción de ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizaron en la Universidad de Antofagasta- Chile y la secuenciación fue realizada en Macrogen Inc. (Korea). La región del RNA ribosomal 16S fue secuenciada usando los cebadores 518F y 800R y se comparó la secuencia utilizando BLAST con las secuencias depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). El alineamiento de estas secuencias en estudio y secuencias similares de GenBank se obtuvo usando Clustal X. (Larkin et al., 2007).

## CAPÍTULO IV

### IV.RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1Sitio de muestreo

Para el análisis fisicoquímico de las muestras se realizó un monitoreo in situ de temperatura, pH y ORP. En la Figura N°11, se observa uno de los puntos de recolección y una muestra tomada para el análisis de FeT y sulfato, medidos por la técnica de adsorción atómica.



**Figura N°11.** A: Cráter de 20 cm de diámetro, con pigmentaciones rojas –anaranjadas, presente en el campo geotermal Valle del Colca. B: Sólidos tomados del géiser Pinchollo, se puede observar precipitación de coloración amarilla, siendo esto una característica física del azufre.

Los valores obtenidos en el monitoreo in situ fueron los siguientes: pH varían desde 3 hasta 7, temperatura desde 60 °C hasta 85 °C, OPR desde 234 mV hasta 700 mV aproximadamente. Los valores obtenidos en el análisis químico del sedimento fueron los siguientes: el hierro total (FeT) un valor máximo de 0,557 ppm y sulfatos desde 288,7 hasta 1264,2 ppm.

El valor más alto fue el contenido de sulfatos, esto se debe al sistema geotérmico del lugar, ya que contienen sulfuro y azufre como principales elementos. Conforme a lo descrito por Rothschild y Mancinelli (2001)<sup>13</sup>, reportan que el azufre elemental se forma a partir del H<sub>2</sub>S de origen geotérmico, bien sea por oxidación espontánea de H<sub>2</sub>S con O<sub>2</sub> o SO<sub>2</sub>. Con respecto a los valores de pH, los valores medidos más extremos son de sedimentos ácidos con valores medidos desde 3 hasta 4, permitiendo el aislamiento de microorganismos que toleren pH bajos.

#### 4.2 Caracterización fisicoquímica de sedimentos

En la Tabla N° 3, se reportan los datos fisicoquímicos de los diferentes puntos tomados de sedimentos dentro del campo geotermal Valle del Colca.

**Tabla N° 3. Monitoreo de temperatura, pH, ORP, medidos en diferentes puntos dentro del campo geotermal Valle del Colca.**

Nombre de muestra -Campo geotermal Colca	Medición de temperatura (°C)	Medición de pH	Medición de ORP(mV)
Muestra N°1	70	3,5	324
Muestra N°2	55	4.3	399
Muestra N°3	78	3,87	367
Muestra N°4	73-74	4,5	234
Muestra N°5	72-73	4	456
Muestra N°6	80	3	560

Se obtuvieron valores de temperatura alta, siendo una característica para que se desarrollen microorganismos termófilos e hipertermófilos.

Los rangos de pH son desde ácidos, neutros y alcalinos, dando la existencia de microorganismos acidófilos, alcalófilos. Algunos de estos microorganismos intervienen en los procesos de óxido-reducción de los elementos y/o compuestos presentes en el campo geotermal, lo cual está reportado en los valores altos obtenidos en la medición de ORP, lo que caracteriza a microorganismos extremófilos.

La Tabla N° 4, Resultados obtenidos en la determinación de  $\text{SO}_4^{2-}$  y FeT, de una muestra representativa del campo geotermal Valle del Colca.

**Tabla N° 4. Composición química de una muestra representativa del campo geotermal Valle del Colca.**

Elemento y/o compuesto analizado	Geiser "Pinchollo"
Fe Total(mg/L)	0,557
Sulfatos(mg/L)	288,7

Estos resultados muestran un alto contenido del ión  $\text{SO}_4^{2-}$ , coincidiendo con los valores reportados en los campos geotermales más grandes del mundo en cuanto a la

cantidad de este ión y elementos metálicos, debido a la formación volcánica. Los lugares como Taupo en Nueva Zelanda, ambientes termales en Islandia y los géiseres del Tatio en Chile <sup>7</sup>, se han considerado como los ambientes termales más altos del mundo, realizado por estudios científicos, sin embargo, en el Perú se encuentran en mayor altura comparado con estos lugares, pero aún no hay estudios científicos que reporten datos fisicoquímicos, ni químicos de la composición de los campos geotermales ubicados en el sur del Perú.

#### 4.3 Caracterización microbiológica

En la Tabla N°5 se muestra la descripción de la caracterización morfológica de los microorganismos observados de cada muestra. Detallando una caracterización general de los microorganismos heterotróficos observados. La observación en fresco se realizó después de 5 días de haber recolectado las muestras. Luego de 48 horas de haber sembrado en medio sólido a temperatura ambiente, se observó el crecimiento de colonias, observando el tipo de colonias crecidas para evaluar la caracterización macroscópica.

**Tabla N° 5. Caracterización macroscópica y microscópica de los sedimentos del campo geotermal del Valle del Colca.**

Muestra N°	Observación al fresco	Medio LB
N°1	Cocobacilos, cocos, bacilos, esporas y conidios segmentados (4-6).	Colonias blancas, filamentosas.
N°2	Cocos.	Colonias café claras puntiformes pequeñas.
	Cocos.	Colonias blancas filamentosas ligeramente viscosas.
	Cocos, bacilos, cocobacilos .	Colonia marrón puntiforme.
N°3	Cocos.	Colonias café amarillas brillosas punteadas,
N°4	Células eucariotas, cocos, bacilos.	Colonias café punteadas
N°5	Cocos, bacilos, conidios.	Colonias café punteadas
N°6	Cocos, bacilos.	Colonias blancas punteadas amarillas.

La caracterización microbiológica general, presentó en su mayoría la morfología de bacilos y cocobacilos.

Según Garrity (2004) menciona que los microorganismos habituales en ambientes termales son de estas morfologías.

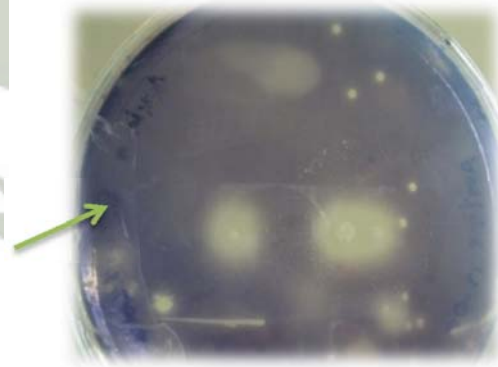
En el **Anexo N°1**, se observan las fotografías tomadas en la observación microscópica de la tinción Gram de cada muestra, como la caracterización macroscópica del crecimiento en medio sólido.

De los microorganismos crecidos en medio sólido, hay una predominancia de mayor porcentaje de bacterias Gram positivas, en comparación bacterias Gram negativas, sin embargo según Valdez (2011) reporto predominancia de bacterias Gram negativas en los géiseres de Tacna, ya que según Debord (1925) las bacterias termófilas suelen presentar una coloración Gram variable, donde ciertos microorganismos termófilos que forman esporas son Gram positivas a las 8 h y Gram negativos a las 24 h, debido a su metabolismo acelerado.

#### 4.4 Caracterización enzimática

Para las pruebas enzimáticas se observaron las colonias formadas en los medios de cultivos selectivos, tanto para amilasa y celulasa, los cuales fueron evaluados después de 72 h.

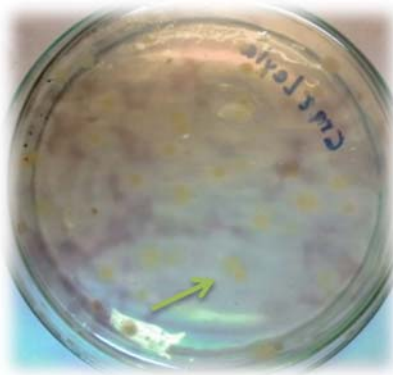
Para la determinación de microorganismos amilolíticos, se utilizó medio sólido selectivo con almidón al 1%. Se observó un crecimiento de colonias puntuadas blancas, también se observaron halos de hidrólisis significativos. En la Figura N°12, nos muestra la formación de halos generados por la hidrólisis de la enzima amilasa, a partir de los microorganismos aislados del campo geotermal Valle del Colca.



**Figura N°12.** Actividad cualitativa de la amilasa evidenciada por zonas de hidrólisis de los microorganismos aislados del campo geotermal Valle del Colca.

Se sabe que las amilasas bacterianas tienen actividades bastantes altas y que son más termoestables comparadas con las células fúngicas, reportado por Swarropa (2004) siendo de interés para estudios posteriores.

Para la determinación de microorganismos celulolíticos, se utilizó medio sólido selectivo con Carboximetilcelulosa CMC al 1%. Se observó el crecimiento de colonias blancas, se observaron halos de hidrólisis significativos. En la Figura N°13, nos muestra la formación de halos por la hidrólisis indicando su habilidad para producir de las enzima celulasa, a partir de los microorganismos aislados del campo geotermal Valle del Colca.



**Figura N°13.** Actividad cualitativa de la celulasa evidenciada por zonas de hidrólisis por los microorganismos aislados de los diferentes puntos muestreados del campo geotermal Valle del Colca.

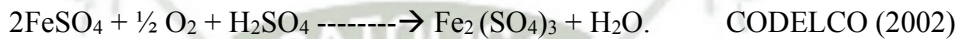
Se sabe que las celulasas bacterianas tiene actividades bastantes altas y son más termoestables comparadas con las fúngicas y bacterias mesófilas, teniendo en cuenta esta ventaja se puede proceder a estudios de interés a futuro, reportados por Swarropa (2004).

Las  $\beta$ -amilasas son comercialmente disponibles con una actividad catalítica por encima de los 60°C, aisladas a partir de varias especies de *Bacillus*, estas pueden ser usadas en conjunto con enzimas desramificadoras para producir jarabes de maltosa puro, según Haki & Rakshit, (2003).

#### **4.5 Adaptación en medio ácido con $\text{FeSO}_4$ a diferentes temperaturas y Aislamiento de los cultivos microbianos**

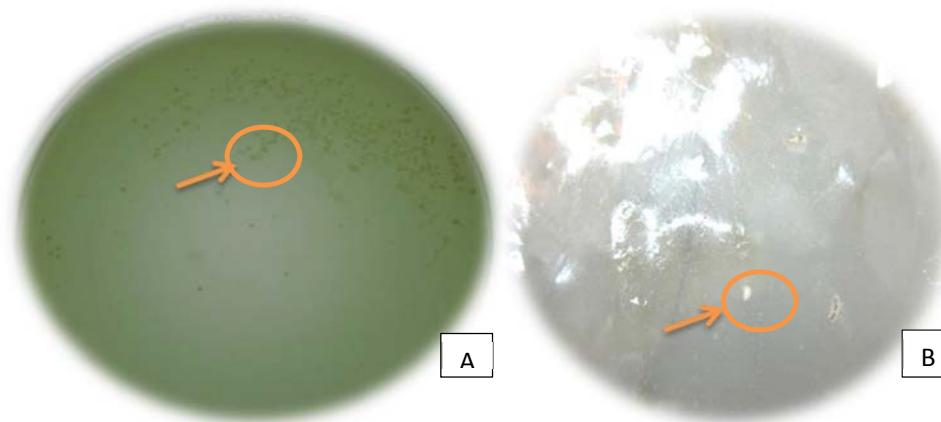
Las seis muestras extraídas, se masificaron en un medio enriquecido LB, permitiendo el crecimiento de microorganismos heterótrofos durante 48 h. El consorcio que se conformó se denominó LK.

Para el aislamiento selectivo se probó con dos medios de cultivo con dos concentraciones de  $\text{FeSO}_4$ , medio con sales 9K-Fe con una concentración de 0,12 M Arias (2013) y el medio mínimo de sales 0,012 M. Dando las características fisicoquímicas favorables para el desarrollo de microorganismos oxidadores del ión  $\text{Fe}^{+2}$ . Para la evaluación de estos microorganismos, se observó la apariencia del medio de cultivo de color inicial celeste transparente, tomando como referencia para el control, a diferencia del medio de cultivo con microorganismos tomando como tratamiento, el cual fue de color ocre o rojizo, indicando su habilidad de oxidación del medio, dado que este color presenta la presencia de jarosita, pasando del ión  $\text{Fe}^{+2}$  al ión  $\text{Fe}^{+3}$ , dada por la siguiente reacción:



El consorcio LK, extraído del campo geotermal, el medio LB permitió el mayor crecimiento. En el aislamiento selectivo en medio sólido 9K mínimo de sales, se observó el crecimiento de dos tipos de colonias, incubados a 70 °C.

La Figura N°14, muestra los dos cultivos microbianos quimiolitótrofos, denominados LK1 y LK2 con su respectivo tipo de colonia.



**Figura N°14.** Muestra los dos cultivos microbianos quimiolitótrofos, A: colonia LK1 y B: colonia LK2.

Cada cultivo bacteriano termófilo, se observó la morfología macroscópica de la colonia desarrollada. La colonia LK1 presentó una colonia mucóide de color marrón y la colonia LK2 de color blanco amorfo. La mayoría de colonias crecidas en estas condiciones, tienen características similares según Nord y Wald (1995); también los

reporto Valdez (2011). En la actualidad no hay muchos reportes debido a la eficiencia de las técnicas moleculares para la identificación de los microorganismos.

La Tabla N°6 y Tabla N°7, muestran los datos de los parámetros monitoreados para las pruebas de adaptación, durante 12 días. En la Tabla N°8, muestran la evaluación de los parámetros medidos con respecto al control, conteniendo el medio 9K-Fe.

**Tabla N°6. Resultados de los parámetros de pH, ORP (mV) y temperatura.**

Medición	DIA	LK1						LK2					
		Medio FeSO <sub>4</sub> 0,12M			Medio FeSO <sub>4</sub> 0,12M			Medio mínimo de sales			Medio mínimo de sales		
ORP (mV)	0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0
	2	400,4	434,9	454,2	358,3	328,9	333,4	381,2	345,9	329,3	419,1	434,5	345,4
	4	418,3	489,2	490,1	398,4	356,8	367,4	399,4	367,4	343,5	434,5	467,3	389,3
	6	447,6	503,9	534,2	415,8	378,9	423,3	435,4	389,3	378,4	489,5	488,5	434,2
	8	478,5	523,2	578,9	434,5	399,8	455,6	459,6	434,2	399,3	502,1	503,2	465,7
	10	513,2	559,4	605,2	478,9	414,2	478,5	478,4	456,3	434,2	545,3	545,5	489,4
	12	556,5	612,3	645,5	499,6	454,5	489,5	520,3	490,3	504,3	610,3	589,4	534,4
Temperatura °C		50	60	70	50	60	70	50	60	70	50	60	70
pH	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	2	2,3	2,2	2,1	2,3	2,2	2,1	2,3	2,1	2,1	2,0	2,3	2,1
	4	2,1	2,1	2,0	2,23	2,10	2,12	2,14	2,0	1,89	1,90	2,21	2,04
	6	1,99	2,0	1,89	2,12	2,02	2,0	1,99	1,98	1,82	1,89	2,0	2,0
	8	1,99	1,88	1,80	2,0	1,85	1,94	1,82	1,88	1,76	1,86	1,86	1,98
	10	1,89	1,79	1,78	1,89	1,74	1,83	1,78	1,73G	1,73	1,72	1,78	1,89
	12	1,7	1,67	1,65	1,80	1,64	1,78	1,59	1,63	1,70	1,54	1,55	1,72

**Tabla N° 7. Resultados de los parámetros de pH, ORP (mV) y temperatura.**

Medición	DI A	LK1 Medio FeSO <sub>4</sub> 0,12M			LK2 Medio FeSO <sub>4</sub> 0,12M			LK1 Medio mínimo de sales			LK2 Medio mínimo de sales		
ORP (mV)	0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	307,0	
	2	333,2	343,5	356,7	347,9	323,1	342,3	313,4	345,9	329,3	356,2	375,2	
	4	378,9	383,4	378,9	378,1	345,4	378,9	334,2	367,4	343,5	378,2	399,8	
	6	389,1	400,3	398,4	400,2	378,4	412,3	367,4	389,3	378,4	402,1	412,3	
	8	412,3	425,6	400,1	432,6	412,0	459,2	378,1	434,2	399,3	432,1	458,4	
	10	438,4	467,8	434,7	464,1	465,4	489,2	381,2	456,3	402,1	467,9	499,3	
	12	489,3	500,2	499,7	500,1	513,4	534,9	399,1	490,3	413,2	501,2	543,4	
Temperatura °C		50	60	70	50	60	70	50	60	70	50	60	70
pH	0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	2	2,45	2,34	2,45	2,34	2,33	2,21	2,43	2,1	2,36	2,25	2,38	2,23
	4	2,23	2,23	2,20	2,19	2,21	2,14	2,26	2,0	2,29	2,02	2,25	2,01
	6	2,08	2,0	1,90	2,0	2,03	2,08	1,99	1,98	2,01	1,99	2,0	1,89
	8	1,99	1,89	1,88	1,88	1,98	1,98	1,86	1,88	1,88	1,84	1,84	1,78
	10	1,96	1,88	1,75	1,76	1,65	1,87	1,73	1,73	1,80	1,80	1,72	1,62
	12	1,90	1,78	1,60	1,55	1,53	1,51	1,59	1,63	1,70	1,63	1,60	1,50

**Tabla N° 8. Parámetros evaluados en los sistemas de control.**

Medición	DI A	CONTROL		
ORP mV	0	307,0	307,0	307,0
	2	312,3	318,3	314,5
	4	334,7	339,4	320,9
	6	345,6	355,4	335,1
	8	355,7	360,1	345,6
	10	360,1	377,8	367,3
	12	366,4	388,2	381,2
Temperatura °C	DI A	50	60	70
pH	0	2,5	2,5	2,5
	2	2,3	2,4	2,455
	4	2,1	2,3	2,24
	6	1,99	2,12	2,18
	8	1,99	2,05	2,10
	10	1,99	2,0	2,05
	12	1,95	1,99	2,0

Se observó que los cultivos microbianos LK1 y LK2, se adaptaron tanto en medio 9K-Fe como en medio mínimo de sales, presentando tolerancia a la concentración 0,12M de FeSO<sub>4</sub>. Se observó una disminución del pH desde 2,5 hasta 1,5 siendo alta en comparación con el control, debido a la producción de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la oxidación del ión Fe<sup>+2</sup> en el medio de cultivo, según Córtez (2008), además del aumento del parámetro ORP, producto de las reacciones químicas que son desencadenadas por las bacterias según Aguirre(2005).

También se observó que a una temperatura de 70 °C hay una mayor dinámica de oxidación del medio, debido a la aceleración de la cinética de reacción.

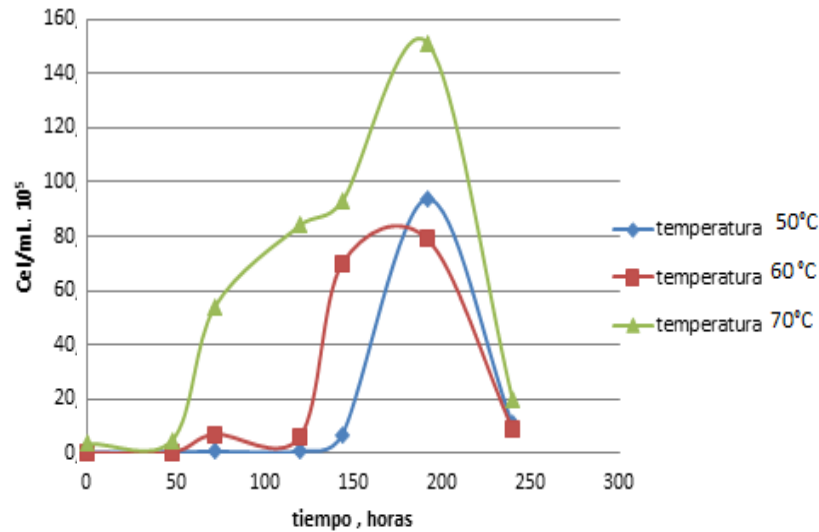
En la Tabla N°9, se observa el comportamiento del crecimiento del consorcio microbiano LK, a diferentes temperaturas.

La evaluación de la cinética microbiana, se midió desde las 0 h hasta 250 h, tomando cada 48 h, presentó un crecimiento lento debido al comportamiento de los microorganismos extremófilos.

**Tabla N°9. Resultados de la cinética microbiana del consorcio LK a 50 °C, 60 °C y 70 °C de temperatura**

Horas	50°C (cel/ml) .10 <sup>5</sup>	60°C (cel/ml) .10 <sup>5</sup>	70°C (cel/ml) .10 <sup>5</sup>
0	0,22	0,10	3,48
48	0,40	0,40	4,80
72	0,65	7,00	54,02
120	0,69	6,00	84,02
144	7,00	70,09	93,02
192	93,8	78,93	151,34
240	10,73	9,00	19,93

En la Figura N°15, nos muestra la evaluación de la cinética microbiana frente a los diferentes rangos de temperaturas analizadas.



**Figura N°15.** Cinética microbiana del consorcio microbiano termófilo LK, a diferentes temperaturas.

El gráfico de la cinética microbiana, nos muestra que el consorcio microbiano termófilo denominado LK, presentó un comportamiento tipo campana de Gauss. La fase exponencial presentó una mayor concentración celular del consorcio llegando a un promedio de  $1,52 \times 10^7$  Cel/mL, evaluado a 70 °C de temperatura en un tiempo de 192 h. Obteniendo como temperatura óptima de crecimiento 70 °C, para el desarrollo del consorcio microbiano termófilo LK.

Esta temperatura óptima es característica de los microorganismos hipertermófilos y en mayor proporción del género *Bacillus*, según Rastogi (2010).

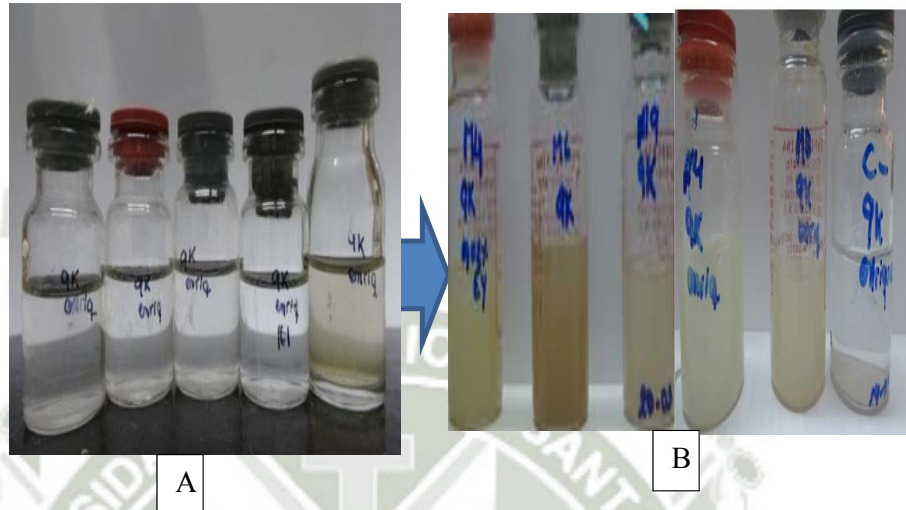
#### 4.6 Producción de biomasa (LK)

##### 4.6.1 Cultivo de enriquecimiento para el consorcio LK

De los datos obtenidos en la cinética microbiana termófila, se obtienen valores bajos con respecto a la concentración celular, en un periodo largo. Para las pruebas de biooxidación, se llevó a la búsqueda de nuevos medios, para obtener una cinética microbiana óptima, además de seguir manteniendo la concentración de  $\text{FeSO}_4$ .

Se preparó un medio basal para termófilas según Alexander Slobookin, (1997) el cual se basa en utilizar extracto de levadura en pequeño porcentaje (0,02%), denominado Medio mínimo de sales.

En la Figura N° 16, se observa el cambio de coloración en el medio durante el proceso de oxidación del ión  $Fe^{+2}$  al ión  $Fe^{+3}$ . Luego de realizarse la inoculación del consorcio de microbiano LK incubado a 70 °C de temperatura durante 25 días.

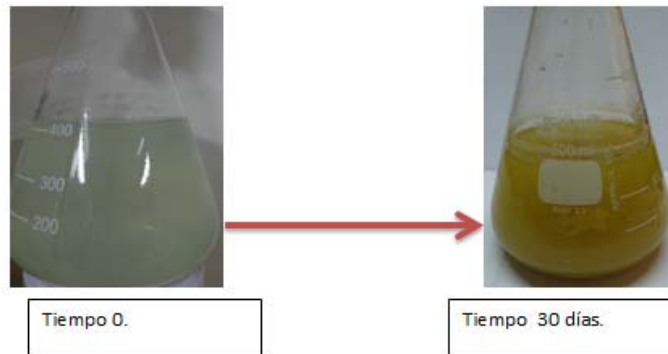


**Figura N°16.** A: Medio mínimo de sales en un tiempo 0, B: inoculación del consorcio de microbiano LK después de un periodo de 25 días.

El tratamiento presentó un color ocre rojizo, brillo en el anverso y en el reverso ocre oscuro, la mayor parte de estos microorganismos crecieron aprovechando los compuestos inorgánicos presentes en el medio de cultivo, ya que son quimiolitótrofos y a partir de estos minerales generaron sus componentes celulares para desarrollarse, Suzuki (1999).

#### 4.6.2 Generación de biomasa del consorcio LK

En la Figura N°17, nos muestra la biooxidación del ión  $Fe^{+2}$  a ión  $Fe^{+3}$ , producido por el consorcio microbiano termófilo LK durante 30 días en un hot plate, el cual permitió la homogenización de la muestra por agitación a 120 rpm aproximadamente, evitando así la formación de precipitados.

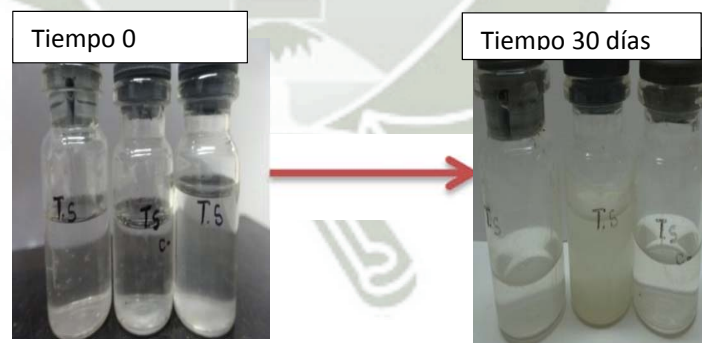


**Figura**

**N°17.** Oxidación del medio de cultivo, producido por el consorcio LK durante 30 días. En su fase logarítmica se obtuvo una concentración celular promedio de  $1,0 \times 10^8$  Cel/mL en un tiempo de 30 días.

Se obtuvo el medio de cultivo óptimo y la temperatura para obtener un mayor crecimiento de los microorganismos quimiolitótrofos utilizando  $\text{FeSO}_4$  como fuente de energía, luego se procedió a estudiar respecto a su adaptación al mineral, para ello antes se evaluó con medio tiosulfato ya que el mineral de sulfuro contiene compuestos de azufre y sulfatos. Debido a esta capacidad de desarrollo, es que son capaces de llevar a cabo las reacciones de oxidación del ión  $\text{Fe}^{+2}$  y la solubilización de cobre, reportado por Waiting (2006).

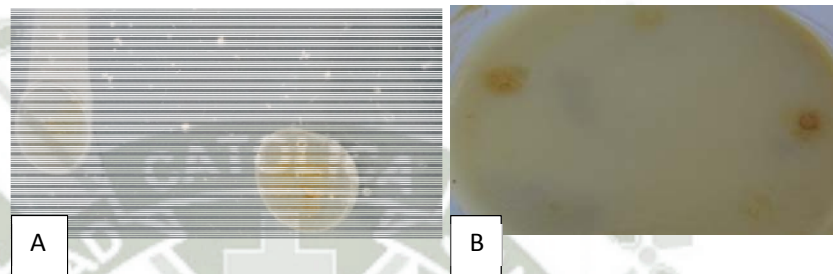
En la Figura N°18, se observa la turbidez generada en el medio Tiosulfato, por el consorcio microbiano termófilo LK.



**Figura N°18.** Medio tiosulfato inoculado con el consorcio LK, durante 30 días a  $70^\circ\text{C}$ .

Nos muestra el medio tiosulfato totalmente traslucido al inicio de la inoculación, después de un periodo de 30 días se pudo observar la turbidez y el crecimiento de microorganismos llegando hasta un promedio de concentración celular de  $5 \times 10^7$  cel/mL.

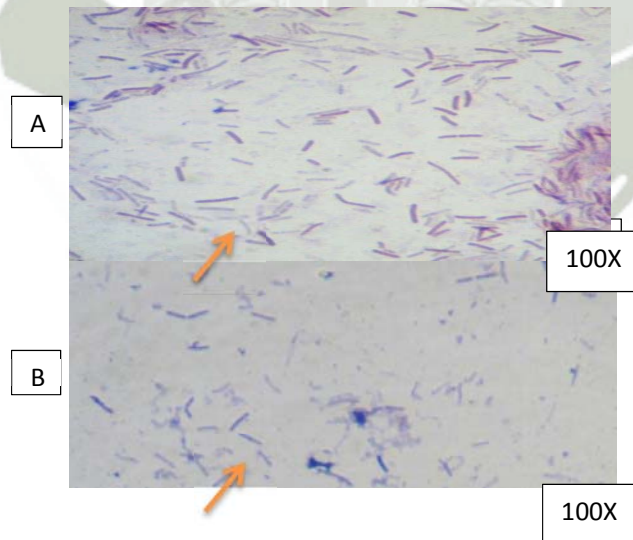
Posteriormente se evaluó el crecimiento en medio sólido tiosulfato con phytigel 2%. En la Figura N°19, muestra el crecimiento de colonias incubadas a 70 °C de temperatura.



**Figura N°19.** Actividad oxidativa del consorcio LK. A: medio sólido tiosulfato, B: medio sólido 9K-Fe.

Se observó micro colonias de color amarillo, similares a las micro colonias de *Acidithiobacillus ferroxidans*.

En la Figura N°20, muestra la morfología del consorcio LK, por tinción Gram.



**Figura N°20.**A: Bacilos Gram positivos de la colonia LK1, B: Bacilos Gram positivos de la colonia LK2.

Los microorganismos quimiolitótrofos mesófilos tienen una morfología bacilar presentando una coloración Gram negativa. Su membrana realiza las oxidaciones de los elementos no orgánicos del medio, CODELCO (2002).

De los cultivos microbianos aislados de géiseres de Tacna, la gran parte son bacilos Gram positivos, Zapata (2014). Esto debido a que según Debord (1925) las bacterias termófilas suelen presentar una coloración Gram variable, donde ciertos microorganismos termófilos que forman esporas son Gram positivos y las Gram negativas tienen un metabolismo muy acelerado.

#### 4.7 Pruebas de biooxidación

Con el fin de caracterizar el comportamiento del consorcio microbiano termófilo LK, en la oxidación del ión  $Fe^{+2}$  del sulfuro de cobre, se comparó en la biooxidación tanto el tratamiento como el control. Durante los 40 días de evaluación para ambos casos, se monitorearon periódicamente los parámetros fisicoquímicos tales como pH, ORP (mV) y las concentraciones del ión  $Fe^{+2}$  en las soluciones con electrodos de Ag/Ag Cl.

##### 4.7.1 Análisis granulométrico

En la Tabla N°10, nos muestra el número de malla que se utilizó para el análisis. El peso total por muestra fue de 20 g, del cual sólo 12,17 g de peso atravesó la malla N° 400, luego se calculó el % de mineral con respecto al tamaño en  $\mu m$ .

**Tabla N° 10. Peso de mineral que pasó por la malla N°400.**

Mineral	N° de malla	Peso gr.
Sulfuro de alta ley	400	12,17

Se realizó un cálculo aproximado del tamaño del mineral, se obtuvo el porcentaje de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \text{Muestra total} &= 20,0g \text{-----} 100\% \\ &12,17 \text{-----} X \\ X &= 60,85 \%. \end{aligned}$$

Del mineral de sulfuro de alta ley, el 60,85 % fue de 0,38  $\mu m$  o menor tamaño.

Mediante un proceso de trituración, todo el mineral se obtuvo menor de 0,38  $\mu\text{m}$ , lo cual hace más eficiente la interacción del mineral con los microorganismos para el proceso de biooxidación.

Con el proceso de molienda, luego el pulverizado se puede llegar a obtener el mineral de un menor tamaño para poder aplicar a escala de laboratorio.

#### 4.7.2 Análisis de FeT, Cu y sulfatos.

En la Tabla N° 11, muestra los valores obtenidos del análisis de FeT, Cu y Sulfatos.

**Tabla N° 11. Resultados del análisis de FeT, Cu y Sulfatos, del mineral pulverizado.**

Análisis de FeT	Análisis de Cu	Análisis de Sulfatos
49,69%	2,54%	6,29%

Los resultados muestran un 2,54% de cobre, haciendo suponer que es un mineral de tipo sulfuro de alta ley, es decir que tiene un valor económico alto de mineral.

Ver el Anexo 11 y 12, se muestran los resultados obtenidos del Laboratorio LAS.

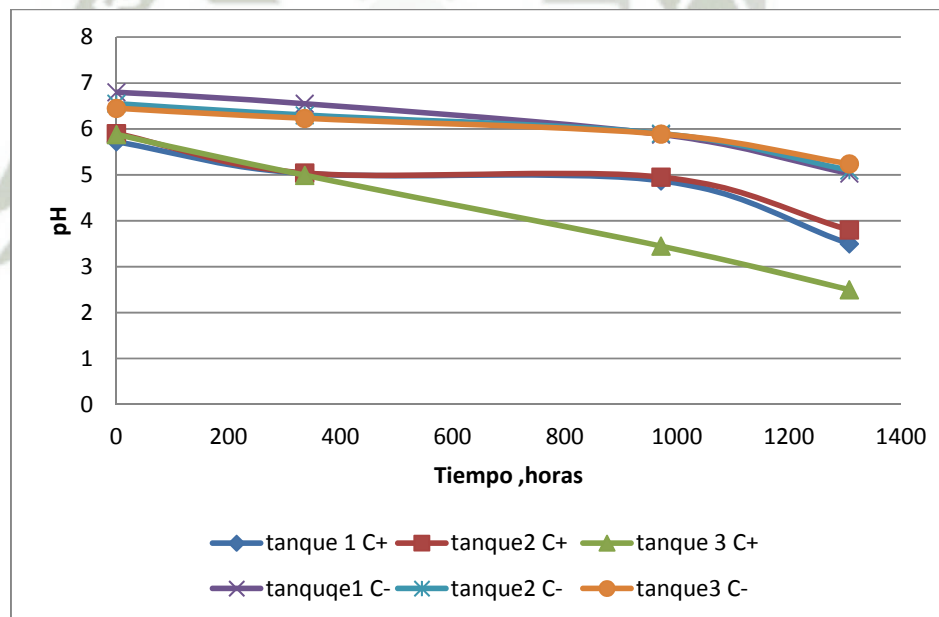
#### 4.8 Evaluación del pH y ORP

En la Tabla N°12, nos muestra los valores obtenidos en la medición del pH a diferentes tiempos, tanto del tratamiento como el control.

**Tabla N°12. Resultados de la medición de pH en el proceso de biooxidación.**

Análisis de pH						
Tiempo	TRATAMIENTO (C+)			CONTROL (C-)		
Horas	tanque 1	tanque 2	tanque 3	tanque 1	tanque2	tanque3
0	5,72	5,9	5,88	6,8	6,55	6,45
336	5,03	5,04	4,99	6,55	6,3	6,23
972	4,87	4,95	3,45	5,88	5,9	5,89
1308	3,5	3,8	2,5	5,03	5,1	5,24

La Figura N°21, nos muestra la variación del pH con respecto al tiempo, para el proceso de biooxidación del mineral sulfurado a 70 °C, por acción del consorcio termófilo LK y por disolución química, evaluado en el experimento como control .



**Figura N°21.** Medición del pH en la solución durante el proceso de biooxidación, realizado por triplicado en la experimentación.

Como se observa al inicio, se registró un pH alto de 6, esto se debió al contenido de sales del mineral en las primeras 250 horas, después se fue ajustando a pH 2 con ácido sulfúrico y por acción de los microorganismos, para de esta forma evitar o disminuir la generación de precipitados del ión  $Fe^{+3}$ , lo que requiere el consumo de protones presentes en la solución.

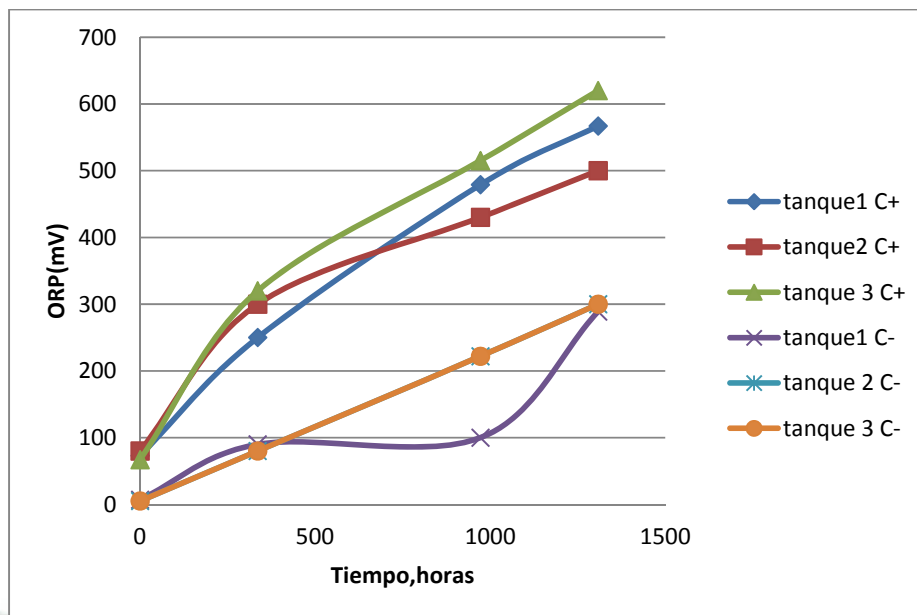
En el tratamiento se registró un descenso del pH hasta 2, a diferencia del control, se mantuvo desde 6 hasta 4,5, teniendo una baja liberación de protones. Esto muestra que la tasa de generación de protones fue mayor a la del consumo, teniendo una menor tasa de disolución del mineral comparada con la velocidad de generación de precipitados de Fe. La disminución de pH, en el tratamiento se debe a la liberación de protones a la solución.

La Tabla N°13, nos muestra los valores obtenidos en la medición de ORP, en el proceso de biooxidación.

**Tabla N°13. Resultados de la medición de ORP en el proceso de biooxidación**

Análisis de ORP(mV)						
tiempo	TRATAMIENTO (C+)			CONTROL (C-)		
Horas	tanque 1 mV	tanque 2 mV	tanque 3 mV	tanque 1 mV	tanque2 mV	tanque3 mV
<b>0</b>	73	80	67	7,1	5,1	4,5
<b>336</b>	250	300	320	90	80	76
<b>972</b>	479	430	515	100	222	214
<b>1308</b>	567	500	620	289	300	289

En la Figura N°22, muestra la variación del ORP con respecto al tiempo para el proceso de biooxidación del mineral sulfurado a 70 °C, por acción del consorcio termófilo LK en comparación por disolución química evaluado en el experimento como control.



**Figura N°22.** Medición de ORP (mV) en la solución durante el proceso de biooxidación, realizado por triplicado en la experimentación.

Durante el proceso de biooxidación del mineral a 70 °C por el consorcio microbiano termófilo LK, se observó un aumento considerable del ORP desde 100 mV a 600 mV en un periodo de 1200 h, lo que demuestra una lenta biooxidación del ión Fe<sup>+2</sup> a ión Fe<sup>+3</sup>. En cuanto al ORP del control, su potencial electroquímico se mantuvo bajo, en torno a los 200 mV llegando hasta 300 mV, deduciendo que el Fe se encontraba en la solución principalmente como ión Fe<sup>+2</sup>, a diferencia del cultivo con el consorcio termófilo LK, donde fue predominante el ión Fe<sup>+3</sup>.

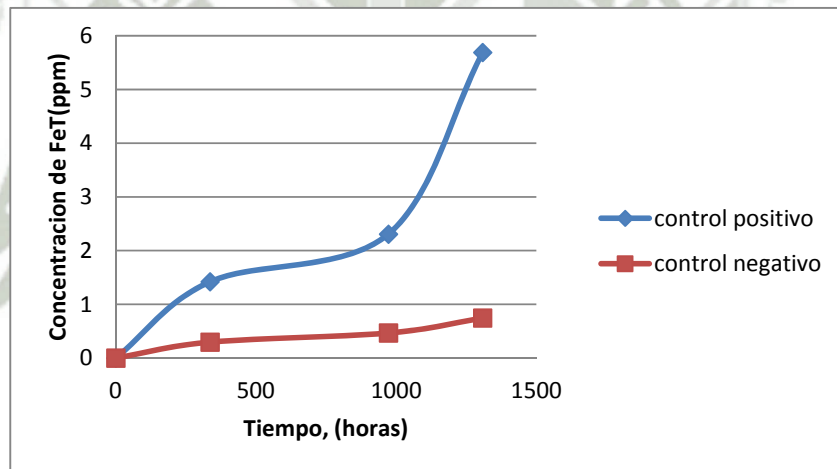
#### 4.9 Evaluación de la concentración de Hierro Total

En la Tabla N°14, muestra la evolución de la concentración de FeT en solución presente como ión Fe<sup>+2</sup> a ión Fe<sup>+3</sup>, durante el proceso de biooxidación del sulfuro de cobre a 70 °C, evaluado en el tratamiento y el control.

**Tabla N° 14. Análisis de FeT en solución presente como ión  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ .**

Análisis de FeT						
tiempo	TRATAMIENTO (Control positivo)			CONTROL (Control negativo)		
	tanque 1 ppm	tanque 2 ppm	tanque 3 ppm	tanque 1 ppm	tanque 2 ppm	tanque 3 ppm
horas						
0	0	0	0	0	0	0
336	1,22	1,93	1,11	0,25	0,37	0,27
972	2,4	2,23	2,29	0,52	0,49	0,39
1308	5,5	5,83	5,728	0,82	0,95	0,46

En la Figura N°23, muestra el gráfico de la variación del análisis de FeT con respecto al tiempo, comparando el tratamiento con el control.



**Figura N°23.** Variación de la concentración de FeT (ppm) en la solución durante el proceso de biooxidación comparando el tratamiento con el control.

Se observó que, en el caso del tratamiento en el proceso de biooxidación con sulfuro de cobre, se obtuvo una concentración inicial de 0 ppm de FeT y una vez transcurrido las 1308 h se alcanzó un aumento significativo de 5,73 ppm.

En el tanque 2 y 3 del tratamiento, se observó que a las 336 h hubo un aumento en la concentración de FeT. La tasa de disolución del mineral es más baja que la tasa de formación de precipitados del ión  $Fe^{+3}$ , lo cual explica la disminución del pH registrada.

En cuanto al experimento control, si bien en las primeras horas disminuyó, luego se observa un incremento ligero, refleja que influye el valor de pH que se mantuvo dado el reporte anterior hasta 4,5. Según Indira Jaque (2012), el tener valores altos de pH aumenta la precipitación del ión férrico como jarositas o hidróxidos.

#### **4.10 Análisis Cualitativo de los cultivos de biooxidación y experimento control.**

La siguiente Figura N°24, muestra los bioreactores durante el proceso de biooxidación del sulfuro de cobre por el consorcio de LK, como el control, tomados en distintos tiempos en el que fueron realizados los monitoreos de los parámetros fisicoquímicos y biológicos durante el estudio.

Se observa de forma cualitativa el proceso de biooxidación del mineral, observando los bioreactores tipo batch con agitación constante a 120 rpm, se observó la diferencia de color del medio o visibilidad de la precipitación del ión  $Fe^{+3}$ .



**Figura N°24.** Se muestran dos tanques uno como control de color plomo por el mineral, el otro tanque es el tratamiento de color anaranjado por la formación de jarosita, conectados a un sistema de agitación e incubados en baño maría a 70 °C.

##### **4.10.1 Cinética microbiana del consorcio microbiano termófilo en el proceso de biooxidación**

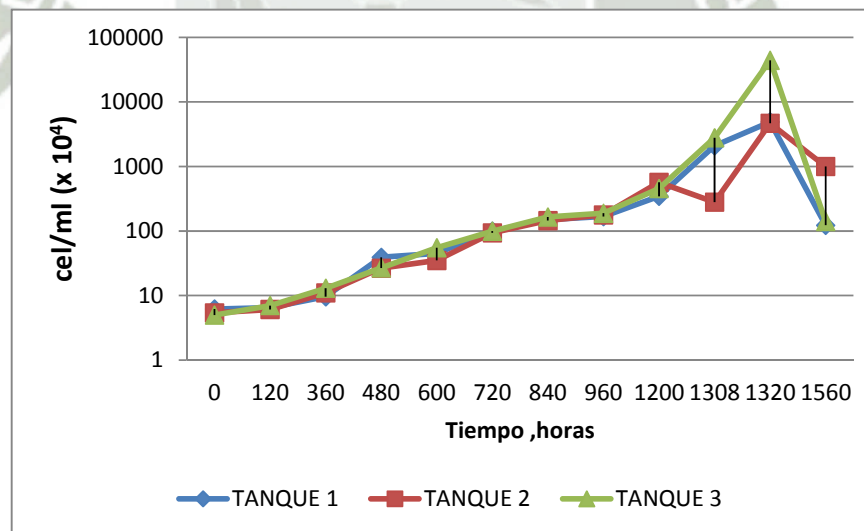
La Tabla N°15, nos muestra los valores obtenidos en la evolución de la cinética de crecimiento del consorcio termófilos microbiano LK, durante el proceso de biooxidación, incubado a 70 °C.

**Tabla N°15. Resultados de la cinética de crecimiento del consorcio microbiano termófilo LK, durante el proceso de biooxidación.**

TRATAMIENTO			
CURVA DE CRECIMIENTO .10 <sup>4</sup>			
Tiempo, horas(h)	tanque 1 cel/mL	tanque 2 cel/mL	tanque 3 cel/mL
0	6,2	5,4	5
120	6,5	6,1	7
360	9,6	11	13
480	39,2	26,6	26,8
600	45	35	55
720	99,6	93,6	99,5
840	150	145	165
960	168	178	189
1200	345	567	456
1308	2090	280	2780
1320	4900	4670	44000
1560	123	1000	140

En la Figura N°25, se observa el comportamiento del crecimiento de los resultados obtenidos de la cuantificación promedio de células del consorcio microbiano termófilo LK, con respecto al tiempo, durante el proceso de biooxidación.

La evaluación se hizo por triplicado, al mismo tiempo empleando los seis bioreactores batch para la agitación continua, obteniendo una mezcla homogenizada, incubada a 70 °C.



**Figura N°25. Curva de la cinética de crecimiento del consorcio microbiano termófilo LK, durante el proceso de biooxidación.**

La curva de crecimiento presenta una forma de campana de Gauss, en un tiempo

0 se observó que hay una concentración promedio celular de  $1 \times 10^4$  cel/mL, debido al proceso de adaptación de los microorganismos en el mineral sulfurado, luego hay un aumento de células hasta llegar en su fase logarítmica de  $1 \times 10^8$  cel/mL en un periodo de 1320 horas, finalmente se observó la fase de muerte muy rápida de  $1 \times 10^6$  cel/mL. Teniendo una cinética microbiana lenta, debido a la formación de jarosita en el medio.

#### **4.11 Estequiometria microbiana**

##### **4.11.1 Crecimiento microbiano**

Un proceso de crecimiento celular implica el consumo de sustrato que suministre la energía y materia necesaria para la síntesis del material celular.

La Tabla N°15, nos muestra los datos de la concentración celular (cel/mL), recopilados durante los días del proceso de biooxidación, en los tres tanques del tratamiento. Se observa un crecimiento celular conforme al tiempo, se tiene el crecimiento celular de  $1,79 \times 10^8$  cel/mL a los 1320 días, teniendo una cinética microbiana lenta en comparación de otros microorganismos, debido a que son sometidas a condiciones extremas ya sea por el pH, mineral y temperatura. Estos microorganismos se están adaptando hasta llegar a la fase logarítmica donde toman como sustrato el  $\text{FeSO}_4$  produciendo una reacción de oxidación del ión  $\text{Fe}^{+2}$  a ión  $\text{Fe}^{+3}$ .

Se observó una cinética de crecimiento tipo campana de Gaus, observando en los primeros días una concentración celular muy baja, según Kelly y Jones (1978) y Acevedo et al (1991) se produce inhibición del crecimiento celular los primeros días, debido a las altas concentraciones del ión  $\text{Fe}^{3+}$  o que el mismo mineral puede contener cationes y aniones que pueden tener niveles tóxicos afectando al crecimiento celular.

##### **4.11.2 Cinética de crecimiento, modelo Monod**

El estudio cinético de este consorcio se llevó a cabo en el proceso de biooxidación bajo condiciones de operación extremas, dentro de ellas la temperatura de  $70^\circ\text{C}$ , pH 2,5, mineral sulfurado y agitación constante de 120 rpm. Actualmente hay discrepancias en términos de rendimiento celulares y parámetros cinéticos.

En la Tabla N°16, nos muestra los valores de los cálculos realizados desde el tiempo 0 hasta las 1308 h, se realizaron mediante la ecuación según modelo Monod,

obteniendo una velocidad específica máxima de crecimiento de 0,01 h<sup>-1</sup>, una constante de saturación de sustrato de 13508,950 g/L y el tiempo de duplicación de 50,59 h.

La velocidad específica de crecimiento es bastante baja, ya que el nutriente limitante es el FeSO<sub>4</sub>, pero además se debería considerar el análisis del mineral para evaluar cuál es la fuente de energía y los compuestos que producen la inhibición celular, según Kelly y Jones (1978), han demostrado que sobre los niveles utilizados se produce inhibición del crecimiento debido a las concentraciones del ión Fe<sup>+3</sup>. La saturación de sustrato de 13508,950 g/L es bastante alto, siendo también uno de los factores que provocan inhibición de células en las primeras horas hasta las 1308 h, además la saturación de sustrato se debe a que se utilizó sistema batch herméticamente cerrado incubado a 70 °C de temperatura provocando que los vapores de las reacciones recirculen dentro de los tanques, mientras se va produciendo la reacción de oxidación del ión Fe<sup>+2</sup> al ión Fe<sup>+3</sup>.

**Tabla N° 16. Cinética de Monod**

Tiempo (días)	Tiempo (h)	u (h <sup>-1</sup> )	1/u	S (g/L)	1/S
0	0	0,0	0,00000	320	0,00313
14	336	0,00527367	189,6	1882,344706	0,00053
40,5	972	0,00430031	232,5	20914,91373	0,00005
54,5	1308	0,00671594	148,9	2090207,903	0,00000
		u max		0,01	h <sup>-1</sup>
		Ks		13508,950	g/L
		td		50,59	h

El tiempo de duplicación celular, está relacionada directamente con la velocidad máxima de crecimiento, lo cual muestra un tiempo muy bajo, considerando que el crecimiento es discontinuo. Las células no pueden reproducirse indefinidamente y al final de la fase exponencial la velocidad va decreciendo a medida que aparecen limitaciones ya mencionadas, haciéndose prácticamente nula en la denominada fase estacionaria de crecimiento, finalmente se llega a una fase de muerte celular en la que desciende el número de células, debido a la ausencia de los nutrientes, considerando que este no es un sistema continuo para alimentar con nuevos nutrientes, sino un sistema batch, herméticamente cerrado.

#### 4.12 Análisis estadístico

El análisis de varianza de un factor que se realizó para conocer el efecto del consorcio microbiano termófilo LK en el proceso de biooxidación, sobre los parámetros medidos de pH, ORP y FeT en la solución, reportados en las siguientes tablas: Tabla N°13, Tabla N°14 y Tabla N°15.

En la Tabla N°17, nos muestra el resumen de los resultados del análisis de varianza de un factor de la medición de FeT en el proceso de biooxidación, medido en el tanque de tratamiento.

**Tabla N°17. Resumen del Análisis de Varianza de FeT del tratamiento.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	45,3961	1	45,3961	59,52	0,0000
Residuo	7,62651	10	0,762651		
Total (Corr.)	53,0226	11			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre valores medidos de FeT en los tanques del tratamiento, con respecto al tiempo con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica un 85,6165% de la variabilidad en la medición de FeT. El coeficiente de correlación es igual a 0,925292, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,873299. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones. La Tabla N°18, nos muestra el resumen de los resultados del análisis de varianza de un factor de la medición FeT en el proceso de biooxidación, medido en el tanque control.

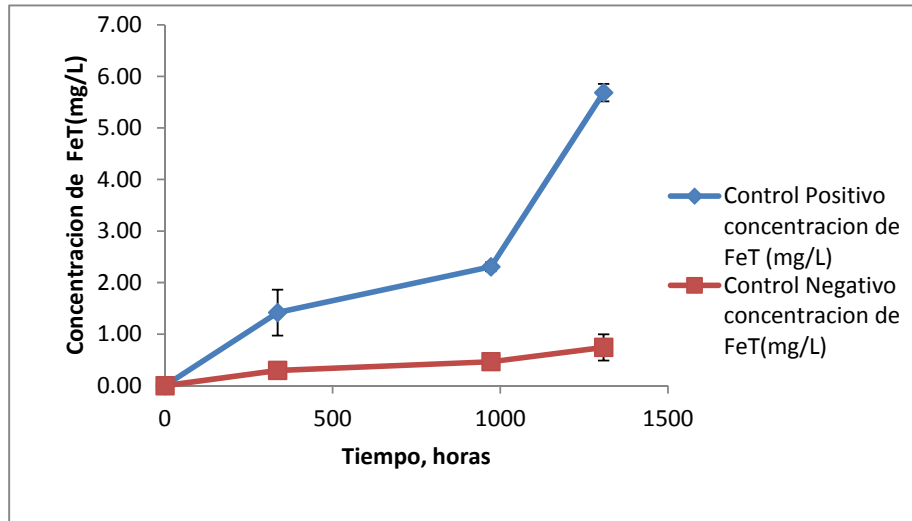
**Tabla N°18. Resumen del Análisis de Varianza de FeT del control.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	0,827706	1	0,827706	43,30	0,0001
Residuo	0,191161	10	0,0191161		
Total (Corr.)	1,01887	11			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre los valores FeT en el proceso de biooxidación, medidos en los tanques de control y el tiempo con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica unos 81,2379% de la variabilidad en los valores de pH en el proceso de biooxidación, medidos en los tanques de control. El coeficiente de correlación es igual a 0,901321, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,138261. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

En la Figura N°26, se muestra la comparación de la desviación estándar de los valores medidos de FeT en el proceso de biooxidación del tratamiento (control positivo) frente al control (control negativo).



**Figura N°26.** Desviación estándar del tratamiento y del control de los valores del FeT, con respecto al tiempo.

Se observa que hay diferencia significativa del tratamiento frente al control, es decir que la biooxidación del sulfuro de cobre con el consorcio LK, tiene mayor significancia frente al control.

La Tabla N°19, nos muestra el resumen de los resultados del análisis de varianza de un factor de la medición de ORP en el proceso de biooxidación, medido en el tanque de tratamiento.

**Tabla N°19. Resumen del Análisis de Varianza de ORP del tratamiento.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	406413,	1	406413,	137,95	0,0000
Residuo	29459,9	10	2945,99		
Total (Corr.)	435873,	11			

El valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre ORP del tratamiento y el tiempo, con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica un 93,2412% de la variabilidad en ORP del tratamiento. El coeficiente de correlación es igual a 0,965615, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 54,277. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

En la Tabla N°20, nos muestra un resumen de los resultados del análisis de varianza de un factor de la medición de ORP en el proceso de biooxidación, medido en el tanque control.

**Tabla N°20. Resumen del Análisis de Varianza de ORP del control.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	135420,	1	135420,	105,82	0,0000
Residuo	12797,6	10	1279,76		
Total (Corr.)	148218,	11			

El valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Análisis de Varianza, para ORP del control con respecto al tiempo con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica un 91,3657% de la variabilidad en la medición para ORP del control. El coeficiente de correlación es igual a 0,955854, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 35,7737. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

En la Tabla N°21, nos muestra un resumen de los resultados del análisis de varianza de un factor de la medición de pH en el proceso de biooxidación, medido en el tanque de tratamiento.

**Tabla N°21. Resumen del Análisis de Varianza para pH del tratamiento.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	9,90099	1	9,90099	33,28	0,0002
Residuo	2,9749	10	0,29749		
Total (Corr.)	12,8759	11			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre la medición de pH del tratamiento frente al tiempo con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica un 76,8956% de la variabilidad de pH del tratamiento. El coeficiente de correlación es igual a -0,876901, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,545426. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

En la Tabla N°22, nos muestra una tabla resumen de los resultados del análisis de varianza de un factor la medición de pH en el proceso de biooxidación, medido en el control.

**Tabla N°22. Cuadro resumen del Análisis de Varianza para pH del control.**

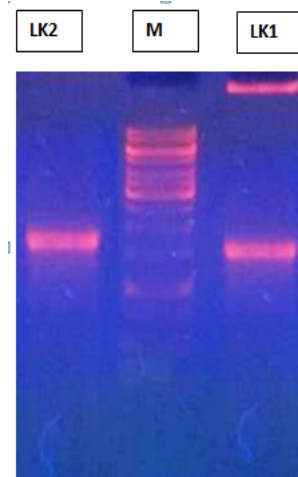
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	3,52754	1	3,52754	82,55	0,0000
Residuo	0,427322	10	0,0427322		
Total (Corr.)	3,95487	11			

El valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre la medición de pH control frente al tiempo con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica un 76,8956% de la variabilidad de pH control. El coeficiente de correlación es igual a -0,876901, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado indica que la desviación estándar de los residuos es 0,545426. Este valor puede usarse para construir límites de predicción para nuevas observaciones.

#### **4.13 Análisis molecular**

La extracción de ADN del consorcio microbiano LK, se obtuvo mediante la utilización del kit Power soild. En la Figura N°27, nos muestra la presencia de las bandas de la amplificación del gen ARNr 16S que permitió detectar la presencia de bacterias mediante PCR del consorcio termofílico.



**Figura N° 27.**Electroforesis del ADN de las cepas LK1y LK2.

De la evaluación cualitativa, el cultivo microbiano LK1 y el cultivo microbiano LK2; tienen el mismo tamaño con respecto al peso molecular de su ADN, se observa que las bandas están bien definidas, por lo cual se asumió que no estaban contaminadas con ARNs, ni otros contaminantes, evitando equivocaciones en la identidad del microorganismo.

En la Tabla N°23, nos muestra las especies identificadas en el análisis de ARNr 16S del consorcio de microorganismos termófilos LK.

**Tabla N° 23. Especies identificadas con 100% de identidad para LK1 y LK2.**

ADNr 16s	Especie/Género	Cobertura	Máx. identidad	E- value
LK1	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	97,6	100%	1e-17
LK2	<i>Bacillus sp.</i>	96,7	100%	1e-17

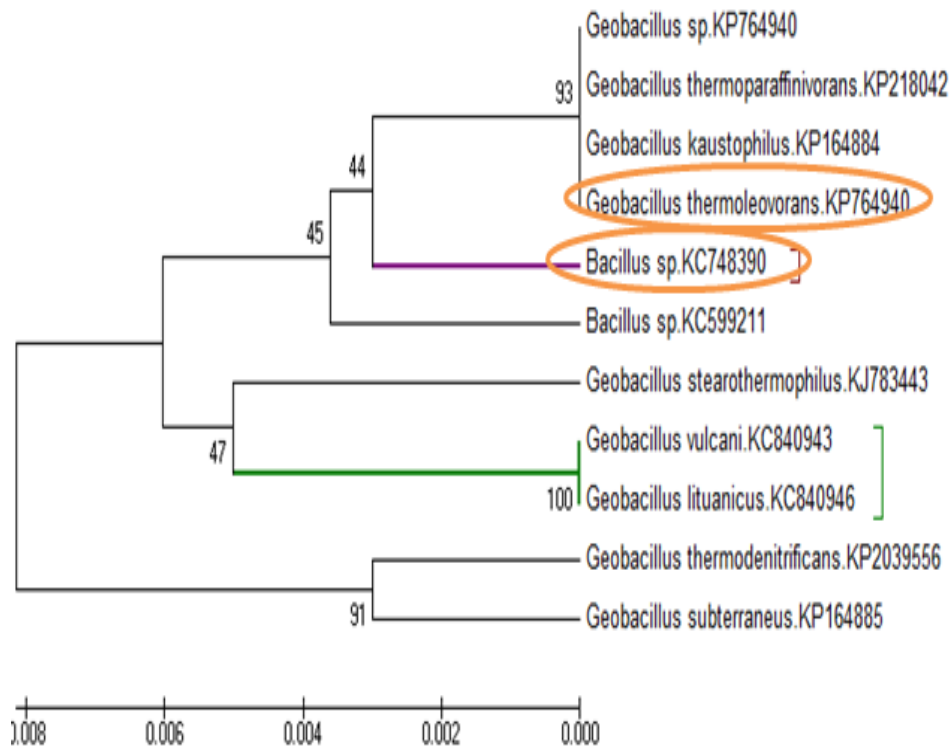
Del alineamiento del secuenciamiento del gen ARNr 16S con el NCBI ambos cultivos se alinearon a los filotipos *Geobacillus thermoleovorans.KP764940* y

*Bacillus sp.KC7483990* al 100% de identidad. Ambos valores hallados de identidad entre genes ARNr 16S son iguales al 100%, lo cual es aceptado para ejercer la relación entre los dos cultivos microbianos, Stackerbrandt y Gobel (1994).

Este género está ampliamente distribuido en ambientes extremófilos, además de presentar resistencia a metales, reportado por Nazina et al (2001).

El género *Bacillus* forma endosporas cuando se encuentra en condiciones no aptas para su desarrollo, tal habilidad le otorga una ventaja competitiva en ambientes de suelo, Yilmaz (2003). Actualmente se vienen estudiando estas especies, ya que se ha reportado que son importantes en la bioadsorción de metales pesados siendo a su vez una potencial alternativa para la biorremediación de estos ambientes.

El árbol filogenético fue construido con las secuencias obtenidas de la amplificación de PCR con el gen 16S, con secuencias similares a éstas, obtenidas de la base de datos del NCBI, basado en las características de resistencia a metales y estudios de oxidación de metales. En la Figura N° 28, nos muestra el árbol filogenético, del cultivo microbiano LK1 y LK2.



**Figura N°28.** Árbol filogenético basado en las distancias, de los cultivos microbianos LK1 y LK2.

Las especies cercanas filogenéticamente a *Bacillus* es un anaerobio facultativo termófilo con capacidad de reducir Fe<sup>+3</sup>, Kanso (2002). El género *Geobacillus* es un género fenotípicamente y filogenéticamente estrechamente relacionado con el género *Bacillus* termófila con alta similitud de secuencia ARNr 16S (98,5-99,2%) pero según Nazina (2001) se separó del género *Bacillus*. Los miembros de *Geobacillus* se han aislado de diversos ambientes terrestres y marinos no sólo en áreas geotérmicas, sino también en las regiones templadas y permanentemente hábitats fríos, McMullan et al. (2004), lo que demuestra una gran capacidad de adaptación a una amplia variedad de nichos ambientales.

En la Tabla N°24, nos muestra la descripción de los microorganismos del género *Geobacillus*, siendo recientemente estudiados.

**Tabla N°24 .Microorganismos relacionados filogenéticamente con los cultivos LK1 y LK2.**

Hit	Accession length	Description Length	Modification	Date	
1	KP764940	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2015/04/27	1421
2	KP764939	<i>Geobacillus sp.</i> SANN THG1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2015/04/27	1489
3	KP218042	<i>Geobacillus thermoparaffinivorans</i> strain EIR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2015/04/13	1748
4	KP203956	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> strain C5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2015/03/31	1339
5	KP164885	<i>Geobacillus subterraneus</i> strain 9W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2015/03/09	507
6	KP164884	<i>Geobacillus kaustophilus</i> strain 8W 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2015/03/09	507
7	KJ783443	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> strain AD-11 16S ribosomal RNA gene.		2015/01/17	1402
8	KC748390	<i>Bacillus sp.</i> gx1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2013/04/29	1482
9	KC599211	<i>Bacillus sp.</i> Jaboi F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2013/05/19	862
10	KC840943	<i>Geobacillus vulcani</i> strain MS4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2013/06/11	693
11	KC840946	<i>Geobacillus lituanicus</i> strain MS9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		2013/06/11	1148

**Fuente: Elaboración propia**

El análisis de la secuencia de ARNr 16S, permitió la identificación de los microorganismos cultivables en sulfuro de cobre.

## CAPÍTULO V

### V.CONCLUSIONES

**PRIMERA:** De las muestras recolectadas del géiser Pinchollo, se microorganismos heterótrofos, seleccionando solo los microorganismos quimiolitótrofos utilizando medio de cultivo selectivo como es el medio 9k-Fe. Se aislaron dos cultivos microbianos termófilos en medio sólido a los cuales se les denominó LK1 y LK2.

**SEGUNDA:** Identificación molecular de los cultivos microbianos cultivables LK1 y LK2, en medios oxidantes de hierro, con una similitud del 100% con *Geobacillus thermoleovorans.KP764940* y *Bacillus sp.KC7483990*; siendo el primer reporte generado del campo geotermal Valle del Colca.

**TERCERA:** Se adaptó el consorcio microbiano termófilo denominado LK, siendo 70°C la temperatura óptima de crecimiento en medio con FeSO<sub>4</sub> con concentraciones de 0,12 M y 0,012 M. También logrando el crecimiento en sulfuro de cobre hasta un 32% del mineral. Siendo considerados microorganismos extremófilos quimiolitótrofos.

**CUARTA:** Se realizó un sistema de bioreactor batch con agitación continua, para las pruebas de biooxidación, donde se obtuvo los siguientes valores: el pH disminuyó desde 6 hasta 2, el ORP aumento desde 80 mV hasta un promedio de 620 mV y la concentración promedio de FeT fue de 5,69 ppm a las 1308 h. En la evaluación de biooxidación presentadas en el consorcio microbiano termófilo LK, frente a la oxidación del ión Fe<sup>+2</sup> control.

**QUINTA:** El promedio del conteo celular del consorcio microbiano en la fase de latencia fue de 1x10<sup>4</sup> cel /mL y en la fase logarítmica fue de 1x10<sup>8</sup> cel/mL a los 40 días teniendo un crecimiento lento, siendo una desventaja frente a otros microorganismos.

Para la cinética microbiana se utilizó la ecuación de Monod obteniendo valores de velocidad específica de crecimiento de  $0,01 \text{ h}^{-1}$ , la constante de Monod de  $13508,950 \text{ g/L}$  y el tiempo de duplicación de  $50,50 \text{ h}$ .



## CAPÍTULO VI

### VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda explorar más morfotipos que se encuentren en estas fuentes termales para realizar su identificación y clasificación taxonómica.
- Se sugiere recolectar muestras recientes y en mayor cantidad del lugar de estudio para obtener datos representativos y realizar un análisis más detallado de la composición y abundancia del ecosistema.
- Es necesario aplicar técnicas moleculares para realizar un análisis más detallado de la filogenia de estas comunidades y aplicar metodologías que permitan conocer las características de estos organismos con fines biotecnológicos, de bioprospección, entre otros campos científicos.
- Realizar estudios de este consorcio, de aireación, para mejorar el proceso de biolixiviación e investigar otros tipos de bioreactores para la eficiencia de esta, como añadirle un sistema continuo.
- Llevar a cabo pruebas más exhaustivas en el proceso de biooxidación de minerales refractarios.

## CAPÍTULO VII

### VII. BIBLIOGRAFIA

1. J. Endter-Wada, R. Kjelgren, y P.G. Johnson. (2010). "Implementing landscape water conservation in public school settings: A case study for situational problem solving". p.283-294.
2. S. Lavie y G. Stotzky. (1986). "Adhesion of the clay minerals montmorillonite, kaolinite, and attapulgite reduces respiration of histoplasma capsulatum, stotzky". p. 65–73.
3. Paul Ralph y Ehrlich. (1990). "The population explosion".p.37-40.
4. Marshall Kc. (1996)." Adhesion as a strategy for access to nutrients. In: fletcher Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity". Washington, Dc. p. 59–87.
5. Fein, M.daughney, C. J. Yee y Davis. (1997). "A chemical equilibrium modern enviroment, lee stocking island, Bahamas". p. 13:201-212.
6. Langley y Beveridge. (1999). "Effect of oside chain lipopolysaccharide chemistry on metal binding". p.65, 489-498.
7. Edgard Donati y María Sofía Urbietta. (2013). "Biodiversidad termófila". Argentina.p.25-29.
8. Urbietta y Sofía. (2011). "Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated form Copahue geothermal, Argentina". Volumen 65.p.336-346.
9. Consultora internacional CRU. (2014).
10. Rawlings. (2002). "Heavy metal mining using microbes". p. 56, 65-91.
11. Rivera. (2010). "Habitat characterization and modeling of the potential distribution of the Military Macaw (*Ara militaris*) in Mexico".p.15-20.
12. Krist, Jansson y Hreggvidsson. (1995). "Acid soils".p.1-4.
13. Rothschild y Mancinelli. (2001). "Life in extreme environments".p.5-10.
14. K. Lower, Christopher y J. Tadanier. (2010). "Dynamics of the mineral–microbe interface: use of biological force microscopy in biogeochemistry and geomicrobiology".p.15-20.

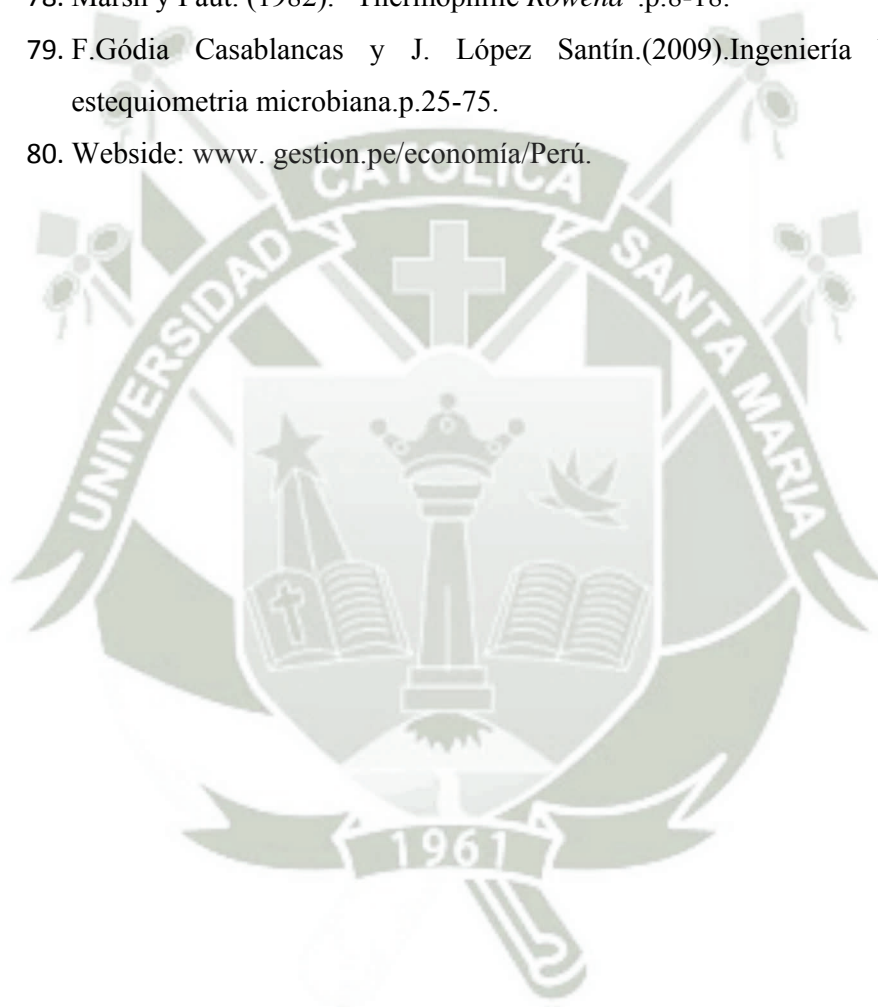
15. Steven, Dopson y Johnson. (2012). “Introducción de microorganismos extremófilos” .p.8-12.
16. Stetter. (1999). “Extremophiles and their adaptation to hot environments” .p.45-55.
17. Synowiecki y Cols. (2006). “Immobilization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by cross-linking with transglutaminase” .p.4-8.
18. Averhoff. (2009). “Sustitución del gen nir A entre cianobacterias termofílicas. clonación, expresión y purificación de la nitrito reductasa de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1” .p.12-18.
19. Rubiano, (2006). “Aislamiento y caracterización de microorganismos hemofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termo minerales de Paipa e Iza” .p.22-28.
20. Soto. (2010). “Presencia de microorganismos del genero *Anoxybacillus* en el campo geotérmico TI Tatio.” . p.12-15.
21. Madigan y Cols. (2003.). “Expresión y estudio de enzimas termoestables de interés biotecnológico”. Madrid.P.30-45.
22. Arias y Cols. (2005). “Algas termófilas: revisión y caso de estudio parque nacional Natural los nevados” .p.17-19.
23. Rodríguez, E. Rueda, A. Pedroza y A. Poutou R. (2002). “Aislamiento. Identificación y caracterización de bacterias termofílicas aeróbicas, con actividad proteolítica a partir de pilas de compost en fase termófilo” .p.1-13.
24. Ministerio de energía y minas. (2007).Informe minero Perú mundo.
25. Juan David Ospina Correa, Laura Osorno Bedoya y Godo. (2006). “Aplicaciones biotecnológicas en minería aurífera: Estado del arte sobre la oxidación bacteriana de arsenopirita (FeAsS)” .p.8-15.
26. Brack. (1986). “Biocorrosión por *Archeobacterias* hipertermófilas y *Eubacterias* termófilas” .p.5-10.
27. Anónimo. (2004). “La marcha de los proyectos ptd (plan de desarrollo teniente). Minería chilena” .p. 5-8.
28. Gentina, y Acevedo. (2005). “Biolixiviación de minerales de oro. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras” .Valparaíso. p. 79-91.

29. Quiroz, R. (2012). “Apunte curso de mineralurgia”. Universidad de Antofagasta .p.20-30.
30. Wills, B.A. (1994). “Tecnología de procesamiento de minerales: tratamiento de menas y recuperación de metales”. México, p.14-23.
31. Domingo Román. Apuntes introducción de la Metalurgia. (2013). Universidad de Antofagasta, facultad de ingeniería de minas.p.7-15.
32. Esteban domic. (2001). “Hidrometalurgia, fundamentos, procesos y aplicaciones”.p.12-18.
33. Gericke, M., 2009. “The effects of elemental sulphur and pyrite on the leaching of nickel laterites using chemolithotrophic bacteria, *Geoffrey, S. Simate, Sehliselo, and Ndlovu*”. University of the Witwatersrand. South Africa.p.45-50.
34. Antonio ballester. (2002). “Mecanismos de Biolixiviación”. Universidad complutense.p.12-17.
35. Rodríguez. (2000). “Contribución al estudio del mecanismo de biolixiviación de distintos sulfuros metálicos con bacterias mesófilas y termófilas”. España.p.24-29.
36. Huber y Wachtershauser. (1997). “Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: asilamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados”.p.5-8.
37. Wachtershauser et al. (1992). “Surface Charges and Interfaces: Implications for Mineral Roles in Prebiotic Chemistry”.p.6-10.
38. Rohwerder. (2003). “Bioleaching review part a: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation”.p.9-12.
39. Brierley y C.L. (1978). “Bacterial Leaching”. Volumen 6.p.207-262.
40. Deveci h., Et al. (2007). “Aqueous metal recovery techniques from e-scrap: hydrometallurgy in recycling”.p.22-30.
41. Rawlings. (2002). “Heavy metal mining using microbes”.p.11-19.
42. Vian, M, Et al. (1986). “A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity”.p.8-12.

43. Marsh, R., Norris, y Roux. (1983). "Growth and mineral oxidation studies with *Sulfolobus*, in recent progress in biohydrometallurgy".p. 71-81.
44. Hutchins y Brierley. (1987). "Microbial pretreatment of refractory sulfide and carbonaceous gold ores, in process mineralogy ".p.53-66.
45. Lens, N. L. y Kkuenen. (2001). "Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology". p. 57-66.
46. Rivera, Camejo, P. y Moya. (2010). "Estudio de biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias tio- y ferro-oxidantes en condiciones termófilas".p.5-35.
47. Espinosa, Revah y Sylvie. (2010). "Rutas metabólicas de oxidación de azufre en bacterias quimiolitotróficas, relevancia ambiental y biotecnología".p.15-20.
48. Berry y Murr. (1978). "Bioleaching of Ok. Tedi copper concentrate in oxygen- and carbon dioxide-enriched air".p.8-14.
49. Rodríguez, Ballester, A., Blázquez, M.L., Gonzales, F. Muñoz y J.A.,(2001). "Mecanismo de Biolixiviación de sulfuros metálicos" .p.665-672.
50. Dutrizac y Mac. Donald. (1974). "A study of chalcopyrite dissolution in acidic ferric nitrate by potentiometric titration". p. 11-15.
51. Ballester Antonio. (2005). "Mecanismo de la Biolixiviación".p.8-16.
52. Rodríguez, Ballester, Blázquez, Gonzales, Muñoz. (2001). "Mecanismo de Biolixiviación de distintos sulfuros metálicos" .Versión 37 .p.665-672.
53. Acevedo, Gentina y J.c. (2005). "Biolixiviación de minerales de cobre. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras".p. 45-61.
54. Pradhan, et al. (2008). "Cheap bioleaching of chalcopyrite: a review. Mineral engineering".p.355-365.
55. Silverman, M. y Lundgren. (1959). "Studies on the chemolithotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*".p. 642-647.
56. Rohwerder, Gehrke, kinzler y Sand. (2003). "Bioleaching review part a: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation" .p. 239-248.
57. Murr y Brierley. (1978). "Microorganisms in reclamation of metals".p.12-15.

58. Groudev y col. (1978). "Mineral leaching of non-supplied nickel ores using heterotrophic micro-organisms".p.4-10.
59. Leroux y col. (1977). "Evidence for phosgene formation during liver microsomal oxidation of chloroform".p.8-10.
60. Brierley y Lockwood. (1977). "The occurrence of thermophilic iron-oxidizing bacteria in a copper leaching system".p.12-18.
61. Gormely y Brannion. (1989). "The use of reactors in biomining processes".p.8-15.
62. Rocío. (1995). "Evaluación de los usos potenciales del terebinto (Moringa oleífera) como generador de materia prima para la industria química".p.15-18.
63. Levenspiel. (1972). "Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree".p.12-18.
64. González et al. (1999). "Géologie de la Sierra de Atapuerca et stratigraphie des remplissages karstiques de Galería et Dolina".p.10-15.
65. Atkins y Poley. (1983). "Desulphurization of coal using bacteria by both dump and process plant techniques".p.13-19.
66. Atkins et al. (1986). "Application of bioleaching to copper mining in Chile".p.15-18.
67. Nikolov et al. (1986). "Kinetics of the ferrous iron oxidation by suspended cells of Thiobacillus ferrooxidans".p.8-18.
68. Acevedo et al. (1988). "Bioleaching of minerals a valid alternative for developing countries".p.24-40.
69. Couillard. (1993). "Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta grandis*".p.11-18.
70. Loi et al. (1995). "Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations".p.8-19.
71. Herrera et al. (1997). "Criterios de diseño del circuito de soluciones en la lixiviación bacteriana de sulfuros de cobre en pilas".p.12-23.
72. Acevedo et al. (1999). "Lixiviación de nitrógeno en función del espaciamiento".p.10-15.
73. Canales et al. (1999). "Efecto del tiempo de residencia sobre la biooxidación de un mineral aurífero refractario".p.10-22.

74. Nedeltchev et al. (1999). "The use of reactors in biomining processes".p.4-15.
75. Rossi. (1999). "Microorganismos Hierro–Azufre Oxidantes Una Alternativa Biotecnológica".p.10-18.
76. Godia Casa Blanca, f., López Santin. (1998). "Cinética microbiana". España. p. 79-104.
77. Sociedad geológica del Perú. (2010). "Características hidrogeológicas del valle del colca, entre Chivay y Maca" Cusco. p.132-135.
78. Marsh y Paut. (1982). "Thermophilic *Rowena*".p.8-18.
79. F.Gódia Casablancas y J. López Santín.(2009).Ingeniería bioquímica estequiometria microbiana.p.25-75.
80. Website: [www.gestion.pe/economía/Perú](http://www.gestion.pe/economía/Perú).

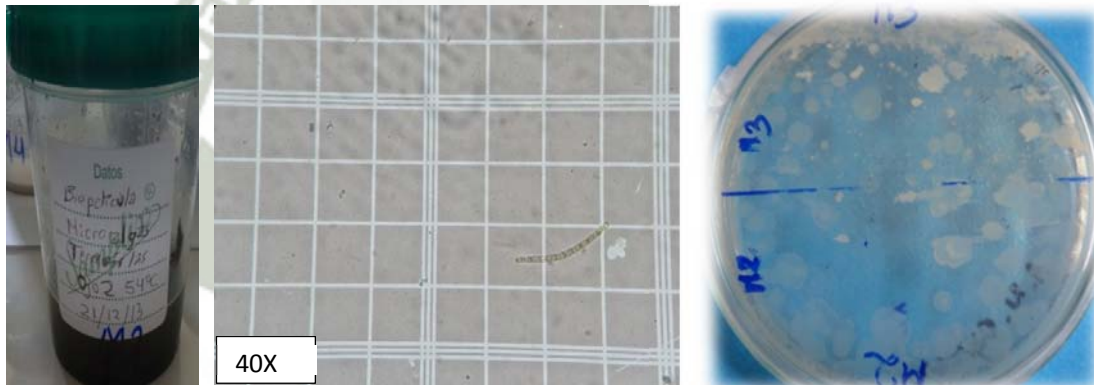
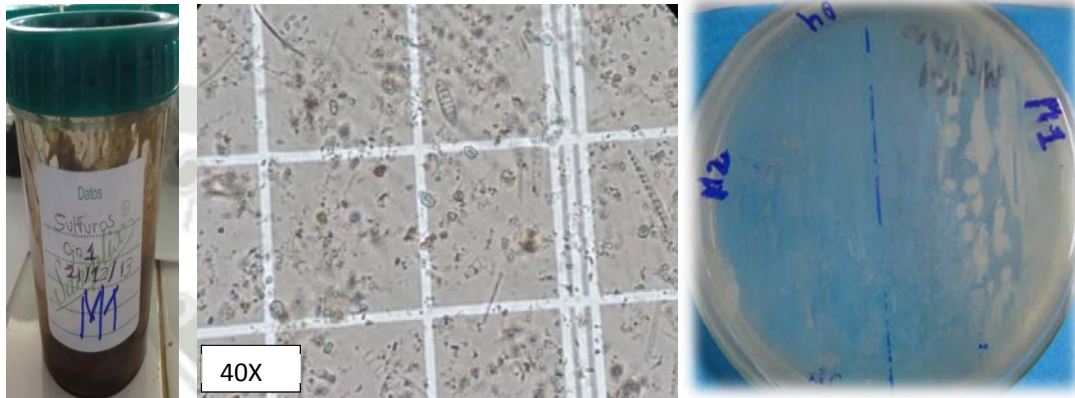


## CAPÍTULO VIII

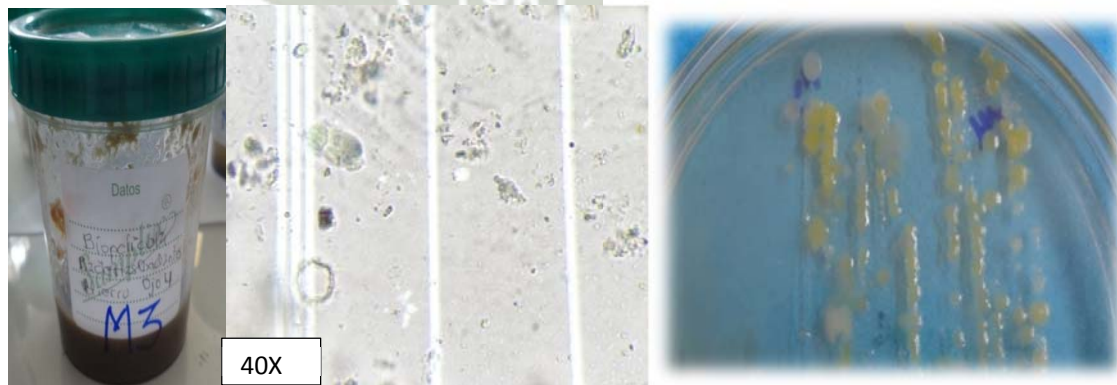
### VIII. ANEXOS

#### Anexo N°1

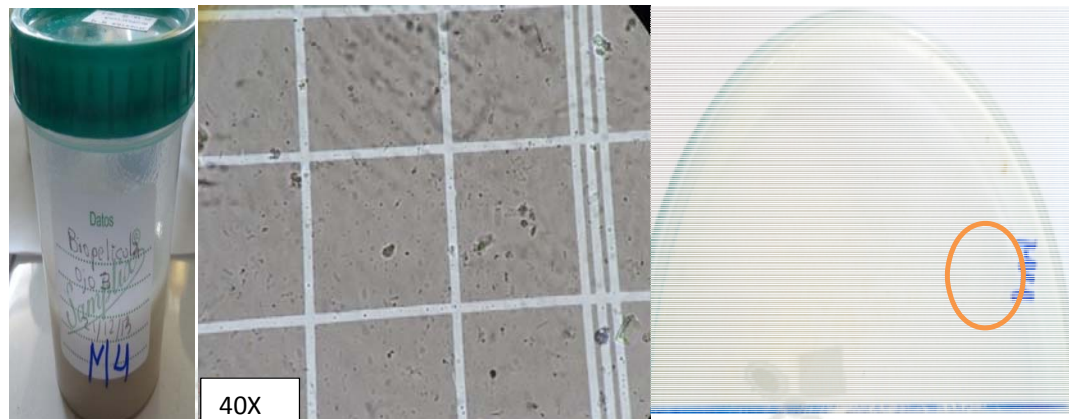
**Muestra N° 1.** Observación al fresco, crecimiento en Agar LB



**Muestra N° 2.** Observación al fresco, crecimiento en Agar LB.



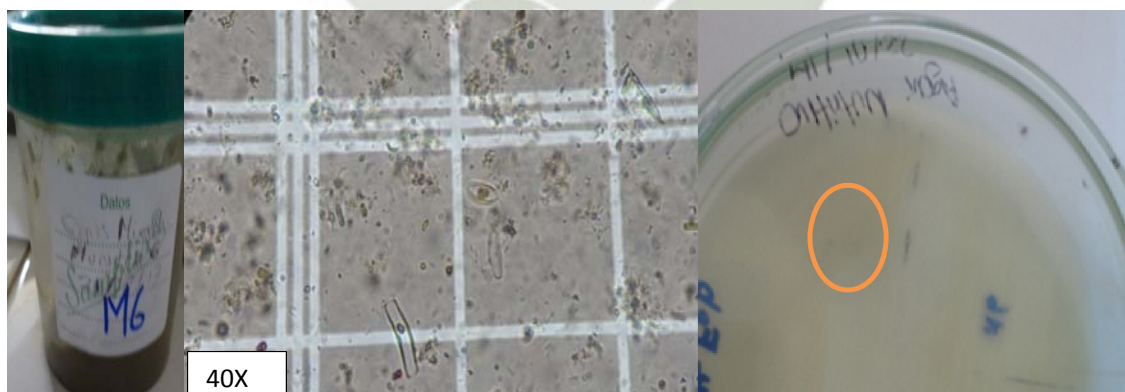
**Muestra N° 3.** Observación al fresco, crecimiento en Agar LB.



**Muestra N° 4.** Observación al fresco, crecimiento en Agar LB.

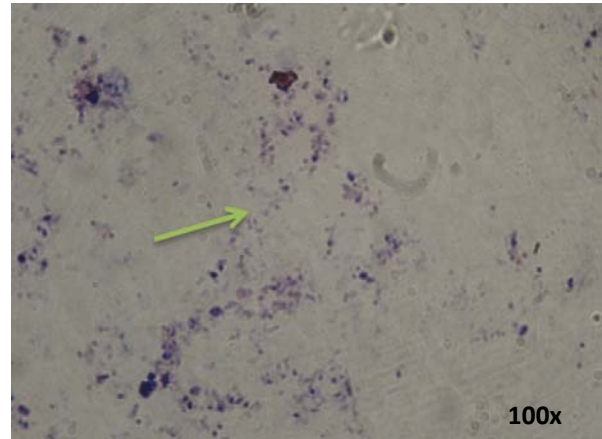
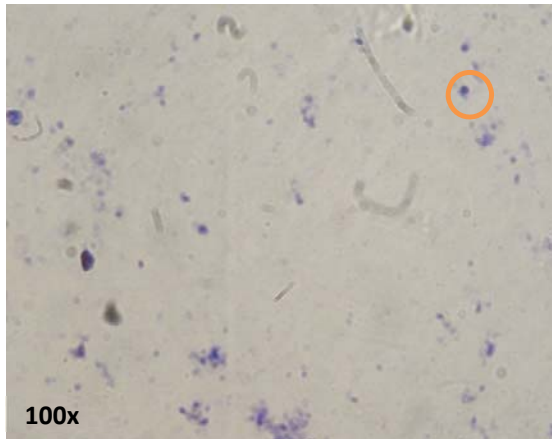


**Muestra N° 5.** Observación al fresco, crecimiento en Agar LB.

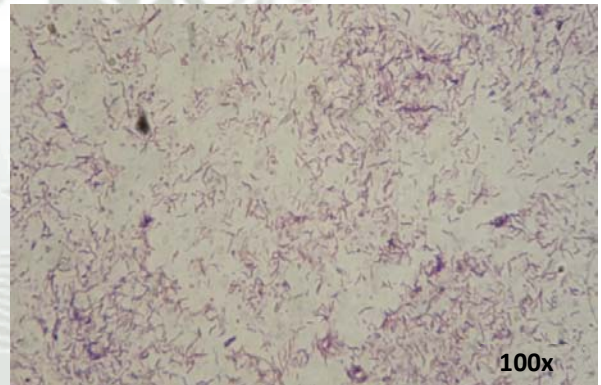
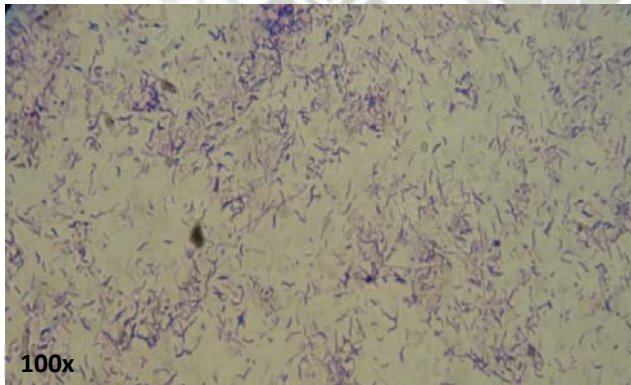


**Muestra N° 6.** Observación al fresco, crecimiento en Agar LB.

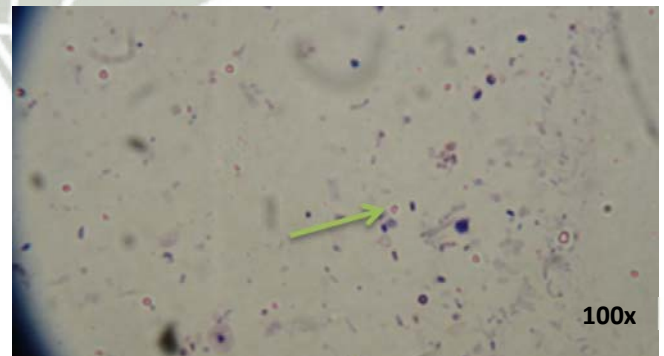
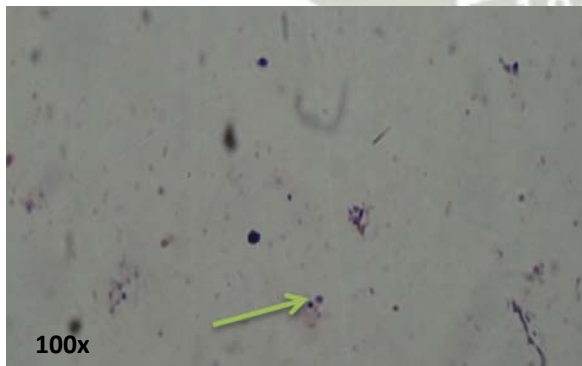
**Anexo N°2**



**Muestra N°1.** Se puede observar cocos gram positivos, conidios, micro conidios segmentados de esporas.



**Muestra N° 2.** Se puede observar bacilos gram positivos y bacilos gram negativos.



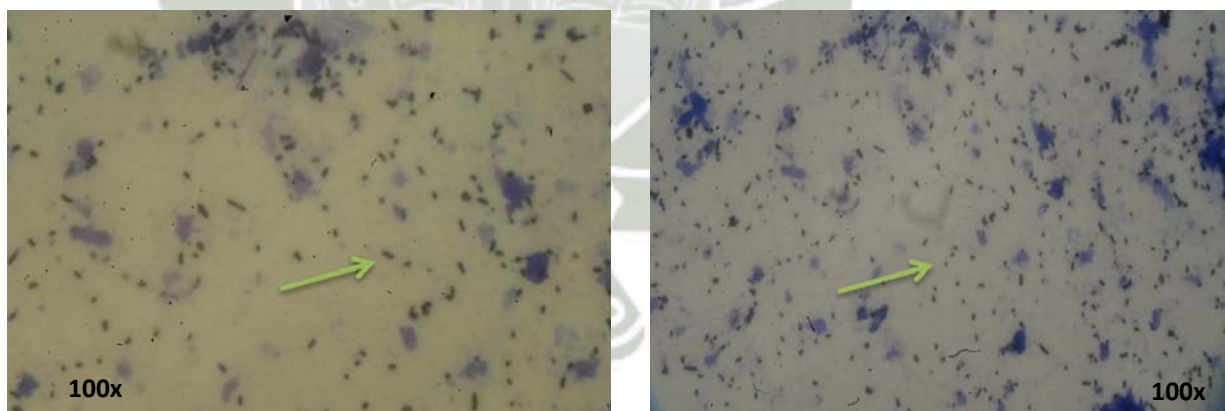
**Muestra 3.** Se puede observar cocos gram positivos, cocobacilos gram positivos.



**Muestra 4.** Se puede observar bacilos gram positivos y diplococos gram positivos.



**Muestra 5.** Se puede observar cocos gram positivos.



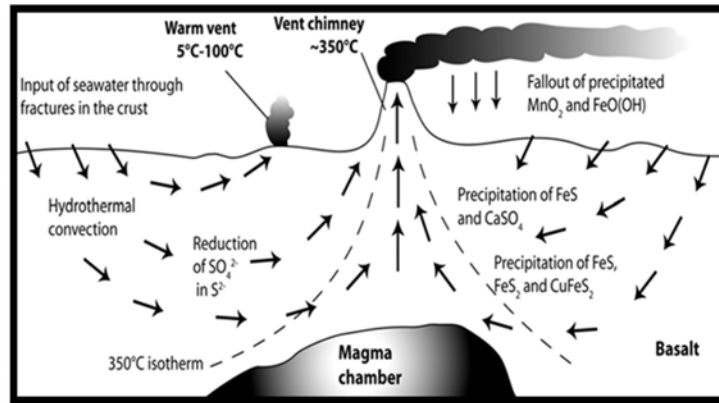
**Muestra N°6.** Se puede observar cocos gram positivos.

Anexo 3

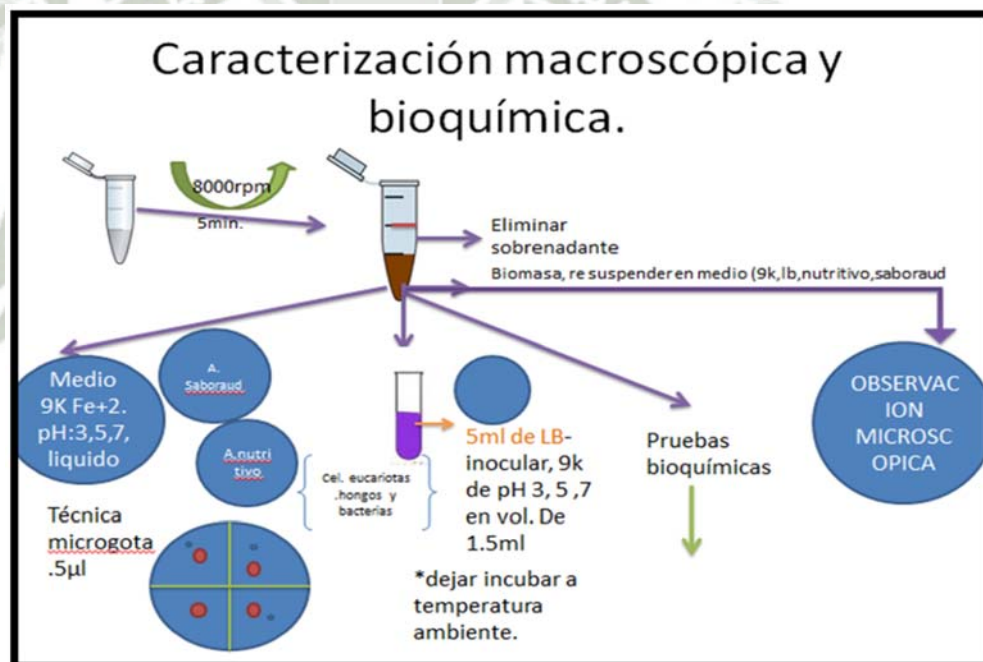
**Tabla N°22.** Clasificación de microorganismos biolixiviantes según Stott, (2002)  
fuente: tesis González, 2010.

	Microorganismo	Dominio	Metabolismo	CuFeS <sub>2</sub>
Mesófilos	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Bacteria	S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Acidithiobacillus albertus</i>	Bacteria	S <sup>0</sup>	
	<i>Thiobacillus plumbophilus</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , MS	
	<i>Thiobacillus prosperus</i>	Bacteria	S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Thiomonas cuprina</i>	Bacteria	S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	
	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , MS	✓
	<i>Acidiphilium acidophilum</i>	Bacteria	S <sup>0</sup>	
	<i>Ferromicrobium acidiphilum</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , MS	
	<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	Arquea	Fe <sup>+2</sup> , MS	
Termófilos Moderados	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Sulfobacillus acidophilum</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup> , MS	✓
	<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup>	
	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Bacteria	Fe <sup>+2</sup>	
	<i>Sulfobacillus-like strain</i>	Bacteria	S <sup>0</sup> , MS	
	<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Arquea	Fe <sup>+2</sup> , MS	
Termófilos extremos	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Arquea	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	
	<i>Sulfolobus metallicus</i>	Arquea	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Sulfolobus yangmingensis</i>	Arquea	S <sup>0</sup>	
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Arquea	S <sup>0</sup>	
	<i>Sulfolobus hakonensis</i>	Arquea	S <sup>0</sup>	
	<i>Sulfolobus shibitae</i>	Arquea	S <sup>0</sup> , MS	
	<i>Acidianus brierleyi</i>	Arquea	S <sup>0</sup>	
	<i>Acidianus infernus</i>	Arquea	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Acidianus ambivalens</i>	Arquea	S <sup>0</sup>	
	<i>Metallosphaera sedula</i>	Arquea	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Metallosphaera prunae</i>	Arquea	S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Sulfurococcus yellowstonii</i>	Arquea	Fe <sup>+2</sup> , S <sup>0</sup> , MS	✓
	<i>Sulfurococcus mirabilis</i>	Arquea	S <sup>0</sup>	
<i>Sulfurisphaera ohwakuensis</i>	Arquea	S <sup>0</sup>		

Anexo 4.



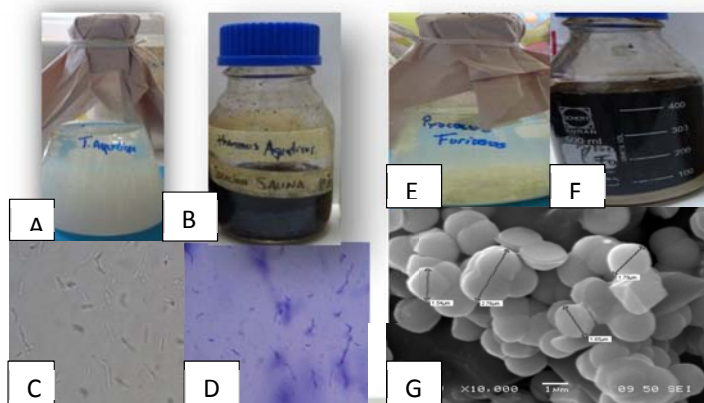
Fuente: Madigan et Al.



Fuente: Elaboración propia.

Esquematación del proceso para la caracterización microbiológica.

Anexo 6.



A) Medio *Thermus aquaticus* DSM625 B) Reducción de medio) observación microscópica 100x d) observación microscópica con tinción azul de metileno, e) medio *Pyrococcus furiosus* DSM3638, f) reducción de medio g) microscopia electrónica *P.F.* DSM3638, Cocos flagelados, fragmentos ligeramente irregulares móviles, regulares de 0,8 a 2,5 mm de ancho.

**Anexo 7.**

**I. Lugar de muestreo**



Se recolectaron muestras de mineral para las actividades prácticas de biolixiviación del laboratorio de Biominería. Las muestras fueron recolectadas en la provincia Acari, (Arequipa), al sur de Perú.

- ✓ Mineral de baja Ley <sup>1</sup>
- ✓ Mineral de baja Ley <sup>2</sup>
- ✓ Mineral de alta Ley <sup>3</sup>

Los minerales fueron procesados según las necesidades de la experiencia práctica como se indica más adelante.



**Mineral de  
baja Ley <sup>1</sup>**



**Mineral de  
baja Ley <sup>2</sup>**



**Mineral de alta  
Ley <sup>3</sup>**

## II Molienda del mineral en el Plato (Batán):



La molienda del mineral se lleva a cabo en un BATÁN previamente ambientado para evitar contaminación de la muestra. Limpieza de Plato de molienda (A)(B).



(A)



(B)

Posteriormente a la limpieza y ambientación, son adicionados aproximadamente 30 gr del mineral a moler para ambientar Batán. El mineral es molido y esparcido por todo el plato, luego es eliminado.



(C)

**Imagen C:** Ambientación del Batán con mineral (C).

### III .Tamizado del Mineral:

Luego de moler el mineral en el Batán este es tamizado. Se procede a separar las partículas por tamaño mediante un tamiz de 8mm para moler nuevamente aquellas más grandes que no han logrado pasar por el tamiz.



Mineral de baja Ley <sup>1</sup>



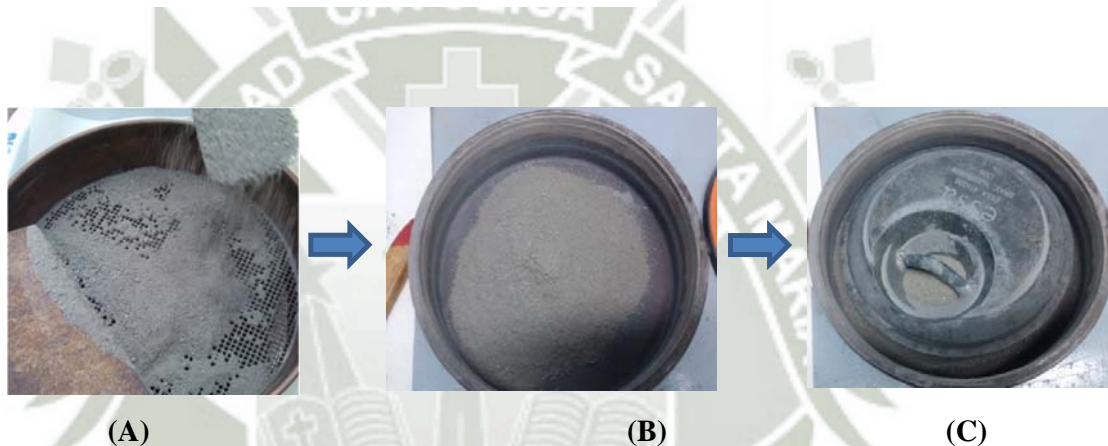
Mineral de baja Ley <sup>2</sup>



Mineral de alta Ley <sup>3</sup>

#### IV. Pulverizado del Mineral en molino de anillo ESSA

El mineral luego de ser tamizado es pulverizado utilizando un molino de anillo ESSA (Trituradora de discos vibrantes para laboratorio). Este pulverizador procesa muestras metalúrgicas, cerámicas, suelos, agregados, químicos y partículas similares. La mayoría de las muestras pueden ser pulverizadas hasta en un 95% a menos de 75 micrones en 1 a 3 minutos, dependiendo de sus características físicas. Los minerales utilizados para la experiencia práctica fueron pulverizados durante 3 minutos.



Mineral molido luego de ser tamizado (A), una parte es adicionada en el vaso de molienda (B), superponiendo el anillo de molienda (C) para luego ser pulverizado.



(D)



(E)



(F)



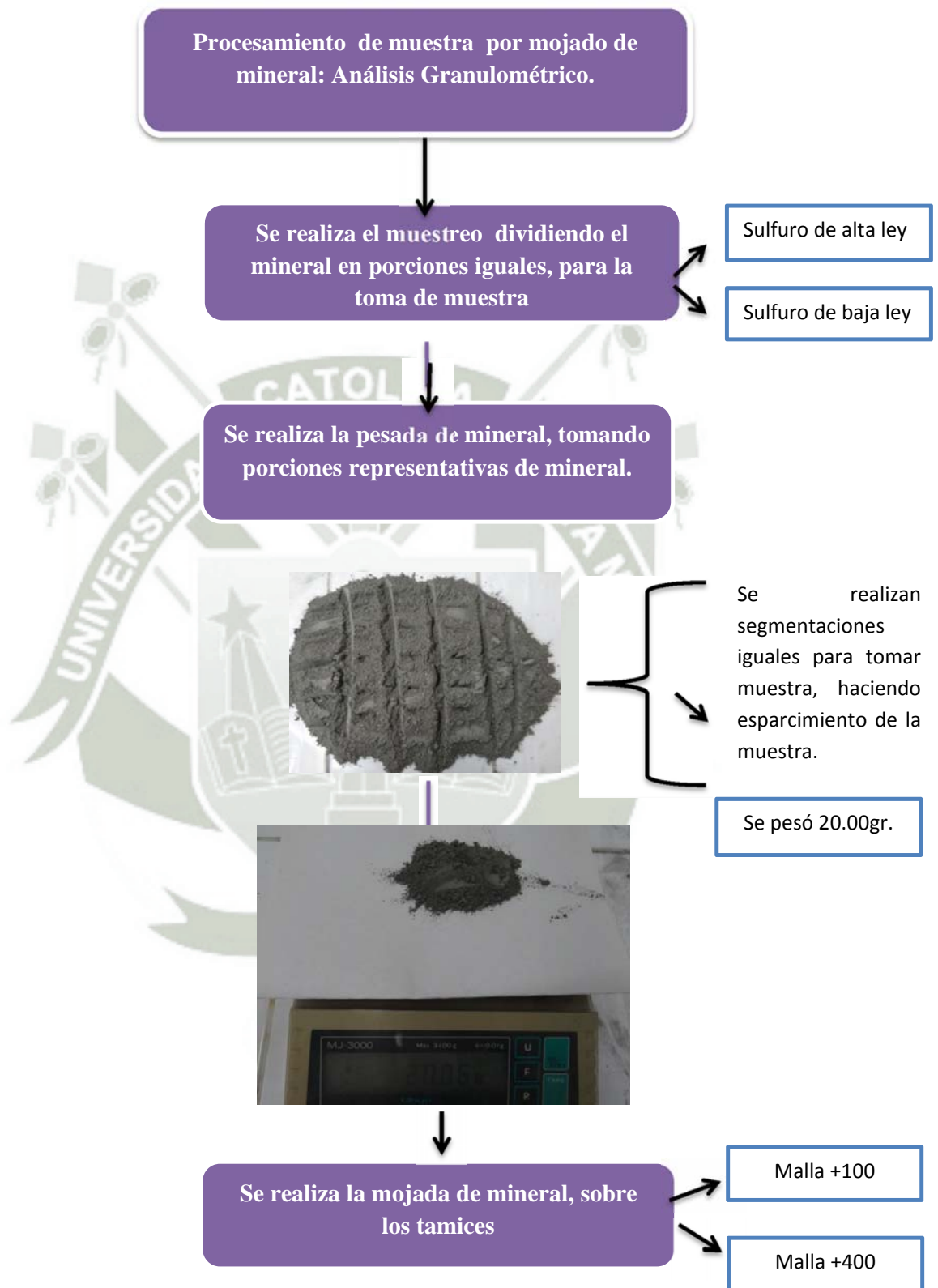
(G)

Ensamblaje de anillo y disco para pulverizar mineral **(D)(E)(F)**. Al terminar cada pulverización las piezas del molino son limpiadas con un compresor de aire **(G)** y ambientadas con el mineral a pulverizar, para evitar mayor contaminación entre muestras.



**Minerales Pulverizados**

### V. Evaluación del tamaño





Se colocó en la parte superior el tamizaje N°100 de 150  $\mu\text{m}$  y en la parte inferior el tamizaje N°400 de 38  $\mu\text{m}$ .



Se humedece la muestra con agua destilada, haciéndola pasar desde la malla N°100 hasta la malla N°400 , hasta tener un filtrado limpio.





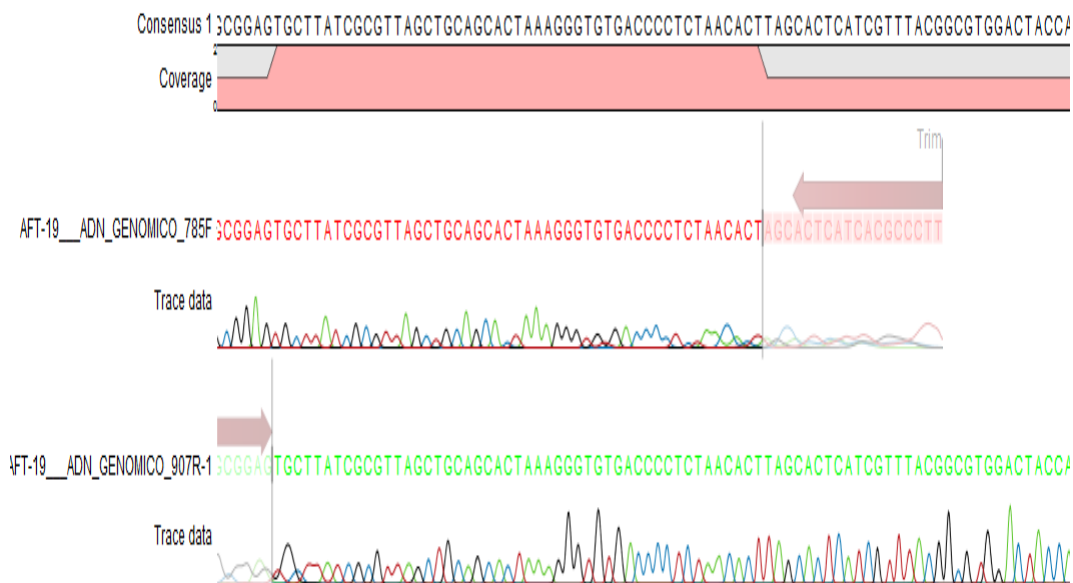
Se puede observar que queda mineral retenido en cada malla, se hace caer el mineral con lavados colocándose sobre una bandeja, para luego dejar secar en estufa.



Secado a 80 °C, se coloca las bandejas con mineral mojado , durante 48 horas y se cuantifica el peso final .

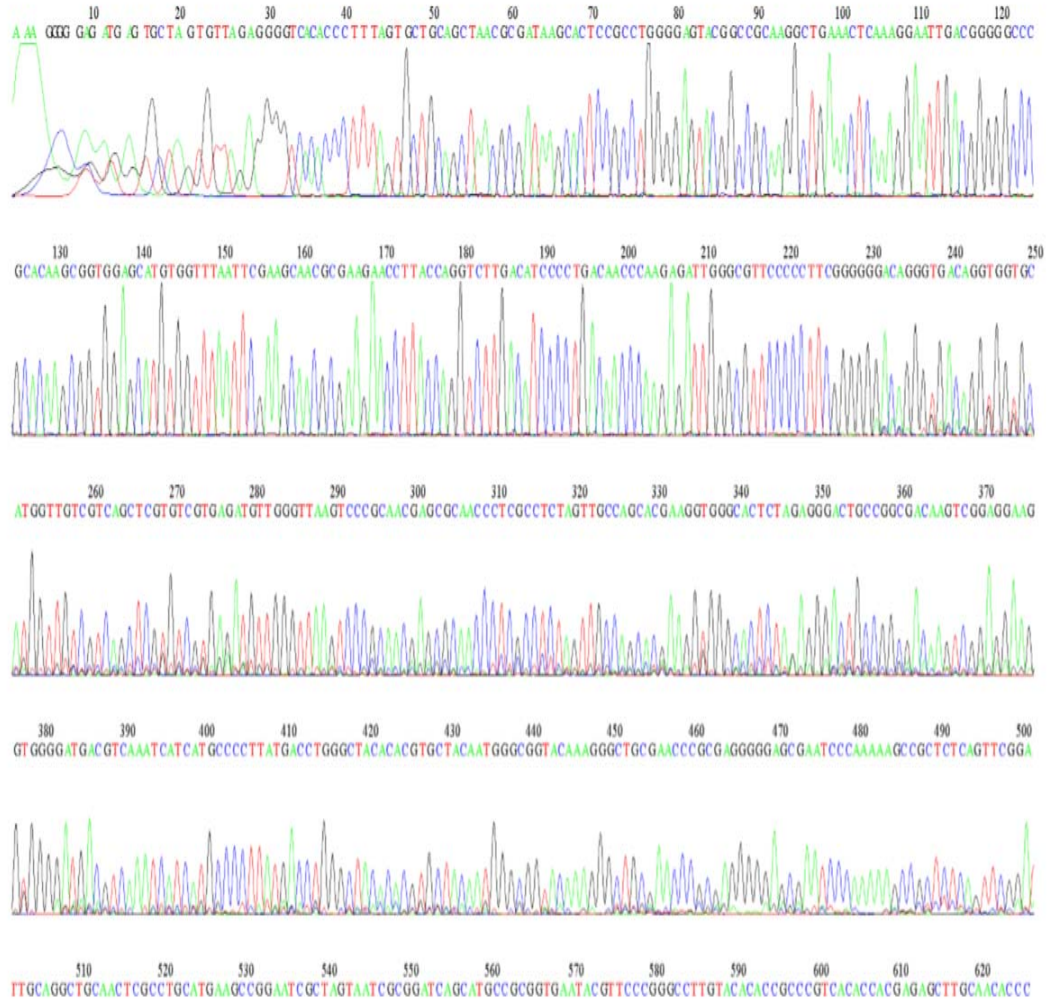
### Anexo 8

Secuencia consenso, del alineamiento del secuenciamiento del gen ARNr 16 S con el NCBI, programa CLC versión 6.1

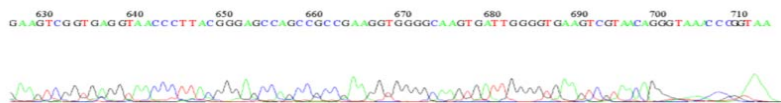




File: TM-18\_785F.ab1 Run Ended: 2015/4/29 0:39:43 Signal G:1896 A:1621 C:2553 T:1665  
Sample: TM-18\_785F Lane: 67 Base spacing: 15.496304 714 bases in 8546 scans Page 1 of 2



File: TM-18\_785F.ab1 Run Ended: 2015/4/29 0:39:43 Signal G:1896 A:1621 C:2553 T:1665  
Sample: TM-18\_785F Lane: 67 Base spacing: 15.496304 714 bases in 8546 scans Page 2 of 2



Anexo 9

Microorganisms



**74. THERMUS THERMOPHILUS MEDIUM**

Yeast extract (BD Difco)	4.0	g
Proteose peptone Nr. 3 (BD Difco)	8.0	g
NaCl	2.0	g
Distilled water	1000.0	ml

Adjust pH to 7.0.

The original medium description specifies polypeptone, which appears to be no longer available.

MEDIO LB  
10 g / L de triptona  
5 g / l de extracto de levadura  
5 g / L NaCl

descripción general

Lennox LB es un medio de crecimiento microbiano altamente referenciado - utilizado para el cultivo de E. coli. Este caldo microbiana rica en nutrientes contiene péptidos , aminoácidos, vitaminas solubles en agua, hidratos de carbono y en una formulación baja en sal.

Revuelva para suspender polvo 20g en agua 1L . Autoclave durante 15 minutos a 121C para esterilizar.

Medio tiosulfato

Tiosulfato 5g/L.

## Anexo 10

Medio sólido para amilasas

Medio de Cultivo	Concentración
Almidón	1%
Extracto de Levadura	0,2%
Peptona	2%
Sulfato de Magnesio	0,05%
Agar agar	1.7%
pH	7
Esterilización	Vapor a 121°C por 15 minutos

Se preparó 100 mL y se gelifico en 5 placas, para realizar la siembra del inóculo.



pH



Medio sólido para celulasas

Medio de Cultivo	Concentración
Carboximetilcelulasa CMC	1%
Extracto de Levadura	0,5%
Peptona	0,5%
Sulfato de amonio	0,25%
Cloruro de Calcio	0,05%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,01%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,01%
pH	7

Solución Buffer, para ajustar el pH.

La producción de celulasas se observa con rojo fenol (Halo amarillento) o yodo al 0,5% (Halo blanquecino).



## Anexo 11



### Detailed Protocol (Describes what is happening at each step)

Please wear gloves at all times

1. To the **PowerBead Tubes** provided, add 0.25 grams of soil sample.

*What's happening:* After your sample has been loaded into the PowerBead Tube, the next step is a homogenization and lysis procedure. The PowerBead Tube contains a buffer that will (a) help disperse the soil particles, (b) begin to dissolve humic acids and (c) protect nucleic acids from degradation.

2. Gently vortex to mix.

*What's happening:* Gentle vortexing mixes the components in the PowerBead Tube and begins to disperse the sample in the PowerBead Solution.

3. **Check Solution C1.** If **Solution C1** is precipitated, heat solution to 60°C until the precipitate has dissolved before use.

*What's happening:* Solution C1 contains SDS and other disruption agents required for complete cell lysis. In addition to aiding in cell lysis, SDS is an anionic detergent that breaks down fatty acids and lipids associated with the cell membrane of several organisms. If it gets cold, it will form a white precipitate in the bottle. Heating to 60°C will dissolve the SDS and will not harm the SDS or the other disruption agents. Solution C1 can be used while it is still warm.

4. Add 60 µl of **Solution C1** and invert several times or vortex briefly.

5. Secure **PowerBead Tubes** horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog# 13000-V1-24) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.

**Note:** If you are using the 24 place Vortex Adapter for more than 12 preps, increase the vortex time by 5-10 minutes.

**Note:** The vortexing step is critical for complete homogenization and cell lysis. Cells are lysed by a combination of chemical agents from steps 1-4 and mechanical shaking introduced at this step. By randomly shaking the beads in the presence of disruption agents, collision of the beads with microbial cells will cause the cells to break open.

*What's happening:* The MO BIO Vortex Adapter is designed to be a simple platform to facilitate keeping the tubes tightly attached to the vortex. It should be noted that although you can attach tubes with tape, often the tape becomes loose and not all tubes will shake evenly or efficiently. This may lead to inconsistent results or lower yields. Therefore, the use of the MO BIO Vortex Adapter is a highly recommended and cost effective way to obtain maximum DNA yields.

6. Make sure the **PowerBead Tubes** rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x g for 30 seconds at room temperature. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x g or tubes may break.

7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml **Collection Tube** (provided).

8. Add 250  $\mu$ l of **Solution C2** and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.

*What's happening: Solution C2 is patented Inhibitor Removal Technology<sup>®</sup> (IRT). It contains a reagent to precipitate non-DNA organic and inorganic material including humic substances, cell debris, and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.*

9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

10. Avoiding the pellet, transfer up to 600  $\mu$ l of supernatant to a clean 2 ml **Collection Tube** (provided).

*What's happening: The pellet at this point contains non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. For the best DNA yields, and quality, avoid transferring any of the pellet.*

11. Add 200  $\mu$ l of **Solution C3** and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.

*What's happening: Solution C3 is patented Inhibitor Removal Technology<sup>®</sup> (IRT) and is a second reagent to precipitate additional non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. It is important to remove contaminating organic and inorganic matter that may reduce DNA purity and inhibit downstream DNA applications.*

12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

13. Transfer up to 750  $\mu$ l of supernatant to a clean 2 ml **Collection Tube** (provided).

*What's happening: The pellet at this point contains additional non-DNA organic and inorganic material including humic acid, cell debris, and proteins. For the best DNA yields, and quality, avoid transferring any of the pellet.*

14. Shake to mix **Solution C4** before use. Add 1.2 ml of **Solution C4** to the supernatant (be careful solution doesn't exceed rim of tube) and vortex for 5 seconds.

*What's happening: Solution C4 is a high concentration salt solution. Since DNA binds tightly to silica at high salt concentrations, this will adjust the DNA solution salt concentrations to allow binding of DNA, but not non-DNA organic and inorganic material that may still be present at low levels, to the Spin Filters.*

15. Load approximately 675  $\mu$ l onto a **Spin Filter** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675  $\mu$ l of supernatant to the **Spin Filter** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the **Spin Filter** and centrifuge at 10,000 x g for 1 minute at room temperature.

**Note:** A total of three loads for each sample processed are required.

*What's happening: DNA is selectively bound to the silica membrane in the Spin Filter device in the high salt solution. Contaminants pass through the filter membrane, leaving only DNA bound to the membrane.*

16. Add 500  $\mu$ l of **Solution C5** and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

*What's happening: Solution C5 is an ethanol based wash solution used to further clean the DNA that is bound to the silica filter membrane in the Spin Filter. This wash solution removes residual salt, humic acid, and other contaminants while allowing the DNA to stay bound to the silica membrane.*

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: [technical@mobio.com](mailto:technical@mobio.com) Website: [www.mobio.com](http://www.mobio.com)



17. Discard the flow through from the 2 ml Collection Tube.

*What's happening: This flow through fraction is just non-DNA organic and inorganic waste removed from the silica Spin Filter membrane by the ethanol wash solution.*

18. Centrifuge at room temperature for 1 minute at 10,000 x g.

*What's happening: This second spin removes residual Solution C5 (ethanol wash solution). It is critical to remove all traces of wash solution because the ethanol in Solution C5 can interfere with many downstream DNA applications such as PCR, restriction digests, and gel electrophoresis.*

19. Carefully place Spin Filter in a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any Solution C5 onto the Spin Filter.

**Note:** It is important to avoid any traces of the ethanol based wash solution.

20. Add 100 µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane.

**Note:** Placing the Solution C6 (sterile elution buffer) in the center of the small white membrane will make sure the entire membrane is wetted. This will result in a more efficient and complete release of the DNA from the silica Spin Filter membrane. As Solution C6 (elution buffer) passes through the silica membrane, DNA that was bound in the presence of high salt is selectively released by Solution C6 (10 mM Tris) which lacks salt.

Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for DNA elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog# 17000-10). Solution C6 contains no EDTA. If DNA degradation is a concern, Sterile TE may also be used instead of Solution C6 for elution of DNA from the Spin Filter.

21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x g.

22. Discard the Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). Solution C6 does not contain any EDTA. To concentrate DNA see the Hints & Troubleshooting Guide.

Thank you for choosing the PowerSoil® DNA Isolation Kit.

Anexo 12



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS  
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166  
laboratoriensayouucsm@gmail.com http://www.ucsm.edu.pe Aptdo. 1350  
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO  
N° DE INFORME: ANA31C14.001156B

Nombre del Cliente	: LEYLA ROSSELL PAREDES
Dirección del Cliente	: VILLA PAMPA CALLE PROGRESO 123 SOCABAYA
RUC	: NO DECLARA
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: AGUA GEISER
Tamaño de muestra	: 100 mL
Fecha de Recepción	: 31/03/2014
Fecha de Inicio del Ensayo	: 31/03/2014
Fecha de Emisión de Informe	: 10/04/2014
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE HIERRO TOTAL (mg/L)	
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	0,557
DETERMINACION DE SULFATOS (mg/L)	
NTP 214.023.2000, Método Turbidimétrico	288,7

OBSERVACIONES:  
Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-CRT

C. Ricardo A. Abril Ramirez  
CQFDA 00624





## Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado  
Arequipa Perú / Apartado 2102

Tel: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

### INFORME DE ENSAYO LAS-14-06314

Señora: Leyla Rosal Paredes  
Dirección: Calle Progreso 123 Bellavista Socobaya Arequipa  
Atención: Leyla Rosal Paredes  
Recepción: 02/12/2014  
Realización: 02/12/2014

Fecha de emisión: 03/12/2014

Pág.: 1/1

Método de ensayo aplicado

- 969 Método de Ensayo para fierro fundido por Volarotrio
- 911 Método de ensayo para Fierro por Absorción Atómica en solución ácida
- 903 Método de ensayo para Cobre por Absorción Atómica en solución Ácida

Muestra #	Nombre de muestra	Descrip. de muestra	Procedencia de la muestra	969 Fe+2 mg/L	911 Fe mg/L	903 Cu mg/L
SS14001451	CONTROL A	Acido	Acari	-----	1,97	4,83
SS14001452	CONTROL B	Acido	Acari	-----	3,57	10,47
SS14001453	CONTROL C	Acido	Acari	-----	0,87	1,34
SS14001454	CONTROL D	Acido	Acari	-----	1,22	5,48
SS14001455	CONTROL E	Acido	Acari	-----	0,90	0,73
SS14001456	CONTROL F	Acido	Acari	-----	1,11	0,71
SS14001457	CONTROL G	Acido	Acari	-----	0,26	1,31
SS14001458	CONTROL H	Acido	Acari	-----	0,06	1,10
SS14001459	CONTROL I	Acido	Acari	-----	0,28	1,04
SS14001460	CONTROL J	Acido	Acari	-----	0,28	1,88
SS14001462	CONTROL K	Acido	Acari	-----	2,40	5,83
SS14001463	CONTROL L	Acido	Acari	-----	0,23	1,02
SS14001464	CONTROL M	Acido	Acari	-----	6,50	151,8
SS14001465	CONTROL N	Acido	Acari	-----	0,82	2,07
SS14001486	CONTROL O	Acido	Acari	-----	0,95	1,62
SS14001457	CONTROL P	Acido	Acari	-----	1,63	1,22
SS14001458	CONTROL Q	Acido	Acari	6000	5720	4032
SS14001459	CONTROL R	Acido	Acari	-----	0,46	0,56

«Valor numérico» = Límite de detección del método, «Valor Numérico» = Límite de cuantificación del método.  
 Todos los datos de los ensayos deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producción con sujeción a las condiciones de producción de la entidad que lo produce. Este informe no debe presentarse como evidencia relacionada a la muestra en disputa.  
 Está estrictamente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier uso no autorizado de este informe de presente documento incurrirá en sanciones.