

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**

**“ALBERTO CAZORLA TALLERI”**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD LIXIVIANTE DE  
ACTINOMICETOS AISLADOS DE CONCENTRADOS Y RELAVES  
MINEROS EN PERÚ**

**AUTOR:  
DANIEL FERNANDO UGARTE ÑAÑEZ**

**ASESORA:  
Dra. JASMIN ELENA HURTADO CUSTODIO DE BERASTAIN**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**LIMA – PERÚ**

**2016**

**ASESORA:**

Dra. Jasmin Helena Hurtado Custodio de Berastain

**JURADO:**

**Presidenta:** M.Sc. Dora Maurtua Torres

**Vocal:** M.Sc. Jaime Languasco Bambaren

**Secretaria:** M.Sc. Ruth Cristóbal Delgado

## **AGRADECIMIENTO**

Esta Tesis fue financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y la Productividad (Innovate Perú) bajo el contrato 235-FincyT-IA-2013.

## INDICE

|  | Página    |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b>   |           |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                 | <b>1</b>  |
| <b>II. OBJETIVOS</b>                                   | <b>8</b>  |
| <b>2.1 OBJETIVO GENERAL</b>                            | <b>8</b>  |
| <b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>                       | <b>8</b>  |
| <b>III. HIPÓTESIS</b>                                  | <b>8</b>  |
| <b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                        | <b>9</b>  |
| <b>4.1 MEDIOS DE CULTIVO</b>                           | <b>9</b>  |
| <b>4.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS</b>                         | <b>10</b> |
| <b>4.3 MUESTRAS DE MINERALES</b>                       | <b>10</b> |
| <b>4.4 MÉTODOS</b>                                     | <b>10</b> |
| <b>4.4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA EN AAC</b>        | <b>10</b> |
| <b>4.4.2 CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE pH</b>    | <b>11</b> |
| <b>4.4.3 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE HIERRO FERROSO</b> | <b>12</b> |
| <b>4.4.4 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE TIOSULFATO</b>     | <b>12</b> |
| <b>4.4.5 LIXIVIACIÓN BACTERIANA</b>                    | <b>13</b> |
| <b>4.4.6 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS</b>            | <b>14</b> |
| <b>4.4.7 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS</b>                 | <b>15</b> |
| <b>V. RESULTADOS</b>                                   | <b>16</b> |
| <b>5.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA EN AAC</b>          | <b>16</b> |
| <b>5.2 CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE pH</b>      | <b>17</b> |
| <b>5.3 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE HIERRO FERROSO</b>   | <b>17</b> |
| <b>5.4 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE TIOSULFATO</b>       | <b>18</b> |
| <b>5.5 LIXIVIACIÓN BACTERIANA</b>                      | <b>20</b> |
| <b>5.6 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS</b>              | <b>24</b> |
| <b>5.7 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS</b>                   | <b>25</b> |
| <b>VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>                     | <b>26</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONES</b>                               | <b>32</b> |
| <b>VIII. RECOMENDACIONES</b>                           | <b>32</b> |
| <b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                  | <b>34</b> |
| <b>X. ANEXOS</b>                                       | <b>40</b> |

## RESUMEN

La minería es una actividad importante para la economía del Perú. La riqueza de sus yacimientos mineros les ofrece una reconocida competitividad frente a los demás países de la región. El interés por desarrollar alternativas para implementar procesos sostenibles y económicos se debe a que los procesos de extracción actualmente usados en el sector minero requieren un alto costo debido a la complejidad de los minerales. Por ello, el uso de la biotecnología como la lixiviación bacteriana representa una alternativa a dichos procesos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad lixivante de 24 cepas de actinomicetos aislados de concentrados y relaves mineros, provistas por el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Las cepas se sembraron en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 (AAC) a diferentes niveles de pH, siendo el pH 7 óptimo para su desarrollo. Asimismo, en medio AAC 1/10 con hierro ferroso (10 ppm) y tiosulfato de sodio (1 g/L); en los que las cepas pudieron crecer a pH 7, pero no fueron capaces de oxidar estos compuestos. Posteriormente se realizó una prueba de crecimiento en AAC 1/10 a pH 7 al 5% de mineral (Relave aurífero de arsenopirita y mineral enargita de cobre). De las 24 cepas solo crecieron 3 (21, E1 y AB5) en el relave de arsenopirita. Con estas 3 cepas se realizó una prueba de adaptación, por lo que se sembraron en frascos con 100 ml de AAC y mineral al 5% a 28°C por 30 días. El análisis del medio líquido indicó que las cepas solubilizaron aproximadamente 1% de arsénico del relave. Se realizó una prueba de lixiviación en 500 mL y se obtuvo que la cepa E1 y AB5 lixiviaron 16.61% y 13.45% de arsénico del relave, respectivamente. Se evaluó la formación de ácidos orgánicos a partir de diferentes sustratos en estas dos cepas, pero solo AB5 acidificó el medio a partir de lactosa. Las cepas E1 y AB5 podrían ser una alternativa de tratamiento de minerales, pero se necesita continuar con los estudios.

**Palabras clave:** Actinomicetos, lixiviación bacteriana, oxidación de hierro ferroso, oxidación de tiosulfato, arsenopirita, enargita, minería, Perú

## ABSTRACT

Mining is an important activity for the economy of Peru. The richness of its mineral deposits offers a recognized competitiveness against other countries in the region. The interest in developing new ways to implement sustainable and economic processes is because extraction processes currently used in the mining sector require a high cost due to the complexity of minerals. Therefore, the use of bacterial leaching is an alternative to these processes. The aim of this study was to evaluate the leaching capacity of 24 strains of actinomycetes isolated from concentrates and tailings, provided by the Environmental Biotechnology Laboratory of the Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Strains were seeded on Liquid Starch Casein (AAC) 1/10 at different pH levels, which pH 7 was optimal for their development. Also, in AAC medium with ferrous-iron (10 ppm) and sodium thiosulfate (1 g/L); in which the strains were able to grow at pH 7, but were not able to oxidize these compounds. Subsequently a test was carried in AAC 1/10 pH 7 and 5% ore samples (auriferous arsenopyrite tailing and copper enargite). Of the 24 strains only 3 grew (21, E1 and AB5) in the arsenopyrite tailing. With these three strains one adaptation test was performed, so they were seeded in flasks with 100 ml of AAC and 5% tailing at 28°C for 30 days. The analysis of the liquid medium indicated that the strains solubilized about 1% of arsenic from the tailing. A leaching test was performed in 500 mL and it showed that the strain E1 and AB5 leached 16.61% and 13.45% of arsenic from the tailing, respectively. The formation of organic acids from different substrates in these two strains was evaluated, but only AB5 acidified the liquid medium from lactose. E1 and AB5 strains could be an alternative treatment of minerals, but studies need to be continued.

**Keywords:** Actinomycetes, bacterial leaching, ferrous-iron oxidation, thiosulfate oxidation, arsenopyrite, enargite, mining, Peru

## I. INTRODUCCIÓN

La minería es una actividad primordial para el crecimiento económico, de tal magnitud que ubica al Perú entre los primeros países a nivel mundial como productores de plata, cobre, zinc, estaño, plomo y oro (MEM, 2013). Esta actividad impulsa el desarrollo alrededor del área donde se ubica la operación, por ejemplo, generando empleo, brindando servicios básicos y promoviendo la urbanización. El desarrollo de la industria minera aumenta anualmente, y para el 2012 tan solo el 1.1% del territorio nacional fue destinado a la exploración y explotación minera (Benavides, R., 2012) por lo que aún existe amplio territorio para ser aprovechado. Los yacimientos mineros se ubican principalmente en zonas altoandinas, siendo de gran importancia debido a que representan una ventaja competitiva frente a otros países latinoamericanos por poseer grandes reservas de los tres metales de mayor demanda: hierro, cobre y oro (PwC, 2013). Ésta es liderada por los mercados de Estados Unidos, China, Suiza, Japón, Canadá y la Unión Europea (Benavides, R., 2012).

La explotación, procesamiento y almacenaje de recursos naturales no renovables, como lo son los elementos metálicos presentes en los minerales producen emisiones de gases o filtraciones de drenajes que ocasionan grave impacto al medio ambiente, liberando metales pesados o sustancias xenobióticas. Estos procesos son regularizados por normativas ambientales regidos por organismos como el Ministerio de Energía y Minas y el Ministerio del Medio Ambiente (MINAM) para promover la sostenibilidad ambiental en las zonas de extracción y procesamiento de minerales (Benavides, R., 2012). Estas normativas son cada vez más estrictas, siguiendo la tendencia de los estándares internacionales, por lo que el sector minero requiere de procesos innovadores cada vez más eficientes y menos contaminantes para optimizar las operaciones metalúrgicas y reducir el impacto ambiental.

La naturaleza de los minerales auríferos de valor económico presentes en los yacimientos peruanos incluye principalmente al oro nativo y los teluros (calaverita, silvanita, krennerita y petzita). Entre los principales minerales están aquellos con contenidos de oro nativo en variedad de tamaños granulares, pepitas, dendríticos y

escamas; normalmente formando aleaciones en mayor o menor proporción con plata, cobre, hierro y metales del grupo del platino; asociados casi invariablemente con cuarzo y con sulfuros. Las asociaciones más comunes con los minerales de sulfuros, en orden de frecuencia, son pirita, arsenopirita, galena, calcopirita, esfalerita, tetraeditra y pirrotita (Pérez, C., 2003). La metalurgia del oro representa un área importante en la minería peruana, por lo que requiere especial atención debido a que este metal se encuentra asociado a minerales refractarios o también denominados minerales problema, por la necesidad de aplicar métodos tradicionales como la cianuración para poder extraer el oro. Sin embargo, al estar atrapado en la matriz de los minerales sulfurados, no puede ser liberado ni por molienda fina ni llega a ser disuelto por el cianuro. El procesamiento de estos minerales requiere primero destruir la matriz sulfurosa por medio de procesos pirometalúrgicos y liberar así el oro. De esta manera se remueve el azufre y arsénico. En la actualidad se buscan alternativas al proceso pirometalúrgico por los problemas de contaminación ambiental que lo acompañan, causados por la emisión de gases tóxicos de arsénico ( $As_2O_3$ ) y dióxido de azufre ( $SO_2$ ) (Corcuera, J., 2009).

En el Perú existen yacimientos con minerales refractarios de cobre como enargita ( $Cu_3AsS_4$ ); y son de importancia para la minería debido a su asociación con metales preciosos como oro y plata (Corcuera, J., 2015). Su naturaleza polimetálica y contenido en arsénico los obliga a requerir métodos como la pirometalurgia para extraer el metal de valor comercial (Surco, M., 2012). Sin embargo, en los últimos años el uso de procesos hidrometalúrgicos como la lixiviación ha obtenido mayor aceptación debido a la mejora de la eficacia con el cual el cobre es obtenido del mineral (Suero, P., 2012).

Los minerales extraídos del suelo pasan por una serie de procesos previos a la obtención de los metales de interés. Estos pueden ser el chancado, trituración, flotación o molienda en caso sea necesario reducir su tamaño. Luego, son clasificados y concentrados, es decir se elimina la ganga o material sin valor económico. El concentrado minero es el producto obtenido de la eliminación de componentes económicamente no rentables y, por ello tiene incrementado el contenido de los elementos valiosos, respecto al mineral inicial. El relave minero es



el mineral de desecho de la planta concentradora después de que los metales valiosos han sido recuperados. Posteriormente, dependiendo de la naturaleza del concentrado puede seguir dos procesos: pirometalurgia o hidrometalurgia. La elección de uno y otro proceso está condicionada también a los costos que representen para la industria; así como también la disponibilidad de fuentes de energía o recursos hídricos cercanos a las fundiciones y refinerías (Gacés, I., 2003).

La pirometalurgia permite la obtención de metales como el cobre basándose en operaciones efectuadas a altas temperaturas. Se aprovechan algunas propiedades y características de los elementos considerados impurezas para eliminarlos en forma gradual y en operaciones sucesivas llamadas fusión, conversión y refinado a fuego (Gacés, I., 2003).

La hidrometalurgia comprende un conjunto de métodos, generalmente aplicados a minerales oxidados, que se llevan a cabo en presencia de una fase acuosa a temperatura ambiente o levemente superior. El método más usado es la lixiviación que se define como un proceso mediante el cual es posible disolver un compuesto metálico soluble contenido en un mineral, pasando el metal al estado de ion, mediante un solvente adecuado o líquido extractor. Este proceso puede realizarse artificialmente mediante el uso de químicos como ácido sulfúrico, o naturalmente por acción de microorganismos mediante la lixiviación bacteriana (Gacés, I., 2003).

La biolixiviación o lixiviación bacteriana es un proceso hidrometalúrgico en el que se ven involucradas diferentes reacciones químicas, metabólicas, enzimáticas y no enzimáticas. El resultado de dicho proceso es liberar metales en solución a partir de mineral insoluble. Este proceso ocurre naturalmente debido a comunidades bacterianas que pueden desarrollarse en las condiciones extremas de los concentrados y relaves derivados de la actividad minera. Las estrategias que usan los microorganismos para movilizar metales a partir de minerales sulfurados son generalmente dos. Pueden realizar reacciones de oxidación-reducción, debido a la formación de hierro férrico a partir de hierro ferroso y la formación de ácido sulfúrico a partir de compuestos de azufre; ó pueden producir ácidos orgánicos. Los procesos de oxidación se evidencian por la oxidación del hierro ferroso a hierro

férrico, un proceso comúnmente asociado a bacterias con capacidad lixivante. Asimismo, la oxidación de una fuente de sulfuro para liberar los iones metálicos del mineral en solución puede ser evaluada mediante la oxidación de tiosulfato de sodio. El principal ácido inorgánico producido en ambientes donde se lleva a cabo la biolixiviación es el ácido sulfúrico. Éste es formado por microorganismos sulfuro-oxidantes. Una serie de ácidos orgánicos son producidos por bacterias y hongos durante su metabolismo resultando en una acidólisis orgánica (Brandl, H., 2008).

El interés por buscar nuevas alternativas para implementar procesos sostenibles y económicos se debe a que las técnicas de extracción de metales usadas en el sector metalúrgico o minero requieren el uso de solventes o compuestos de alto precio y extremadamente tóxicos para el medio ambiente. Por ejemplo, el empleo de cianuro para el tratamiento de minerales de oro y plata representa una amenaza para el ambiente, así como también un alto costo para la industria minera. Por lo tanto, la lixiviación bacteriana empleando microorganismos que conforman las ya conocidas comunidades bacterianas de los concentrados y relaves mineros tienen alto potencial industrial; así como también grandes ventajas como son la reducción de costos de inversión, costos de operación y bajo impacto ambiental (Rivera, R., 2011).

La diversidad de microorganismos que se pueden aislar a partir de los productos intermedios de la actividad minera incluye no solo al reino Bacteria, sino también al Fungi y Archaea (López-Archilla, A., 1993 y COCHILCO, 2009). A pesar que las condiciones de crecimiento son usualmente descritas como extremas debido al bajo nivel de pH y alta concentración de metales, se tienen reportes y estudios de décadas pasadas que confirman la presencia de múltiples microorganismos capaces de tolerar y realizar procesos de lixiviación en estos sustratos (Brandl, H., 2008). Algunas cepas de actinomicetos aisladas de concentrados y relaves mineros han demostrado ser tolerantes a ambientes extremos con pH ácido y presencia de metales pesados (Matsubara, A., 2013). Estas características podrían indicar la potencial capacidad lixivante de los microorganismos aislados de estos nichos, es decir ser capaces de solubilizar metales a partir de minerales por medio de

mecanismos usualmente descritos como la formación de hierro férrico, degradación de sulfuros o formación de ácidos orgánicos.

Los actinomicetos se encuentran ubicados dentro del phylum Actinobacteria, Clase Actinobacteria, subclase Actinobacteridae y orden Actinomicetales; la cual es dividida en subórdenes, familias y géneros (Prescott, 2003; Franco-Correa, M., 2008; Bergey, J., 2000). Estas bacterias se caracterizan por ser Gram positivas, de morfología filamentosa y esporuladas. (Madigan, M., 2009). Su versatilidad metabólica es la que permite que estos microorganismos sean de gran interés biotecnológico, ya que son capaces de sintetizar metabolitos de uso terapéutico, y enzimas con diversos usos en las industrias (Sharma, M., 2014). Producen compuestos como terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares hidrolíticas que degradan la materia orgánica. Por ello desempeñan un rol importante dentro de la descomposición del suelo haciendo posible el catabolismo de moléculas complejas y por ende al reciclamiento de nutrientes en la naturaleza (Ezziyyani, M., 2004). Asimismo, el interés por estos microorganismos radica en su versatilidad metabólica ya que géneros como *Streptomyces* son los mayores productores de antibióticos a nivel industrial (Adesemoye, A., 2009). Existen ciertas características que ayudan a la identificación de estos microorganismos, como el olor característico que se debe a la producción de un metabolito denominado geosmina que muchas veces es descrito en la literatura como “tierra húmeda” (Franco-Correa, M., 2009). También se caracterizan por no ser capaces de producir mucopolisacáridos y por ello las colonias en placas de agar se observan secas y no cremosas (Omar, 1997).

El rango de pH en el cual desarrollan mejor estos microorganismos corresponde a suelos alcalinos o neutros en su mayoría, con valores entre 6,5 y 8. A partir de pH 5 el crecimiento es ausente o severamente reducido. Sin embargo, hay reportes de nuevas especies de actinomicetos que logran crecer en condiciones ácidas, como el pH 2 (Johnson, 2009).

Son organismos mesófilos, que se favorecen por temperaturas entre 25°C y 30°C. Por debajo de 5°C el crecimiento es casi nulo y por encima de 55°C solo algunas especies termofílicas logran desarrollarse (Prescott et al, 2003). Generalmente

desarrollan en suelos aireados, por lo que son considerados aerobios. Pero también ciertas especies son microaerofilicos, por lo que la concentración de oxígeno puede afectar su crecimiento (Koneman, E., 2001).

Los medios de cultivo más usados para el desarrollo de actinomicetos en laboratorio son: Agar Almidón Caseína, Agar Nutritivo, Agar Tripticasa de Soja, Agar Sangre o Agar Infusión Cerebro Corazón. En algunos casos es necesaria la adición de quitina coloidal, extracto de suelo, avena, almidón con sales inorgánicas, agar agua con determinados carbohidratos, extractos de levadura, peptonas o caseína para promover la producción de esporas y/o pigmentos los cuales son útiles para la diferenciación entre especies o con otros microorganismos (Bergey, J., 2000).

En cuanto al tiempo de crecimiento de estos microorganismos se estima que a partir de 4 días es posible apreciar colonias desarrollándose en medio sólido. Pero el micelio aéreo maduro con esporas tarda entre 7 a 14 días, y en algunos casos específicos puede demorar hasta 30 días (Bergey, J., 2000). El crecimiento en medios líquidos se evidencia por la formación de “pellets” o agrupaciones filamentosas de biomasa, dejando el medio líquido transparente. En algunos casos es recomendable la agitación entre 200 o 250 rpm para mejorar la aireación del medio (Franco-Correa, M., 2008).

Los nichos ecológicos de los actinomicetos varían ampliamente. Pueden encontrarse en suelos, agua marina, agua dulce, aire, estiércol, fango de ríos, fondos de los lagos, entre otros (Leiva, 2004). Su distribución es influenciada por tres factores como el pH, temperatura y tipo de suelo. (Franco-Correa, M., 2008) El rol que cumplen dentro del reciclaje de nutrientes involucra al ciclo del carbono y al ciclo del nitrógeno ya que producen distintos metabolitos con capacidades hidrolíticas, lignolíticas y ser capaces de degradar compuestos recalcitrantes presentes en la materia orgánica (Sylvia, D, 2005) Los principales géneros de actinomicetos que son aislados son *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Nocardia* (Martin, 1981).

Actualmente, la lixiviación bacteriana es aplicada en la extracción de cobre, níquel, cobalto, zinc y uranio por el uso de bacterias acidófilas (Siezen, R., 2009). En diversos estudios determinan que dentro de los consorcios de microorganismos aislados de concentrados y relaves mineros se encuentran actinomicetos, representados por géneros como *Pseudonocardia* (Lee, S., 2001), *Saccharothrix*, *Catellatospora* (Lee, S., 2000) y *Kribbella* (Carlsohn, M., 2007). Asimismo, también se reportan nuevas especies como *Ferrimicrobium acidiphilum* y *Ferrithrix thermotolerans* (Johnson, D., 2009) que poseen la capacidad de acelerar la disolución oxidativa de pirita. También existen estudios que reportan actinomicetos con capacidad lixivante que fueron aislados de relaves alcalinos de mina (Schippers, A., 2002, Willscher, S., 2003). También se reporta el sinergismo con otras bacterias como es el caso de *A. ferroxidans* para llevar a cabo procesos de biolixiviación (Bacelar-Nicolau, P., 1999).

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la capacidad lixivante de las 24 cepas de actinomicetos aislados de concentrados y relaves mineros proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar los niveles de crecimiento a pH 2, pH 3.5, pH 5 y pH 7 de las cepas de actinomicetos.
- Evaluar el nivel de crecimiento y capacidad de oxidación de hierro ferroso de las cepas de actinomicetos a pH 2 y pH 7.
- Evaluar el nivel de crecimiento y capacidad de oxidación de tiosulfato de las cepas de actinomicetos a pH 4 y pH 7.
- Evaluar la capacidad lixivante de actinomicetos frente a dos muestras de minerales: Relave aurífero de arsenopirita y enargita de cobre.
- Evaluar la producción de ácidos orgánicos a partir de diferentes fuentes de carbono.

## **III. HIPÓTESIS**

Debido a las condiciones ácidas y naturaleza química de los concentrados y relaves mineros (concentrado de pirita y relave de arsenopirita), de donde fueron aisladas las cepas de actinomicetos, presentarán capacidad lixivante para compuestos encapsulados en minerales sulfurados.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MEDIOS DE CULTIVO

- **Medio Agar Almidón Caseína (AAC) (Mackay, S., 1977; Clesceri L., et al, 1998)**

El medio contiene (g.L<sup>-1</sup>): Almidón (10), Caseína (0.3), Nitrato de Potasio (2), NaCl (2), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2), MgSO<sub>4</sub> (0.05), CaCO<sub>3</sub> (0.02), FeSO<sub>4</sub> (0.01) y Agar (15).

- **Medio Almidón Caseína Líquido 1/10**

El medio líquido contiene (g.L<sup>-1</sup>): Almidón (1), Caseína (0.03), Nitrato de Potasio (0.2), NaCl (0.2), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.2), MgSO<sub>4</sub> (0.005), CaCO<sub>3</sub> (0.002).

- **Caldo Nutritivo (CN) 1/10**

El medio contiene (g.L<sup>-1</sup>): Peptona (0.5), Extracto de carne (0.3), NaCl (0.8).

- **Caldo Tripticasa de Soya (TSB)**

El medio contiene (g.L<sup>-1</sup>): Peptona de Caseína (17), Peptona de Harina de Soya (3), NaCl (5), Hidrógeno fosfato dipotásico (2.5) y D-Glucosa (2.5).

- **Medio Base Carbohidratos**

El medio contiene (g.L<sup>-1</sup>): Carbohidrato (10), Extracto de carne (1), peptona (5) y NaCl (5). La Fructosa, Sucrosa, Maltosa, Galactosa, Rafinosa, Xilosa, Sorbitol se agrega luego de autoclavar el medio base por filtración con micromembrana de 0.2 µm.

- **Caldos: Almidón, Lactosa, Manitol**

El medio contiene (g.L<sup>-1</sup>): Carbohidrato (10), Extracto de carne (1), peptona (5) y NaCl (5).

Los medios de cultivo se autoclavan por 30 minutos a 121°C y 15 psi, luego se adiciona Nistatina 1 mL.L<sup>-1</sup> como antimicótico.

## **4.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS**

Se utilizaron 24 cepas de actinomicetos (previamente identificadas molecularmente) proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Las caracterizaciones morfológicas se muestran en la tabla 6 y 7, ANEXO II. De las 24 cepas utilizadas, 6 han sido descritas previamente (Matsubara, A., 2013).

## **4.3 MUESTRAS DE MINERALES**

Se utilizaron 2 muestras de minerales procedentes de dos sitios mineros ubicados en Perú (relave aurífero de arsenopirita que contiene 61.4 g/Kg de Hierro y 16.90 g/Kg de Arsénico; y mineral enargita de cobre que contiene 152 g/Kg de Hierro y 5.64 g/Kg de Arsénico) proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, UPCH

## **4.4 MÉTODOS (ANEXO I, Flujograma del Proceso)**

### **4.4.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA EN AAC**

Con el objetivo de caracterizar las cepas de actinomicetos en el medio de cultivo que se utilizaría para las pruebas de lixiviación bacteriana, se tomaron como referencia las características de las 24 cepas en un medio de cultivo standard según el Manual de Métodos para Caracterización de Especies de *Streptomyces*, denominado “Agar Almidón-Sales Inorgánicas” (AAI) (Shirling, E., 1966) o medio ISP 4 (Zimbro, M., et al, 2009). Estos datos fueron proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, UPCH (Tabla 6, ANEXO II). El mismo procedimiento fue aplicado a todas las cepas en AAC, que es descrito como el medio de cultivo de uso general para el crecimiento de cepas de actinomicetos (Mackay, S., 1977; Balakrishna, G., et al, 2012).

Las cepas de actinomicetos se sembraron en medio AAC a 28°C por 15 días. Se observaron las características macroscópicas de cada una de las cepas crecidas en un estereoscopio. Se tuvo en cuenta el aspecto de la colonia, forma del borde, color de micelio aéreo (superficie), micelio del sustrato (anverso) y producción de pigmentos difusibles en los medios (Shirling, E., 1966; Bergey, et al., 2000).







#### 4.4.2 CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE pH

Las cepas se sembraron en tubos de ensayo con 5 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a pH 7 y se incubaron a 28°C por 15 días. Se realizaron coloraciones Gram (Según el procedimiento del ANEXO III) para asegurar la pureza de las cepas. Luego, se sembraron en tubos con medio Almidón Caseína Líquido en dilución 1/10 con 4 diferentes niveles de pH (2, 3.5, 5 y 7). El pH se modificó agregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. El control de esta prueba fueron tubos con medio Almidón Caseína Líquido (sin dilución) a pH 7. Los tubos se incubaron por 15 días a 28°C y se evaluó el nivel de crecimiento de las cepas mediante la escala:

- 0 (Sin crecimiento): No hubo presencia de biomasa en el medio líquido.
- 1 (Escaso crecimiento): Se observaron agrupaciones filamentosas de biomasa en baja cantidad, sin presencia de crecimiento en superficie.
- 2 (Regular crecimiento): Colonias en suspensión y precipitadas. Forman agrupaciones filamentosas de menos de 3 mm.
- 3 (Excelente crecimiento): Crecimiento semejante al control en medio Almidón Caseína Líquido. Alta producción de biomasa, tanto en superficie como colonias en suspensión. Agrupaciones de más de 5 mm.

**Tabla 1** – Escala de los niveles de crecimiento: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

| Nivel de crecimiento | 0   | 1   | 2  | 3   |
|----------------------|---|---|--|---|
|                      |  |  |  |  |

#### **4.4.3 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE HIERRO FERROSO**

Cada cepa de actinomiceto fue sembrada en tubos con 5 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a pH 7 y se incubaron a 28°C por 15 días. Se realizaron coloraciones Gram para asegurar la pureza de las cepas. Luego, se sembraron en tubos con medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a pH 2 y pH 7 con 10 ppm de hierro ferroso (0.05 g/L de sulfato ferroso). Al medio de cultivo autoclavado se le adicionó el sulfato ferroso por medio de filtración con micromembranas de 0.4 µm. Los tubos se incubaron por 30 días a 28°C. Se evaluó la presencia de hierro férrico precipitado (coloración naranja) en el fondo de los tubos, así como también el nivel de crecimiento de los actinomicetos en presencia de hierro.

#### **4.4.4 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE TIOSULFATO**

Cada cepa de actinomiceto se aisló en tubos con 5 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a pH 7 y se incubaron a 28°C por 15 días. Se realizaron coloraciones Gram para asegurar la pureza de las cepas. Luego, se sembraron en tubos con 10 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 y Caldo Nutritivo (CN) 1/10, cada medio con concentración de tiosulfato de 1 g/L con indicador naranja de metilo (ANEXO IV). Ambos medios a pH 4 y pH 7. El tiosulfato de sodio se agregó luego de autoclavar el medio de cultivo por filtración con micromembranas de 0.4 µm. El control positivo de esta prueba se obtuvo al agregar 5 gotas de ácido sulfúrico 1 N en un tubo con medio de cultivo y naranja de metilo sin inóculo, en el cual sí se observó el viraje de color de amarillo a rosado. Todos los tubos se incubaron por 30 días a 28°C. Se evaluó el nivel de crecimiento de los actinomicetos en cada medio de cultivo y se comparó con los controles para comprobar si existió viraje de color del indicador naranja de metilo, el cual se torna de amarillo a rosado por debajo de pH 3.1, debido a que la oxidación de tiosulfato a sulfato es una reacción que genera acidez.

#### **4.4.5 LIXIVIACIÓN BACTERIANA**

##### **a. PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

Las cepas fueron sembradas en tubos Falcon con 5 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a pH 7 por 15 días a 28°C. Se realizaron coloraciones Gram para asegurar la pureza de las cepas. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 30 minutos. El pellet fue usado para inocular los tubos conteniendo medio de cultivo con muestra de mineral para la prueba inicial.

##### **b. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO CON MINERAL**

La prueba inicial se basó en evaluar el crecimiento de los actinomicetos frente a las dos muestras de mineral. Se prepararon tubos Falcon conteniendo 30 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a pH 2 y pH 7. Asimismo, se separaron los tubos en 2 grupos y se adicionaron 1.5 g de cada muestra de mineral. Para el medio de cultivo con relave aurífero de arsenopirita se agregó 0.5 mL de NaOH al 50 % para obtener un pH final de 2 y 3.5 mL de NaOH al 50% para obtener un pH final de 7. En el caso de la enargita de cobre se agregó 5.1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N para obtener un pH final de 2 y 0.1 mL para obtener un pH final de 7. Por último, los pellets obtenidos de la centrifugación de los tubos con las cepas de actinomicetos se adicionaron a los tubos Falcon con muestras de mineral. Estos se incubaron a 28°C por 30 días y se evaluó el nivel de crecimiento de los actinomicetos en ambos grupos de mineral. Las cepas que crecieron en los tubos Falcon fueron aisladas en placas de Agar Almidón Caseína (AAC) 1/10 para ser usadas posteriormente.

##### **c. PRUEBA DE ADAPTACIÓN**

A partir de los resultados de la prueba inicial con las 24 cepas se realizó la prueba de adaptación. Se prepararon frascos con 100 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a pH 2 y 7 y se agregó 5 g de relave aurífero de arsenopirita para un grupo de cepas y en otro grupo mineral enargita de cobre. Se modificó el pH (dependiendo del mineral) con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y NaOH al 50%. Se anotó el pH inicial en cada frasco. Para esta prueba, el mineral fue autoclavado junto con el medio de cultivo para descartar cualquier alteración que podría generar alguna bacteria

presente en la muestra de mineral. Los frascos se inocularon con cada cepa de la prueba anterior y se incubaron a 28°C por 30 días. También realizó un frasco control sin inóculo. Posterior al tiempo de incubación se midió el pH final, y los frascos fueron filtrados. Se analizó la concentración de arsénico en la muestra líquida. Las cepas usadas en esta prueba fueron aisladas en placas de AAC 1/10 para ser usadas en una prueba de lixiviación.

#### **d. PRUEBA DE LIXIVIACIÓN**

Se realizó esta prueba para evaluar la capacidad lixivante de las cepas de actinomicetos (seleccionadas en el procedimiento anterior), es decir solubilizar arsénico que forma parte del mineral de arsenopirita. La prueba se realizó en frascos con 500 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 y 25 g de relave aurífero de arsenopirita a pH 7 únicamente. Se modificó el pH con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y NaOH al 50% y se anotó el pH inicial de cada frasco. El medio de cultivo y el mineral fueron autoclavados. Posteriormente se separó un frasco solo con medio de cultivo y mineral como control, y los demás se inocularon con cada cepa. Se incubaron a 28 °C por 30 días. Luego de este tiempo se les midió el pH a los frascos y fueron filtrados para analizar las concentraciones de arsénico en las muestras líquidas y evaluar si se llevó a cabo el proceso de biolixiviación. Las cepas usadas en esta prueba fueron aisladas en placas de AAC 1/10 para ser usadas en la prueba de producción de ácidos orgánicos.

#### **4.4.6 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS**

Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar la producción de ácidos orgánicos como una estrategia para degradar los minerales sulfurados. Las cepas de actinomicetos usadas en la prueba de lixiviación fueron sembradas 10 medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono. Los medios líquidos consistían de Almidón, Fructosa, Lactosa, Sucrosa, Maltosa, Galactosa, Rafinosa, Xilosa, Sorbitol y Manitol. Se incubaron a 28°C por 15 días y se midió el pH de cada medio de cultivo líquido.

#### **4.4.7 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS**

Las cepas fueron sembradas en tubos Falcon conteniendo 5 mL de caldo Tripticasa de Soya caldo (TSB), los cuales se incubaron a 28°C por 15 días. Posteriormente, se realizaron coloraciones Gram para asegurar la pureza de las cepas. Los tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1.5 mL de Tripticasa de Soya caldo (TSB). Los pellet resuspendidos se adicionaron a viales que contienen 1.2 mL de Tripticasa de Soya caldo (TSB) y 0.3 mL de glicerol. (Concentración final de glicerol en el vial: 10%). Se obtuvieron 3 viales por cada cepa (triplicado) que fueron conservadas a -20°C.

## V. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA EN AAC

La mayoría de las cepas mostraron aspecto pulverulento, solo las cepas Fe5 y 11-1 fueron costrosas. El color del micelio aéreo y de sustrato varió de acuerdo a cada cepa. El borde fue entero en la mayoría de los casos, excepto para la cepa Frep13, F, 6C, 6D y E1 que mostraron borde entero con círculos concéntricos; y solo la cepa 21 mostró borde irregular. Las descripciones morfológicas se muestran en la tabla 7, ANEXO II.



#### **Cepa Frep13**

Micelio aéreo: Blanco/Crema

Micelio de sustrato: Crema

Pigmento: -

Borde: Entero con círculos concéntricos

Aspecto: Pulverulenta



#### **Cepa Fe5**

Micelio aéreo: Blanco

Micelio de sustrato: Crema

Pigmento: -

Borde: Entero

Aspecto: Costrosa



#### **Cepa E1**

Micelio aéreo: Crema/Blanco

Micelio de sustrato: Crema

Pigmento: Rojo

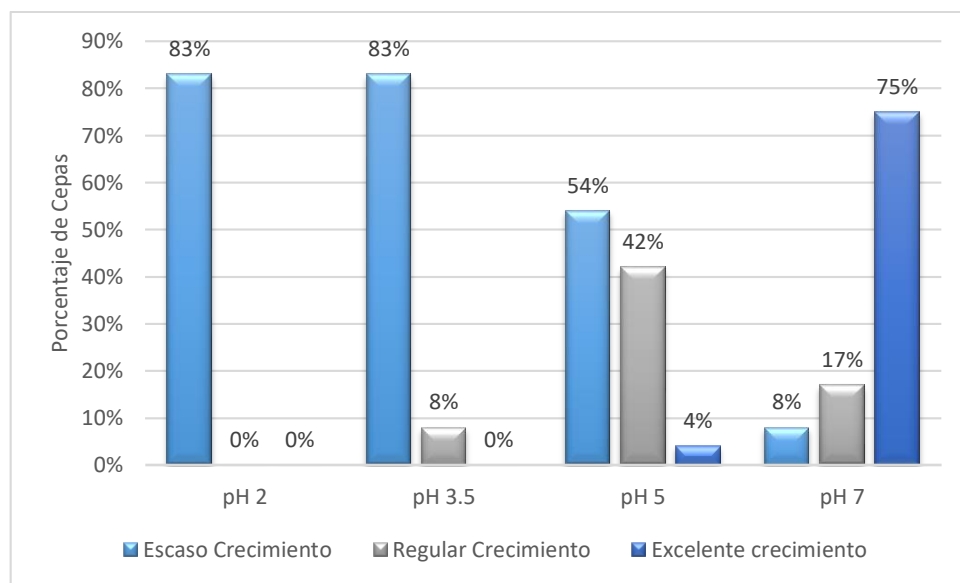
Borde: Entero

Aspecto: Pulverulenta

**Figura 1** – Morfología a nivel macroscópica de tres cepas a los 15 días en medio AAC observadas al estereoscopio con aumento de 2X.

## 5.2 CRECIMIENTO A DIFERENTES NIVELES DE pH

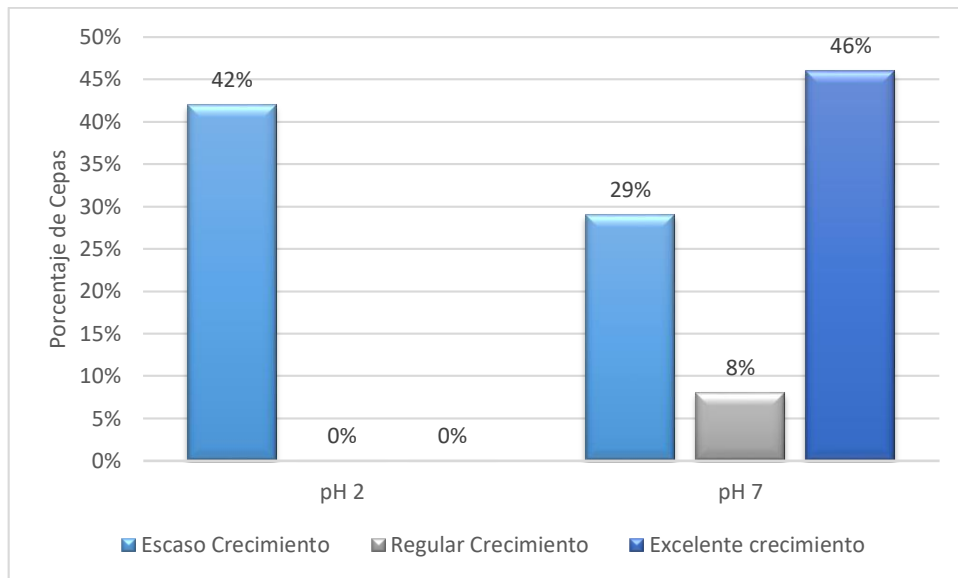
A pH 2 y a pH 3.5 se observó que el 83% de las cepas mostraron escaso crecimiento. A pH 5 solo 54% de las cepas mantuvieron este mismo nivel de crecimiento, mientras que solo el 4% mostró excelente crecimiento. Todas las cepas de actinomicetos fueron capaces de crecer a pH 7 a los 15 días, donde el 75% de las cepas mostró un excelente crecimiento (Cepas ya4, K4, X, C2, y16, Frep14, AB5, F1, Frep15, K1A, K1B, F, 6B, AB7, 6C, 6D, 6E1, E1). Los resultados se muestran en la Figura 2 (Ver Tabla 8, ANEXO I).



**Figura 2** – Porcentaje de cepas que crecieron en diferentes niveles de pH en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a los 15 días.

## 5.3 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE HIERRO FERROSO

Las cepas de actinomicetos mostraron no ser capaces de oxidar hierro ferroso ya que a los 30 días no formaron precipitados de hierro insoluble o viraje del medio a color amarillo o naranja. A pH 2 solo 42% de las cepas fueron capaces de mostrar escaso crecimiento (Cepas ya4, X, y16, Frep14, 6E3, K1A, K1B, 6C, 6E1). A pH 3.5 se obtuvo la misma cantidad de cepas con escaso crecimiento, y solo 8% obtuvo un buen desarrollo. Por otro lado, a pH 7 se observó que solo el 46% crecía abundantemente en presencia del metal en el medio (Cepas ya4, C2, K2, y16, F1, 6E3, K1A, K1B, AB7, 6C, 6D) (Ver Tabla 9, ANEXO II).

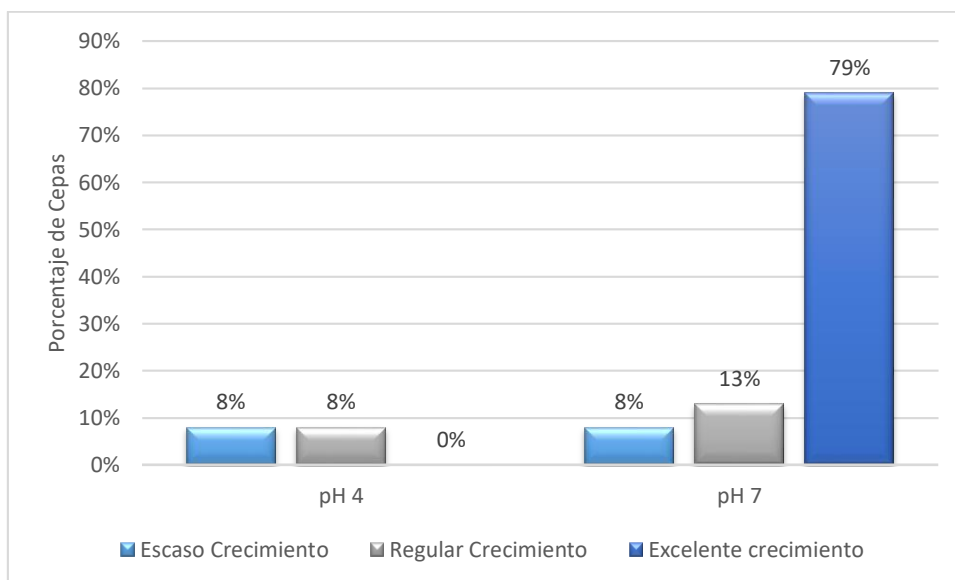


**Figura 3** – Porcentaje de cepas que crecieron en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 con 100 ppm de hierro ferroso a los 30 días.

#### 5.4 CRECIMIENTO Y OXIDACIÓN DE TIOSULFATO

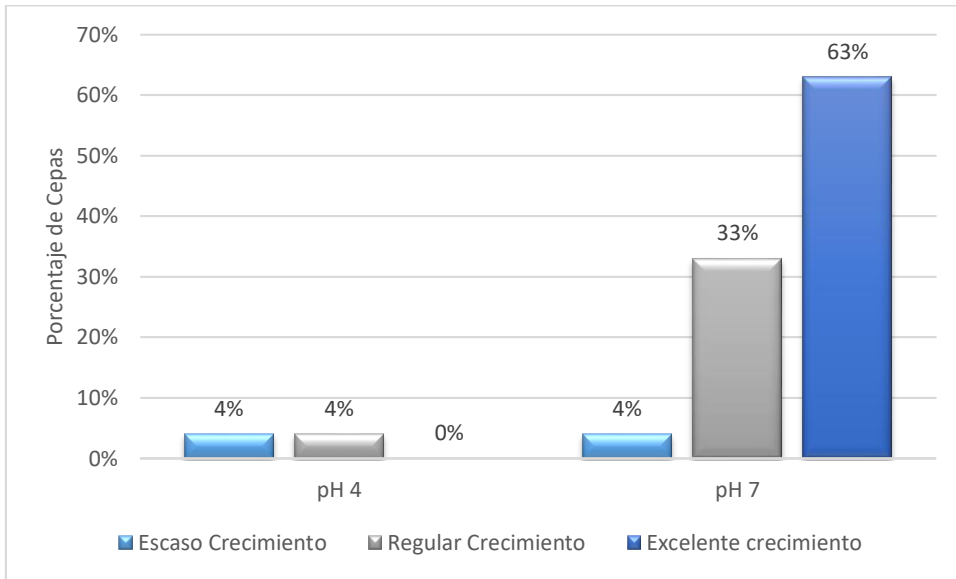
Con el medio Almidón Caseína Líquido 1/10 se observó que las cepas no se desarrollaron favorablemente a pH 4, ya que solo el 8% mostró crecimiento tanto regular (Cepas 6C, E1) como escaso (Cepas ya4, F). Ninguna cepa mostró crecimiento abundante. En cambio a pH 7 se obtuvo excelente crecimiento por parte del 79% de las cepas (Cepas ya4, K4, X, 21, C2, K2, y16, Frep14, AB5, F1, Frep13, 6E3, K1A, K1B, F, 6C, 6D, 6E1, E1), 13% creció regularmente (Cepas Frep15, 11-1, 6B) y 8% mostró escaso crecimiento (Cepas Fe5, AB7). Estos datos se muestran en la Figura 4. No se observó viraje del color del medio de cultivo con naranja de metilo, lo cual indica que no ocurrió oxidación de tiosulfato (Ver Tabla 10, ANEXO II).





**Figura 4** – Porcentaje de cepas que crecieron en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 con 1 g/L de tiosulfato a los 30 días.

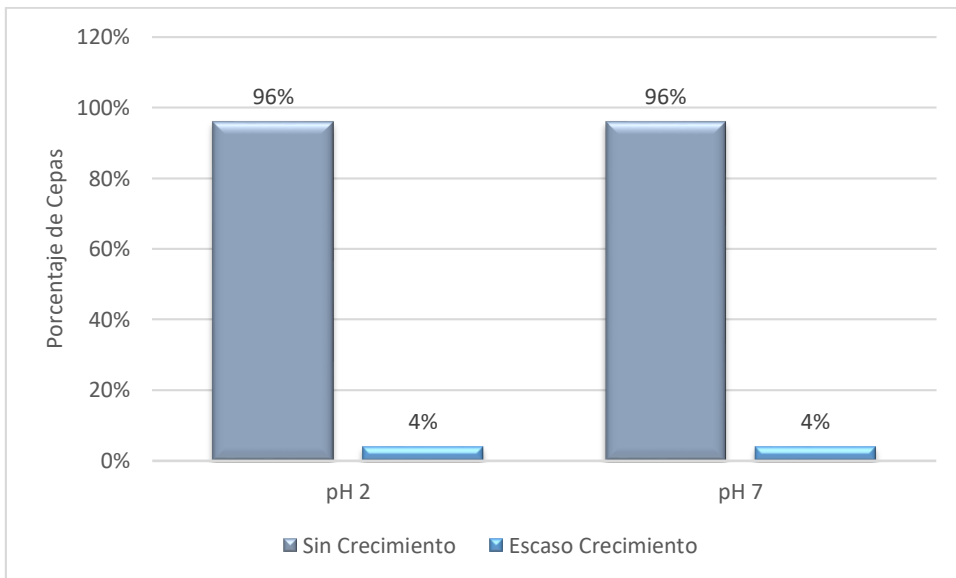
Por otra parte, con el Caldo Nutritivo 1/10 también se obtuvo bajo crecimiento a pH 4 con tan solo el 4% de las cepas desarrollándose tanto regular (Cepa AB5) como escaso (Cepa E1). Pero a pH 7 se obtuvo un crecimiento excelente del 63% (Cepas ya4, K4, X, 21, K2, y16, AB5, F1, Frep13, 6E3, K1A, 6B, 6D, 6E1, E1), 33% se desarrolló regularmente (Cepas C2, Frep14, Frep15, K1B, F, Fe5, AB7, 6C) y 4% mostró escaso crecimiento (Cepa 11-1). En esta prueba no se observó viraje del color del medio de cultivo con indicador, por lo que la oxidación fue negativa para las 24 cepas (Ver Tabla 10, ANEXO II).



**Figura 5** – Porcentaje de cepas que crecieron en Caldo Nutritivo 1/10 con 1 g/L de tiosulfato a los 30 días.

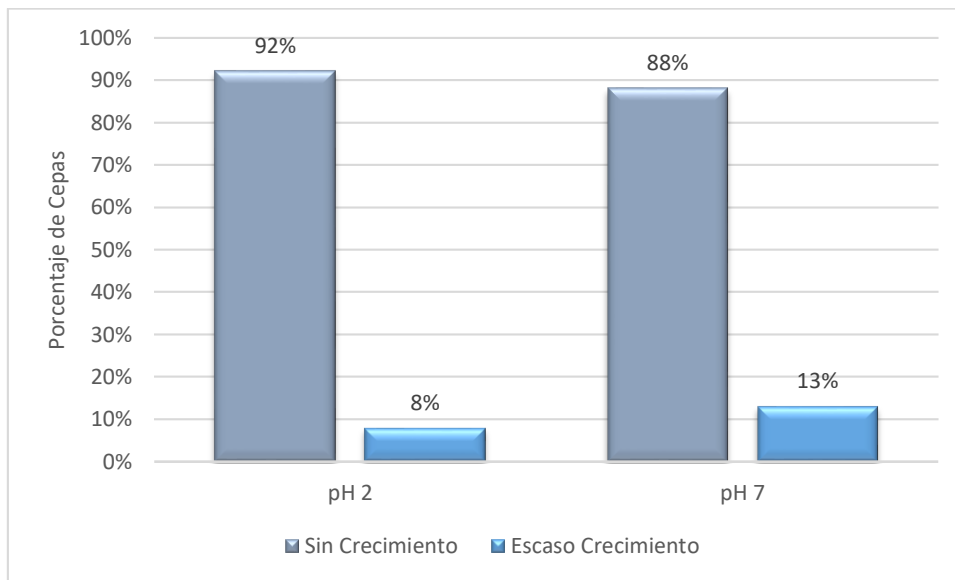
### 5.5 LIXIVIACIÓN BACTERIANA

La prueba de crecimiento con las 24 cepas de actinomicetos mostró bajo crecimiento con enargita de cobre, ya que 96% de las cepas no fueron capaces de crecer en ambos niveles de pH. Solo la cepa y16 fue capaz crecer ligeramente a pH 2 y la cepa C2 a pH 7. Los resultados se muestran en la Tabla 12, ANEXO II.



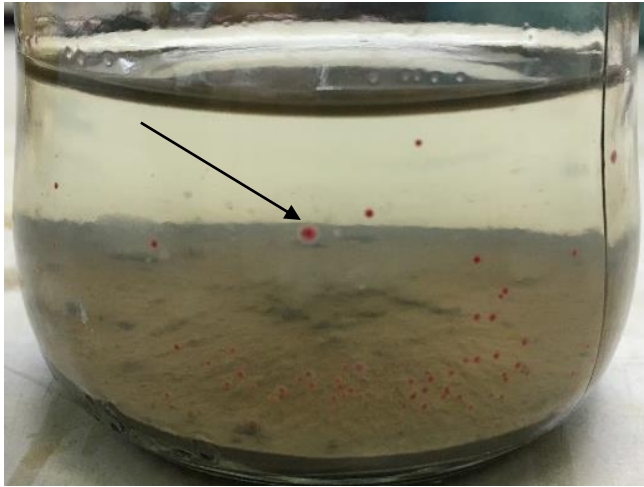
**Figura 6** - Porcentaje de cepas que crecieron en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 con 1.5 g de mineral enargita de cobre a los 30 días.

De igual manera, el relave aurífero de arsenopirita mostró ser poco favorable para el crecimiento de los actinomicetos debido a que el 92% de las cepas mostró crecimiento nulo a pH 2, y el 88% a pH 7. Solo el 13% de las cepas mostró escaso crecimiento a pH 7 (Cepas AB5, 21 y E1), y 8% (Cepas 21 y K1B) crecieron a pH 2 (Ver Tabla 12, ANEXO II).

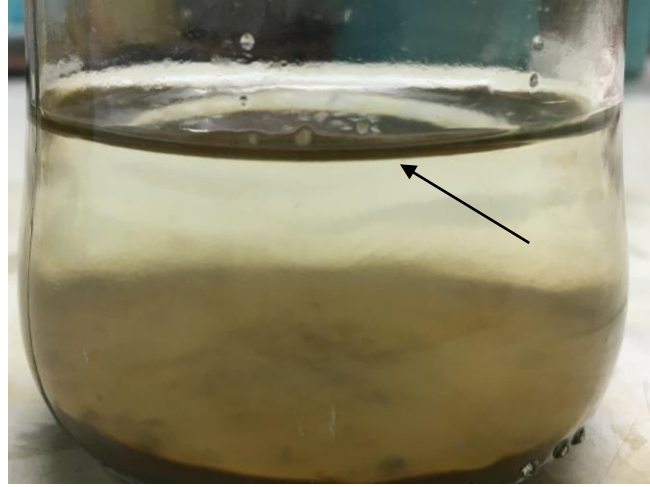


**Figura 7** - Porcentaje de cepas que crecieron en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 con 1.5 g de relave aurífero de arsenopirita a los 30 días.

En cuanto a la prueba de adaptación, se emplearon las cepas 21, K1B, E1, C2, AB5 y y16 las cuales fueron las únicas capaces de desarrollarse en las muestras de mineral sin autoclavar de la prueba inicial. Se obtuvo que a 30 días las cepas a pH 2 de ambas muestras de mineral no fueron capaces de crecer. Sin embargo, la cepa E1 a pH 7 mostró regular crecimiento así como también colonias pigmentadas color rojo (Figura 8). La cepa AB5 creció en menor magnitud y en forma de pequeñas colonias de 2 mm de diámetro (Figura 9). Asimismo, la cepa 21 también mostró ligero crecimiento.



**Figura 8** – Regular crecimiento de la cepa E1 a los 30 días en 100 mL de medio Almidón Caseína con 5g de relave aurífero de arsenopirita a pH 7.



**Figura 9** – Escaso crecimiento de la cepa AB5 a los 30 días en 100 mL de medio Almidón Caseína con 5g de relave aurífero de arsenopirita a pH 7.

Los niveles de pH inicial y final de los frascos se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 2** – Niveles de pH iniciales y finales de los frascos con 100 mL de AAC 1/10 pH 7 con 5 g de relave aurífero de arsenopirita.

| Muestra | pH Inicial | pH Final |
|---------|------------|----------|
| Control | 7.03       | 7.04     |
| 21      | 7.05       | 7.12     |
| E1      | 7.01       | 7.11     |
| AB5     | 7.07       | 7.09     |

A pesar que la cepa 21 mostró crecimiento en el mineral aurífero de arsenopirita, el aislamiento en placa de Agar Almidón Caseína (AAC) 1/10 determinó que la cepa no estaba pura; por lo que fue descartada.

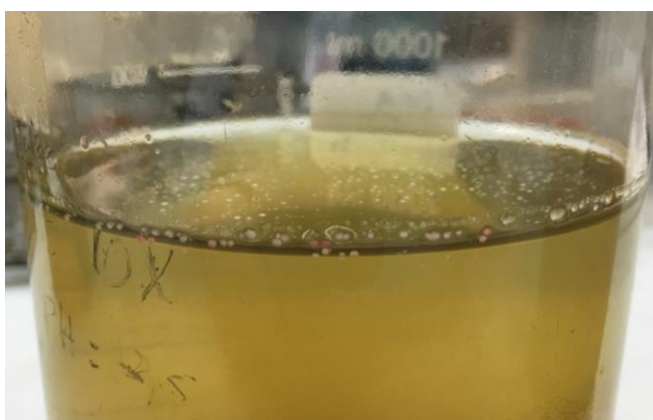
El análisis a la muestra de relave aurífero de arsenopirita indicó que contenía 16.90 g/kg de arsénico. Debido a que los frascos contenían 5 g de muestra de mineral, se calculó que cada uno contenía 84.5 mg de arsénico proveniente del relave siendo

este dato el 100% de arsénico en las muestras. Luego se calculó el porcentaje de extracción tomando en cuenta el volumen de muestra líquida filtrada (mL) de cada frasco. El análisis de la concentración de arsénico (mg/L) presente en las muestras líquidas se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3** – Resultados del análisis a las muestras líquidas de la prueba de adaptación con relave aurífero de arsenopirita y cálculo del porcentaje de extracción.

| Muestra | Arsénico (mg/L) | Volumen filtrado (mL) | Arsénico disuelto (mg) | Porcentaje de extracción bruto (%) | Porcentaje de extracción neto (%) |
|---------|-----------------|-----------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Control | 2.63            | 76                    | 0.199                  | 0.236                              | 0                                 |
| 21      | 12.52           | 81                    | 1.014                  | 1.2                                | 0.963                             |
| E1      | 7.58            | 87                    | 0.659                  | 0.78                               | 0.543                             |
| AB5     | 5.73            | 84                    | 0.481                  | 0.569                              | 0.333                             |

La prueba de lixiviación se realizó con las cepas E1 y AB5. Entre estas, la E1 mostró abundante crecimiento con abundantes colonias pigmentadas color rojo, mientras que la AB5 se desarrolló débilmente presentando pocas colonias adheridas al frasco (Figura 10 y 11).



**Figura 10** – Abundante crecimiento de la cepa E1 a los 30 días en 500 mL de medio Almidón Caseína con 25g de relave aurífero de arsenopirita a pH 7.



**Figura 11** – Escaso crecimiento de la cepa AB5 a los 30 días en 500 mL de medio Almidón Caseína con 25g de relave aurífero de arsenopirita a pH 7. (Flechas indican 2 colonias visibles)

Los niveles de pH inicial y final de los frascos se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 4** – Niveles de pH iniciales y finales de los frascos con 500 mL de AAC 1/10 pH 7 con 25 g de relave aurífero de arsenopirita.

| <b>Muestra</b> | <b>pH Inicial</b> | <b>pH Final</b> |
|----------------|-------------------|-----------------|
| <b>Control</b> | 7.03              | 7.11            |
| <b>E1</b>      | 7.05              | 7.10            |
| <b>AB5</b>     | 7.01              | 7.08            |

Se analizaron las muestras líquidas obtenidas del filtrado de los frascos y se analizaron las concentraciones de arsénico. Asimismo, en esta prueba la concentración de arsénico inicial era mayor debido a que se usó 25 g de mineral. Por lo tanto, cada muestra inició con 422.5 mg de arsénico por frasco. Se calculó el porcentaje de extracción tomando en cuenta el volumen de muestra líquida filtrada (mL) de cada frasco.

**Tabla 5** - Resultados del análisis a las muestras líquidas de la prueba de lixiviación con relave aurífero de arsenopirita y cálculo del porcentaje de extracción.

| <b>Muestra</b> | <b>Arsénico (mg/L)</b> | <b>Volumen filtrado (mL)</b> | <b>Arsénico disuelto (mg)</b> | <b>Porcentaje de extracción bruto (%)</b> | <b>Porcentaje de extracción neto (%)</b> |
|----------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------|---|--|
| <b>Control</b> | 22.93                  | 463                          | 10.617                        | 2.513                                     | 0  |
| <b>E1</b>      | 166.98                 | 484                          | 80.818                        | 19.129                                    | 16.616                                   |
| <b>AB5</b>     | 145.39                 | 464                          | 67.461                        | 15.967                                    | 13.454                                   |

## 5.6 PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

En esta prueba se usaron las cepas E1 y AB5 provenientes de la prueba de lixiviación. Ambas cepas se desarrollaron excelente en los 10 medios de cultivo. La cepa AB5 en Lactosa mostró ligera disminución del pH con un nivel de 6, pero en las demás muestras no se observaron cambios en el pH respecto al control que se

mantuvo en 7 a los 15 días (Ver tabla 15, ANEXO II). Sin embargo, se evidenció que los carbohidratos como fructosa, galactosa y lactosa promovieron la producción del pigmento rojo característico de la cepa E1.

### **5.7 CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS**

Se realizó la conservación de las cepas E1 y AB5 empleadas la prueba de lixiviación para ser usadas en futuros estudios. Las cepas se mantienen a -20°C en viales con glicerol (10%) y medio TSB.

## VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los microorganismos acidófilos se encuentran en una variedad de nichos ecológicos, entre ellos están presentes los concentrados y relaves mineros. En estos ambientes se desarrollan variedades de bacterias que representan una opción viable para el desarrollo de nuevas biotecnologías mediante el aprovechamiento de sus capacidades metabólicas. Dentro de estos consorcios bacterianos se encuentran los actinomicetos del phylum Actinobacteria, el cual incluye a microorganismos con capacidades como de oxidar hierro ferroso y tiosulfato en condiciones ácidas en géneros como *Acidimicrobium* (Clark, D. et al, 1996; Cleaver, A., et al, 2007); *Acidithiomicrobium* (Davis-Belmar, C., et al., 2009) y *Aciditerrimonas* (Itoh, T., et al, 2011) o también con capacidad lixivante como *Microbacterium*, *Pseudonocardia* y *Nocardioopsis* (Willscher, S. & Bosecker, K., 2003); por lo que en este estudio se evaluaron las capacidades de crecimiento, oxidación y lixiviación en condiciones de crecimiento similares. El estudio realizado por Matsubara, A., 2013 reporta 6 cepas (C2, E1, F, Frep13, Fe5 y K2) de las 24 proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, UPCH; mientras que 18 cepas fueron nuevas. Este estudio aporta ciertas características de las cepas, como la oxidación positiva de hierro ferroso, que indicarían la potencial aplicabilidad de estos microorganismos para procesos de lixiviación bacteriana.

El medio AAI o ISP 4 es usado para caracterizar cepas de *Streptomyces* ya que permite una excelente esporulación (Shirling, E., 1966; Zimbro, M., et al, 2009). Este fue el medio de referencia debido a que 23 de las cepas evaluadas fueron reportadas dentro de este género. Solo la cepa Fe5 fue reportada como *Actinomadura*. La caracterización morfológica realizada en medio AAC permitió observar la variabilidad metabólica de las cepas, ya que las características como el micelio aéreo y micelio de sustrato difieren dependiendo del medio de cultivo. Esto se debe a que la composición del medio de cultivo influye sobre el color del micelio, como en el caso de la producción de un pigmento en el micelio de sustrato que altera el color del micelio de aéreo (Wendisch & Kutzner, 1986). La pigmentación de las colonias indica que las cepas están aprovechando los nutrientes disponibles



en el medio, lo que les permite realizar su metabolismo indistintamente de la fuente de carbono.

Las 24 cepas aisladas de concentrados y relaves mineros demostraron ser sensibles al pH ácido, ya que a pH 2 solo 83% de las cepas mostraron escaso crecimiento y el 17% restante no creció. Sin embargo, a medida que el pH se incrementaba se observó que el nivel de crecimiento aumentaba. Esto se evidenciaba por la mayor cantidad de biomasa. El pH 7 mostró ser el pH óptimo para estas cepas. A partir de los resultados, se comprueba que las 24 cepas de actinomicetos evaluadas son acidotolerantes. El trabajo de Matsubara, A., 2013 también reporta la misma tendencia, donde solo 3 de las 12 cepas de actinomicetos crecieron a pH 2 y todas las cepas crecieron a pH 7. En un estudio previo se reportan actinomicetos aislados de suelos ácidos, pero entre un rango de 4.5 a 7.5 teniendo como óptimo valor el pH 6 (Seong, 1993). Asimismo Hagedorn, 1976, Xu et al, 2006 y Cho et al, 2008 aislaron actinomicetos acidófilos. Se sabe que todo microorganismo tiene un rango de pH óptimo de crecimiento, por lo que se confirma que la mayoría de los actinomicetos estudiados son capaces de tolerar amplios rangos de pH a comparación de otros géneros de bacterias. Existen ciertos mecanismos que ayudan a las bacterias a sobrellevar el estrés generado por la acidez del medio, como la producción de moléculas derivadas de la expresión de genes inducidos por el pH ácido, que ayudan a modificar el pH externo o interno de la célula, o a transportar protones para lograr la homeostasis (Slonczewski, J. L., 2000). Esencialmente, para que un microorganismo pueda tolerar ambientes ácidos es necesario mantener el pH intracelular cercano a un valor neutro debido a que los constituyentes del citoplasma, como organelas o proteínas, son lábiles a la acidez (Wiley, J., et al, 1999). En el estudio realizado por Norris, P., 2011 se reportan actinomicetos aislados de ambientes geotermales con un nivel de pH óptimo de 2.5.

La capacidad de las cepas de actinomicetos para oxidar hierro ferroso no fue observable a pH 2 como a pH 7. Asimismo, las cepas mostraron sensibilidad a la presencia del metal en el medio líquido debido a que solo el 42% de cepas fue capaz de crecer a pH 2, a comparación del crecimiento obtenido en la prueba anterior en ausencia del metal. El 83% de los actinomicetos mostraron crecimiento a pH 7 mas

no oxidación, lo cual indica que las cepas no son quimiolitótrofos, es decir no obtienen energía a partir de la oxidación de hierro ferroso y por ende son heterótrofos obligatorios. Esto significa que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (Madigan, M., 2009). Teniendo en cuenta que el hierro es un elemento esencial para el crecimiento de microorganismos, la concentración de 10 ppm a pH 2 fue inhibitoria para el 58%, y a pH 7 fue inhibitoria solo para el 17% de las cepas evaluadas en este estudio. Sin embargo, en el estudio de Matsubara, A., 2013 se obtuvo crecimiento y oxidación a pH 7 por parte de las cepas C2, E1, F, Frep13, Fe5 y K2. Esto pudo deberse a que el medio de cultivo líquido que emplearon fue Glicerol-Extracto de Levadura, el cual contiene mayor cantidad de materia orgánica a diferencia del medio Almidón Caseína Líquido empleado en este estudio, que fue diluido (1/10). El propósito de usar este medio de cultivo líquido fue evitar cualquier tipo de interferencia con el metal, en este caso el hierro ferroso. El extracto de levadura es una fuente de proteínas, vitaminas y aminoácidos libres como lisina, triptófano y treonina. Asimismo, está descrito un agente quelante de hierro, por lo que puede haber favorecido el crecimiento, y por ende la oxidación del hierro; mientras que las cepas en Almidón Caseína Líquido mostraron mayor sensibilidad al metal y oxidación negativa (De la Hoz, L., et al, 2014). Bajo las condiciones de trabajo no fue posible evidenciar la oxidación de hierro ferroso a hierro férrico debido principalmente al bajo nivel de crecimiento a ambos niveles de pH. Además, la concentración de hierro (10 ppm) fue menor que la empleada en el estudio de Matsubara, A., 2013 (200 ppm). Para futuras pruebas se recomendaría el uso de un agente quelante de hierro férrico para determinar su presencia en el medio y eliminar el efecto del pH en su solubilización. Uno de los quelantes más usados es el EDTA, que forma un complejo insoluble con el hierro férrico y se observa como precipitado (Flora, S., 2010). Los actinomicetos presentan mecanismos que les permite tolerar la presencia de iones metálicos por medio de la producción de sideróforos, frecuentemente descritas en la literatura como agentes quelantes de hierro. Estos compuestos secuestran el metal y lo hacen menos biodisponible para otros seres vivos (Jurkevitch, E., et al, 1992). Las cepas que crecieron en presencia de hierro ferroso en el medio líquido podrían estar usando este mecanismo para reducir la toxicidad del metal. Aún es necesario

realizar más estudios en este aspecto. Sin embargo, la inhibición y bajo crecimiento de las cepas a pH 2 podría también deberse la acción de aniones, que en ambientes ácidos se protonan volviéndose permeables a través de las membranas de las células y migran hacia el interior de éstas, que se encuentran en un pH cercano a neutro conteniendo biomoléculas que son alteradas funcional y estructuralmente. (Ingledew, W. J., 1982). En trabajos como los de Johnson, D. (2009) se reportan especies de actinomicetos capaces de oxidar hierro y al mismo tiempo tolerar ambientes ácidos.

En la prueba de oxidación de tiosulfato se esperaba que el indicador ayudara a identificar la oxidación positiva debido a que este proceso produce principalmente sulfato y ácido sulfúrico, el cual disminuiría el pH del medio. No se observó viraje del color del medio de cultivo al cual se le agregó indicador en todas las cepas. El crecimiento fue abundante a pH 7 en su mayoría, tanto en el medio AAC 1/10 como en Caldo Nutritivo 1/10; en cambio a pH 4 el crecimiento se vio severamente afectado en los dos medios de cultivo. La prueba de oxidación de tiosulfato fue realizada para evaluar la capacidad de los actinomicetos para descomponer una fuente de azufre, como los presentes en las muestras de minerales sulfurados que se encuentran asociados a iones metálicos de gran valor comercial (Suzuki, I., 2001). Estos resultados coinciden con los de Matsubara, A., 2013 donde de la misma manera determinaron que las cepas de actinomicetos no descomponen los compuestos sulfurados, como el tiosulfato de sodio, por lo que es necesario continuar investigando el mecanismo que emplean estas bacterias para degradar los minerales. Según el estudio de Bosecker, K., 1997 existen mecanismos directos, como la oxidación de minerales sulfurados por adherencia directa de las bacterias al mineral, así como también mecanismos indirectos por los cuales es posible que los microorganismos realicen procesos de biolixiviación. Entre estos se mencionan a la capacidad de acidificar el medio ( $< \text{pH } 5$ ), por medio de ácidos orgánicos, para favorecer el crecimiento de bacterias acidófilas (*T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*) que catalizan la oxidación de hierro ferroso a hierro férrico, el cual es un agente oxidante que libera los metales asociados a minerales sulfurados en solución ácida. Por otra parte, para futuras pruebas sería recomendable medir la

presencia de sulfato mediante el uso de cloruro de bario, lo que permitiría observar precipitados de sulfato de bario (American Chemical Society, 2008). Esto ayudaría a identificar la oxidación positiva de una fuente de azufre por parte de las cepas de actinomicetos.

Los resultados de las pruebas de oxidación de hierro ferroso y tiosulfato indican que los actinomicetos son sensibles a ciertos compuestos que usualmente se encuentran en concentrados y relaves mineros. Sin embargo, se procedió a realizar una evaluación del crecimiento en dos tipos de muestras de mineral, una de mineral enargita de cobre y otra de relave aurífero de arsenopirita. Se observó que el mineral enargita de cobre fue altamente inhibitorio para el crecimiento del 96% de las cepas tanto a pH 2 como a pH 7, mientras que el relave aurífero de arsenopirita inhibió solo el 88% de las cepas. Por ello se realizó la prueba de adaptación con las cepas que sí lograron crecer bajo las condiciones de los minerales (21, K1B, E1, C2, AB5 y y16). Las cepas fueron nuevamente sembradas en el mismo medio de cultivo (Agar Almidón Líquido 1/10) con la muestra de mineral y pH correspondiente: cepas 21 y K1B a pH 2 en relave aurífero de arsenopirita; cepa y16 a pH 2 en mineral enargita de cobre; cepas 21, AB5 y E1 a pH 7 en mineral aurífero de arsenopirita y cepa C2 a pH 7 en mineral enargita de cobre. Esta prueba indicó que solo las cepas E1, AB5 y 21 eran capaces de crecer en presencia de la muestra de relave aurífero de arsenopirita a pH 7. El porcentaje de extracción neto (Tabla 3) señala que la capacidad lixivante de las cepas fue poco efectiva con menos del 1% de arsénico solubilizado en el medio, siendo la cepa E1 y AB5 capaces de lixiviar 0.543% y 0.333% respectivamente. El frasco con la cepa 21 indicó que se realizó lixiviación del 0.963% de arsénico. Sin embargo, al intentar aislar esta cepa en placa de agar sólido AAC se evidenció la presencia de otras bacterias (bacilos Gram -) provenientes del mineral, por lo tanto, no fue posible atribuirle la capacidad lixivante a esta cepa.

Las cepas E1 y AB5 fueron usadas para una prueba de lixiviación con mayor volumen de medio de cultivo, pero manteniendo el 5% de relave. En esta prueba de lixiviación se observó que la cepa E1 creció abundantemente presentando colonias pigmentadas color rojo, mientras que la cepa AB5 no creció en la misma

magnitud y tan solo presentó pocas colonias. En cuanto al porcentaje de extracción neto, se obtuvo que la cepa E1 lixivió 16.61% y la cepa AB5 13.45% de arsénico de la muestra de relave de arsenopirita a los 30 días. Esto indica que ambas cepas de actinomicetos fueron capaces de lixiviar el arsénico con mayor efectividad que en la prueba de adaptación anterior, siendo la E1 la que mostró mejor capacidad lixivante. A pesar de la naturaleza metaloide del arsénico, este también es considerado uno de los metales pesados de mayor riesgo para la salud. Otros metales también mencionados son el cadmio, plomo y mercurio. Sería recomendable evaluar el rango de adaptación de estas cepas a estos metales para determinar su capacidad como biorremediadores. El riesgo de exposición al arsénico radica en su potencial toxicidad sistémica ya que induce al daño de órganos, incluso a bajas concentraciones. También es clasificado como un carcinógeno humano, por lo que su aislamiento es de importancia de salud pública (Tchounwou, P., et al, 2012). El arsénico conforma una de las principales impurezas de la arsenopirita, complicando la extracción del oro y causando penalidades comerciales debido a que le resta valor económico al mineral aurífero (Corcuera, J., 2015).

En cuanto a la producción de ácidos orgánicos, se determinó que solo la cepa AB5 fue capaz de disminuir el pH del medio conteniendo lactosa como fuente de carbono. Los niveles de pH para la cepa E1 aumentaron a 8 en nueve de los medios líquidos, excepto en almidón que se mantuvo en pH 7. Este último resultado se observó en los niveles de pH inicial y final de los frascos de la prueba de adaptación y lixiviación (Tabla 2 y 4). En ningún medio de cultivo se obtuvo una disminución del pH por debajo de 6, lo que indicaría que estas cepas no producen ácidos orgánicos. El crecimiento de las cepas en diferentes fuentes de carbono corrobora los resultados reportados en estudios previos en lo que se menciona que los actinomicetos no son específicos para un solo sustrato; sino que gracias a su versatilidad metabólica pueden obtener energía a partir de diferentes componentes. El mayor impacto se da en el grado de esporulación mas no en el nivel de crecimiento (Kalakoutskii, L., et al., 1976). La pigmentación observada en la cepa E1 en diferentes fuentes de carbono es evidencia de la versatilidad metabólica

conocida de los actinomicetos, que les permite aprovechar los recursos disponibles en el medio para producir metabolitos secundarios (Sharma, M., 2014).

## **VII. CONCLUSIONES**

1. La mayoría de las cepas de actinomicetos (83%) demostraron ser acidotolerantes, pero el pH 7 demostró ser el más favorable para su crecimiento.
2. Solo 42% de las cepas crecieron a pH 2 con 10 ppm de hierro ferroso, y el 83% de cepas de actinomicetos trabajadas crecieron a pH 7 pero en ningún caso oxidaron el metal.
3. Menos del 10% de las cepas crecieron a pH 4 con 1 g/L de tiosulfato de sodio. Todas las cepas de actinomicetos crecieron a pH 7 con 1 g/L de tiosulfato de sodio, pero no se llevó a cabo la oxidación.
4. La cepa E1 demostró ser capaz de lixiviar 16.61% de arsénico del relave aurífero de arsenopirita a los 30 días, demostrando la mejor capacidad lixiviante.
5. La cepa AB5 demostró ser capaz de lixiviar 13.45% de arsénico del relave aurífero de arsenopirita a los 30 días.
6. La cepa AB5 fue capaz de acidificar el medio a partir de lactosa como fuente de carbono.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

1. Continuar con las pruebas de lixiviación para poder demostrar su aplicabilidad en el campo.
2. Medir la formación de hierro férrico mediante el uso de un quelante como el EDTA.
3. Emplear cloruro de bario para evaluar la presencia de sulfato en el medio líquido.
4. Realizar la prueba de adaptación y lixiviación con la cepa 21.
5. Evaluar el crecimiento y capacidad lixiviante de las cepas de actinomicetos en condiciones alcalinas.
6. Estudiar los mecanismos de resistencia a metales por parte de los actinomicetos.

7. Estudiar los mecanismos que usan estas cepas de actinomicetos para degradar los minerales sulfurados.
8. Evaluar la interacción de las cepas de actinomicetos con otras bacterias acidófilas o biolixiviadoras en cultivos mixtos, para determinar el sinergismo de los microorganismos en procesos de lixiviación bacteriana.
9. Evaluar el rango de adaptación de estas cepas a metales como cadmio, plomo y mercurio para determinar su capacidad como biorremediadores.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adesemoye AO, Kloepper JW. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 85(1): 1-12.
2. American Chemical Society. Reagent Chemicals. In: Reagents, Buffers, and Indicators 10 ed. Washington DC y New York: American Chemical Society, Oxford University Press; 2008. p. 95-106.
3. Bacelar-Nicolau P, Johnson DB. Leaching of pyrite by acidophilic heterogenic iron-oxidizing bacteria in pure and mixed cultures. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65 (2): 585-590.
4. Balakrishna G, Shiva A, Kumar P. Isolation of Phosphate Solubilizing Actinomycetes from Forest Soils of Mahabubnagar District. *IOSR J Pharm.* 2012; 2(2): 271-275.
5. Ben N, Larbi M, Arias JM, González MT. Comparative heavy metal biosorption study of Brewery yeast and *Myxococcus xanthus* biomass. *Chemosphere.* 1997; 35 (10): 2277-2283.
6. Benavides R. La Minería Responsable y sus Aportes al Desarrollo del Perú. Compañía de Minas Buenaventura. 2012
7. Bergey DH, Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000.
8. Bosecker K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiol Rev.* 1997; 20: 591-604.
9. Brandl H. Biotechnology Set – Chapter 8: Microbial Leaching of Metals. 2 ed. HJ Rehm and G Reed; 2008.
10. Carlsohn MR, Groth I, Spröer C, Schütze B, Saluz HP, Munder T, et al. *Kribbella aluminosa* sp. nov., isolated from a medieval alum slate mine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57 (9): 1943-1947.
11. Cho SH, Han JH, Ko HY, Kim SB. *Streptacidiphilus anmyonensis* sp. Nov., *Streptacidiphilus rugosus* sp. Nov. and *Streptacidiphilus melanogenes* sp. Nov., acidophilic actinobacteria isolated from *Pinus* soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58(7): 1566-1570.



12. Clark DA, Norris PR. *Acidimicrobium ferroxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology*. 1996; 142: 785-790.
13. Cleaver A, Burton NP, Norris PR. A novel *Acidimicrobium* Species in Continuous Cultures of Moderately Thermophilic, Mineral-Sulfide-Oxidizing Acidophiles. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73 (13): 4294-4299.
14. Clesceri LS, Greenberg AE, Eaton AD. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20 ed. United Book Press; 1998. p. 1865-1867
15. Cochilco. *Bioliixiviación: Desarrollo Actual y sus expectativas*. Comisión Chilena del Cobre, Dirección de Estudios y Políticas Públicas. 2009
16. Corcuera J. *Aplicación de la lixiviación a presión a minerales arsenopirítricos que contienen oro para estabilizar el arsénico*. Informe técnico. Lima (LI): Instituto de Ingenieros de Minas (PE), PERUMIN 32 Convención Minera; 2009.
17. Davis-Belmar C, Norris PR. Ferrus iron and pyrite oxidation by *Acidithiomicrobium* species. *Adv Mat Res*. 2009; 71: 271-274.
18. De la Hoz L, Ponezi AN, Milani RF, Nunes da Silva VS, De Souza AS, Bertoldo-Pacheco MT. Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. *Food Chem*. 2014; 142: 166-169.
19. Ezziyyani M, Pérez C, Requena M, Rubio L, Castillo M. Biocontrol por *Streptomyces rochei*, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anal Biol*. 2004; 26: 69-78.
20. Flora SJS, Pachauri V. Chelation in Metal Intoxication. *Int J Environ Res Public Health*. 2010; 7: 2745–2788.
21. Franco M. *Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas [tesis doctoral]*. Granada (AND): Granada Univ.; 2008.
22. Franco M. *Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización*. *Rev Peru Biol*. 2009; 16 (2): 239-242.
23. Gacés I. *Proyecto Cobre, Capitulo 2 - Metalurgia del Cobre*. Universidad de Antofagasta. 2003.
24. Hagedorn C. Influences of Soil Acidity on *Streptomyces* Populations Inhabiting Forest Soils. *Appl Environ Microbiol*. 1976; 32 (3): 368-375.

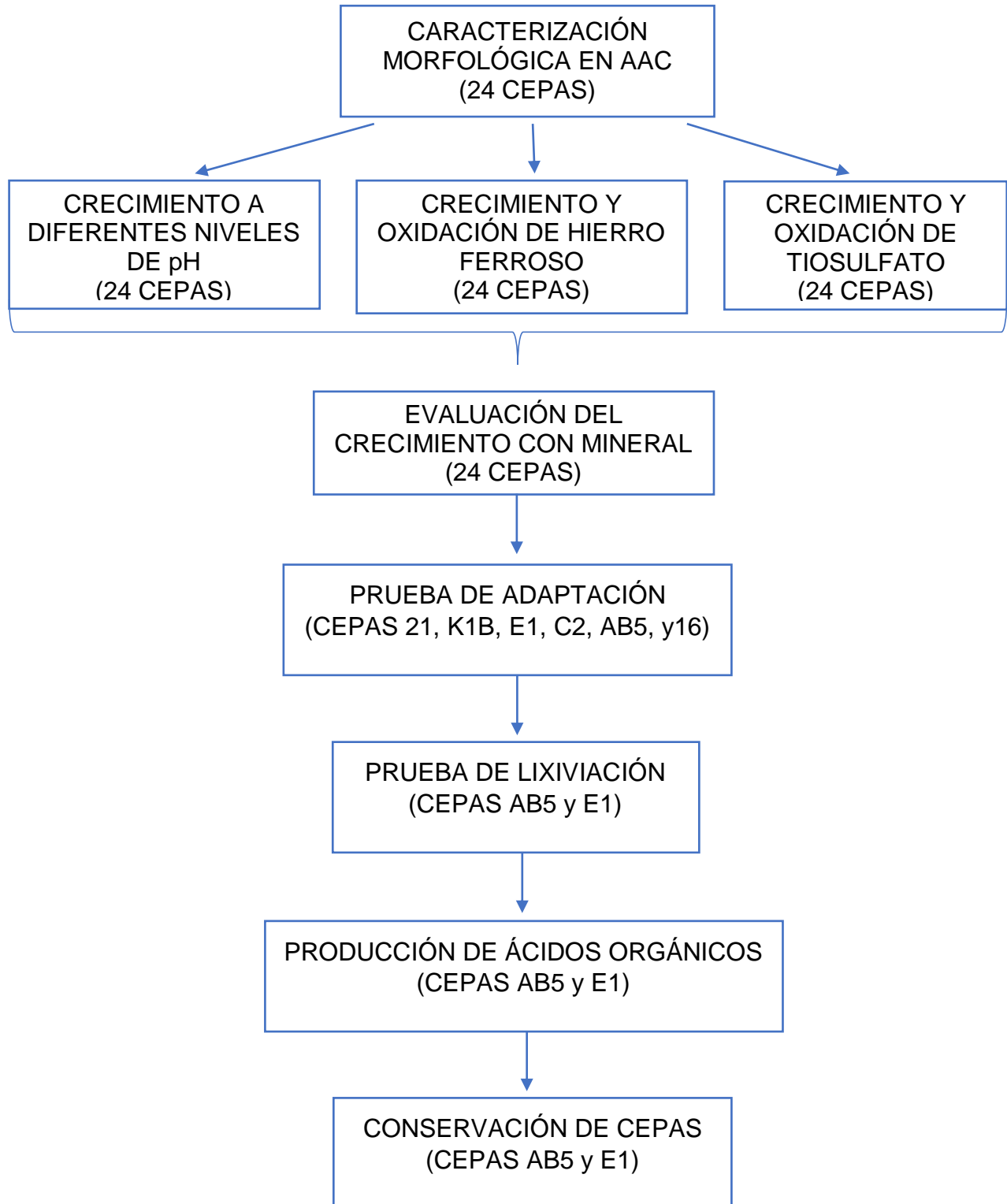
25. Ingledew WJ. *Thiobacillus ferroxidans* the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim Biophys Acta*. 1982; 89-117
26. Itoh T. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011.
27. Johnson B, Bacelar-Nicolau P, Okibe N, Thomas A, Hallberg KB. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59 (5):1082-1089.
28. Jurkevitch E, Hadar Y, Chen Y. Differential Siderophore Utilization and Iron Uptake by Soil and Rhizosphere Bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1992; 58 (1): 119-124.
29. Kalakoutskii LV, Agre NS. Comparative Aspects of Development and Differentiation in Actinomycetes. *Bacteriol Rev*. 1976; 40(2): 469–524.
30. Koneman EW. *Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a Color*. 5 ed. Washington (DC): Panamericana; 2001.
31. Kontro M, Lignell U, Hyvarinen A, Vahteristo M, Hirvonen M, Nevalainen A. Nutrient effects on ten *Streptomyces* sp. sporulation. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007; 1: 137-142.
32. Lee SD, Kang SO, Hah YC. *Catellatospora koreensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a gold-mine cave. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 50 (3): 1103-1111.
33. Lee SD, Kim ES, Min KL, Lee WY, Kang SO, Hah YC. *Pseudonocardia kongjuensis* sp. nov., isolated from a gold mine cave. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001; 51(4): 1505-10.
34. Leiva S, Yáñez M, Zaror L, Rodríguez H, García-Quintana H. Actividad Antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev méd Chile*. 2004; 132 (2): 151-159.
35. López-Archilla AI, Marín I, Amilis R. Bioleaching and interrelated acidophilic microorganisms from Rio Tinto, Spain. *Geomicrobiology J*. 1993; 17: 603-607.

36. Mackay SJ. Improved Enumeration of *Streptomyces* spp. on a Starch Casein Salt Medium. *Appl Environ Microbiol.* 1977; 33(2): 227-230.
37. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock, *Biología de los Microorganismos.* 12 ed. Pearson Addison Wesley; 2009. p. 507-511.
38. Martin A, Peña JJ. *Introducción a la Microbiología de suelos.* México: AGT; 1981.
39. Matsubara A, Hurtado J. Isolation and characterization of actinomycetes from acidic cultures of ores and concentrates. *Adv Mat Res.* 2013; 825: 406-409.
40. Ministerio de Energía y Minas (MEM). *La importancia de la Minería en el Perú.* Lima. 2013.
41. Norris PR, Davis-Belmar CS, Brown CF, Calvo-Baldo LA. Autotrophic, sulfur-oxidizing actinobacteria in acidic environments. *Extremophiles.* 2011; 15(2): 155-163.
42. Pérez, C. *Beneficio Económico de Minerales Auríferos.* Instituto Geológico Minero y Metalúrgico. 2003
43. Prescott LM. *Microbiology.* 5 ed. New York: McGraw-Hill; 2003.
44. PwC. *Industria Minera. Guía de Negocios en el Perú.* 2013
45. Rivera RE, Camejo PY, Moya FJ, López-Méndez JL, Munguía-Bravo. Estudio De Biolixiviación De Un Mineral De Sulfuros De Cobre De Baja Ley Con Bacterias Tio- Y Ferro-Oxidantes En Condiciones Termófilas. *Rev Fac Ing Univ.* 2011; 26: 65-73.
46. Schippers A, Bosecker K, Willscher S, Spröer C, Schumann P, Kroppenstedt RM. *Nocardiopsis mettalicus* sp. nov., a metal-leaching actinomycete isolated from an alkaline slag dump. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52 (6): 2291-2295.
47. Sharma M. Actinomycetes: Source, Identification, and their Applications. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014; 3(2): 801-832.
48. Shi Nam S, Goodfellow M, Ward AC, Chil Hah Y. Numerical Classification of Acidophilic Actinomycetes Isolated from Acid Soil in Korea. *Kor Jour Microbiol.* 1993; 31: 355-363.
49. Shirling E, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol.* 1966; 16(3): 313-340.

50. Siezen R, Wilson G. Genomics Update: Bioleaching genomics. *Microb Biotechnol.* 2009; 2(3): 297-303.
51. Slonczewski, J. L. *Encyclopedia of Microbiology - pH stress.* Academic Press, vol. 3, 2nd edition. 2000: 625–632.
52. Suero P. Optimización técnica y económica de la obtención del cemento de cobre a nivel de planta piloto. Informe final. Callao (LI): Universidad Nacional del Callao (PE), Facultad de Ingeniería Química, Instituto de Investigación; 2012.
53. Surco M. Optimización del proceso de aglomeración y lixiviación en una planta de lixiviación de cobre [tesis de licenciatura]. Rímac (LI). Ingeniería Univ.; 2012.
54. Suzuki I. Microbial leaching of metal from sulfide minerals. *Biotechnol Adv.* 2001; 19 (2): 119-132.
55. Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA. *Principles and Applications of Soil Microbiology.* 2 ed. Upper Saddle River (NJ): Pearson Prentice Hall; 2005.
56. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metals Toxicity and the Environment. *EXS.* 2012; 101: 133-164.
57. Watanabe K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 2001; 12(3): 237-241.
58. Wendish F, Kutzner J. The family Streptomycetaceae. In Star PM, Stolp H, Truper GH, Balows A, Schlegel GH, editors. *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.* 2 ed. New York: Springer Science+Business Media; 1986. p. 921-995.
59. Wiley J, Sons L. *Bacterial Responses to pH.* West Sussex (ENG): Novartis Foundation; 1999.
60. Willscher S, Bosecker K. Studies on the leaching behavior of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump. *Hidrometallurgy.* 2003; 71(1-2): 257-264.
61. Xu C, Wang L, Cui Q, Huang Y, Liu Z, Zheng G, et al. Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* specie isolated from acidic soils in China: *Streptomyces rubidus* sp. Nov. and *Streptomyces paucisporeus* sp. Nov., *Streptomyces rubidus* sp. Nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006; 56(5): 1109-1115.

62. Zimbro MJ, Power DA, Miller SM, Wilson GE, Johnson JA, editores. Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media. 2 ed. Maryland: Becton, Dickinson and Company; 2009.

**ANEXO I**  
**FLUJOGRAMA DEL PROCESO**



**ANEXO II**  
**TABLAS DE RESULTADOS**

**Tabla 6 – Características morfológicas a nivel macroscópico de las 24 cepas de actinomicetos en medio Agar Almidón Sales Inorgánicas (AAI o ISP4) a los 14 días.**

| <b>CEPAS</b>  | <b>Géneros</b>          | <b>Micelio Aéreo</b> | <b>Micelio del Sustrato</b> | <b>Pigmento</b> | <b>Borde</b>                    | <b>Aspecto</b> |
|---------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|
| <b>ya4</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco/Verde         | Crema/ Verde                | -               | Entero                          | Pulverulenta   |
| <b>K4</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>X</b>      | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco         | Crema                       | Verde           | Entero                          | Pulverulenta   |
| <b>21</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo Claro          | Verde                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>C2</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema                       | Verde           | Entero con anillos concéntricos | Pulverulenta   |
| <b>K2</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>y16</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco         | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>Frep14</b> | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>AB5</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Verde                       | -               | Entero                          | Pulverulenta   |
| <b>F1</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco         | Crema                       | Verde           | Ondulado                        | Pulverulenta   |
| <b>Frep13</b> | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco/ Verde        | Marrón                      | Verde           | Entero con anillos concéntricos | Pulverulenta   |
| <b>6E3</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>Frep15</b> | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco/ Plomo        | Crema                       | Verde           | Entero                          | Pulverulenta   |
| <b>K1A</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco         | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>K1B</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>F</b>      | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Plomo                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>Fe5</b>    | <i>Actinomadura sp.</i> | Blanco               | Blanco                      | -               | Entero                          | Pulverulenta   |
| <b>11-1</b>   | <i>Streptomyces sp.</i> | Verde                | Amarillo                    | -               | Entero                          | Costrosa       |
| <b>6B</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Verde                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>AB7</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema/ Verde                | -               | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>6C</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/ Marrón        | Caramelo                    | Marrón          | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>6D</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/ Blanco        | Crema                       | Verde           | Irregular                       | Pulverulenta   |
| <b>6E1</b>    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema                       | Verde           | Entero con anillos concéntricos | Pulverulenta   |
| <b>E1</b>     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo                | Crema/Plomo                 | -               | Entero                          | Pulverulenta   |

\*- : No hay producción



**Tabla 7 – Características morfológicas a nivel macroscópico de las 24 cepas de actinomicetos en medio Agar Almidón Caseína (AAC) a los 14 días.**

| CEPAS  | Géneros                 | Micelio Aéreo | Micelio del Sustrato | Pigmento | Borde                            | Aspecto      |
|--------|-------------------------|---------------|----------------------|----------|----------------------------------|--------------|
| ya4    | <i>Streptomyces sp.</i> | Crema/Verde   | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| K4     | <i>Streptomyces sp.</i> | Crema/Verde   | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| X      | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| 21     | <i>Streptomyces sp.</i> | Crema         | Crema                | -        | Irregular                        | Pulverulenta |
| C2     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| K2     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| y16    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Verde                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| Frep14 | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco        | Blanco               | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| AB5    | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco/Crema  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| F1     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Blanco               | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| Frep13 | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco/Crema  | Crema                | -        | Entero con círculos concéntricos | Pulverulenta |
| 6E3    | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco/Plomo  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| Frep15 | <i>Streptomyces sp.</i> | Crema         | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| K1A    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| K1B    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| F      | <i>Streptomyces sp.</i> | Crema         | Crema                | -        | Entero con círculos concéntricos | Pulverulenta |
| Fe5    | <i>Actinomadura sp.</i> | Blanco        | Crema                | -        | Entero                           | Costrosa     |
| 11-1   | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco        | Crema                | -        | Entero                           | Costrosa     |
| 6B     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| AB7    | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| 6C     | <i>Streptomyces sp.</i> | Crema         | Crema                | -        | Entero con círculos concéntricos | Pulverulenta |
| 6D     | <i>Streptomyces sp.</i> | Plomo/Blanco  | Crema                | -        | Entero con círculos concéntricos | Pulverulenta |
| 6E1    | <i>Streptomyces sp.</i> | Blanco/Crema  | Crema                | -        | Entero                           | Pulverulenta |
| E1     | <i>Streptomyces sp.</i> | Crema/Blanco  | Crema                | Rojo     | Entero con círculos concéntricos | Pulverulenta |

\*- : No hay producción

**Tabla 8** – Niveles de crecimiento de cepas de actinomicetos en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a diferentes pH a los 15 días.

| <b>CEPAS</b>  | <b>pH 2</b> | <b>pH 3.5</b> | <b>pH 5</b> | <b>pH 7</b> | <b>Control</b> |
|---------------|-------------|---------------|-------------|-------------|----------------|
| <b>ya4</b>    | 0           | 1             | 1           | 3           | 3              |
| <b>K4</b>     | 1           | 1             | 1           | 3           | 3              |
| <b>X</b>      | 1           | 1             | 1           | 3           | 3              |
| <b>21</b>     | 1           | 1             | 1           | 2           | 3              |
| <b>C2</b>     | 1           | 1             | 3           | 3           | 3              |
| <b>K2</b>     | 1           | 1             | 2           | 2           | 3              |
| <b>y16</b>    | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |
| <b>Frep14</b> | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |
| <b>AB5</b>    | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |
| <b>F1</b>     | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |
| <b>Frep13</b> | 1           | 2             | 2           | 2           | 3              |
| <b>6E3</b>    | 1           | 1             | 1           | 2           | 3              |
| <b>Frep15</b> | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |
| <b>K1A</b>    | 1           | 1             | 1           | 3           | 3              |
| <b>K1B</b>    | 0           | 0             | 1           | 3           | 3              |
| <b>F</b>      | 0           | 0             | 1           | 3           | 3              |
| <b>Fe5</b>    | 1           | 1             | 1           | 1           | 3              |
| <b>11-1</b>   | 1           | 2             | 1           | 1           | 3              |
| <b>6B</b>     | 1           | 1             | 1           | 3           | 3              |
| <b>AB7</b>    | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |
| <b>6C</b>     | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |
| <b>6D</b>     | 0           | 1             | 1           | 3           | 3              |
| <b>6E1</b>    | 1           | 1             | 1           | 3           | 3              |
| <b>E1</b>     | 1           | 1             | 2           | 3           | 3              |

Los niveles de crecimiento fueron: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

**Tabla 9** – Resultados de prueba de crecimiento y oxidación de hierro ferroso en medio Almidón Caseína Líquido a los 30 días.

| CEPAS  | pH 2        |           | pH 7        |           |
|--------|-------------|-----------|-------------|-----------|
|        | Crecimiento | Oxidación | Crecimiento | Oxidación |
| ya4    | 1           | -         | 3           | -         |
| K4     | 0           | -         | 0           | -         |
| X      | 1           | -         | 1           | -         |
| 21     | 0           | -         | 1           | -         |
| C2     | 1           | -         | 3           | -         |
| K2     | 0           | -         | 3           | -         |
| y16    | 1           | -         | 3           | -         |
| Frep14 | 1           | -         | 2           | -         |
| AB5    | 0           | -         | 0           | -         |
| F1     | 0           | -         | 3           | -         |
| Frep13 | 0           | -         | 1           | -         |
| 6E3    | 1           | -         | 3           | -         |
| Frep15 | 0           | -         | 1           | -         |
| K1A    | 1           | -         | 3           | -         |
| K1B    | 1           | -         | 3           | -         |
| F      | 0           | -         | 1           | -         |
| Fe5    | 0           | -         | 0           | -         |
| 11-1   | 0           | -         | 2           | -         |
| 6B     | 0           | -         | 0           | -         |
| AB7    | 0           | -         | 3           | -         |
| 6C     | 1           | -         | 3           | -         |
| 6D     | 0           | -         | 3           | -         |
| 6E1    | 1           | -         | 1           | -         |
| E1     | 0           | -         | 1           | -         |

Los niveles de crecimiento fueron: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

La oxidación se consideró: - (Negativa) ó + (Positiva)

**Tabla 10** – Resultados de prueba de crecimiento y oxidación de tiosulfato en medio Almidón Caseína Líquido 1/10 a los 30 días.

| CEPAS  | pH 4        |           | pH 7        |           |
|--------|-------------|-----------|-------------|-----------|
|        | Crecimiento | Oxidación | Crecimiento | Oxidación |
| ya4    | 1           | -         | 3           | -         |
| K4     | 0           | -         | 3           | -         |
| X      | 0           | -         | 3           | -         |
| 21     | 0           | -         | 3           | -         |
| C2     | 0           | -         | 3           | -         |
| K2     | 0           | -         | 3           | -         |
| y16    | 0           | -         | 3           | -         |
| Frep14 | 0           | -         | 3           | -         |
| AB5    | 0           | -         | 3           | -         |
| F1     | 0           | -         | 3           | -         |
| Frep13 | 0           | -         | 3           | -         |
| 6E3    | 0           | -         | 3           | -         |
| Frep15 | 0           | -         | 2           | -         |
| K1A    | 0           | -         | 3           | -         |
| K1B    | 0           | -         | 3           | -         |
| F      | 1           | -         | 3           | -         |
| Fe5    | 0           | -         | 1           | -         |
| 11-1   | 0           | -         | 2           | -         |
| 6B     | 0           | -         | 2           | -         |
| AB7    | 0           | -         | 1           | -         |
| 6C     | 2           | -         | 3           | -         |
| 6D     | 0           | -         | 3           | -         |
| 6E1    | 0           | -         | 3           | -         |
| E1     | 2           | -         | 3           | -         |

Los niveles de crecimiento fueron: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

La oxidación se consideró: - (Negativa) ó + (Positiva)

**Tabla 11** – Resultados de prueba de crecimiento y oxidación de tiosulfato en medio Caldo Nutritivo 1/10 a los 30 días.

| CEPAS  | pH 4        |           | pH 7        |           |
|--------|-------------|-----------|-------------|-----------|
|        | Crecimiento | Oxidación | Crecimiento | Oxidación |
| ya4    | 0           | -         | 3           | -         |
| K4     | 0           | -         | 3           | -         |
| X      | 0           | -         | 3           | -         |
| 21     | 0           | -         | 3           | -         |
| C2     | 0           | -         | 2           | -         |
| K2     | 0           | -         | 3           | -         |
| y16    | 0           | -         | 3           | -         |
| Frep14 | 0           | -         | 2           | -         |
| AB5    | 2           | -         | 3           | -         |
| F1     | 0           | -         | 3           | -         |
| Frep13 | 0           | -         | 3           | -         |
| 6E3    | 0           | -         | 3           | -         |
| Frep15 | 0           | -         | 2           | -         |
| K1A    | 0           | -         | 3           | -         |
| K1B    | 0           | -         | 2           | -         |
| F      | 0           | -         | 2           | -         |
| Fe5    | 0           | -         | 2           | -         |
| 11-1   | 0           | -         | 1           | -         |
| 6B     | 0           | -         | 3           | -         |
| AB7    | 0           | -         | 2           | -         |
| 6C     | 0           | -         | 2           | -         |
| 6D     | 0           | -         | 3           | -         |
| 6E1    | 0           | -         | 3           | -         |
| E1     | 1           | -         | 3           | -         |

Los niveles de crecimiento fueron: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

La oxidación se consideró: - (Negativa) ó + (Positiva)

**Tabla 12** – Resultados de la prueba de crecimiento de las cepas de actinomicetos en 30 mL de medio Almidón Caseína 1/10 con 1.5 g de relave aurífero de arsenopirita o enargita de cobre (sin autoclavar) a los 30 días.

| CEPAS  | Enargita de cobre |      | Relave aurífero de arsenopirita |      |
|--------|-------------------|------|---------------------------------|------|
|        | pH 2              | pH 7 | pH 2                            | pH 7 |
| ya4    | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| K4     | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| X      | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| 21     | 0                 | 0    | 1                               | 1    |
| C2     | 0                 | 1    | 0                               | 0    |
| K2     | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| y16    | 1                 | 0    | 0                               | 0    |
| Frep14 | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| AB5    | 0                 | 0    | 0                               | 1    |
| F1     | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| Frep13 | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| 6E3    | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| Frep15 | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| K1A    | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| K1B    | 0                 | 0    | 1                               | 0    |
| F      | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| Fe5    | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| 11-1   | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| 6B     | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| AB7    | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| 6C     | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| 6D     | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| 6E1    | 0                 | 0    | 0                               | 0    |
| E1     | 0                 | 0    | 0                               | 1    |

Los niveles de crecimiento fueron: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

**Tabla 13** – Niveles de crecimiento de la prueba de adaptación de las cepas de actinomicetos en 100 mL de medio Almidón Caseína 1/10 con 5 g de relave aurífero de arsenopirita (autoclavado) a los 30 días.

| CEPAS      | Enargita de cobre |      | Relave aurífero de arsenopirita |      |
|------------|-------------------|------|---------------------------------|------|
|            | pH 2              | pH 7 | pH 2                            | pH 7 |
| <b>21</b>  | n.r.              | n.r. | 0                               | 1*   |
| <b>K1B</b> | n.r.              | n.r. | 0                               | n.r. |
| <b>E1</b>  | n.r.              | n.r. | n.r.                            | 2*   |
| <b>AB5</b> | n.r.              | n.r. | n.r.                            | 1*   |
| <b>y16</b> | 0                 | n.r. | n.r.                            | n.r. |
| <b>C2</b>  | n.r.              | 0    | n.r.                            | n.r. |

Los niveles de crecimiento fueron: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

n.r.: No realizado

\*Muestra analizada

**Tabla 14** – Niveles de pH de la prueba de lixiviación de las cepas de actinomicetos en 500 mL de medio Almidón Caseína Líquido 1/10 con 25 g de relave aurífero de arsenopirita (autoclavado) a los 30 días.

| CEPAS      | Relave aurífero de arsenopirita |
|------------|---------------------------------|
|            | pH 7                            |
| <b>E1</b>  | 3                               |
| <b>AB5</b> | 1                               |

Los niveles de crecimiento fueron: 0 (Sin crecimiento), 1 (Escaso crecimiento), 2 (Regular crecimiento), 3 (Excelente crecimiento)

**Tabla 15** – Niveles de pH del medio de cultivo de las cepas E1 y AB5 a los 15 días.

| <b>Fuente de Carbono</b> | <b>Control</b> | <b>E1</b> | <b>AB5</b> |
|--------------------------|----------------|-----------|------------|
| <b>Almidón</b>           | 7              | 7         | 7          |
| <b>Fructosa</b>          | 7              | 8         | 7          |
| <b>Lactosa</b>           | 7              | 8         | 6          |
| <b>Sucrosa</b>           | 7              | 8         | 8          |
| <b>Maltosa</b>           | 7              | 8         | 8          |
| <b>Galactosa</b>         | 7              | 8         | 7          |
| <b>Rafinosa</b>          | 7              | 8         | 7          |
| <b>Xilosa</b>            | 7              | 8         | 8          |
| <b>Sorbitol</b>          | 7              | 8         | 8          |
| <b>Manitol</b>           | 7              | 8         | 8          |



### **ANEXO III**

#### **COLORACIÓN GRAM – METODOLOGÍA**

1. Agregar 1 gota de solución salina en una lámina portaobjetos.
2. Extraer una alícuota o una colonia aislada de la cepa de actinomiceto y colocarla en la lámina portaobjetos.
3. Fijar la muestra usando el mechero.
4. Agregar cristal violeta a la muestra fijada por 1 minuto, luego enjuagar con agua para eliminar el 1er colorante.
5. Agregar lugol a la muestra por 1 minuto, luego enjuagar con agua para eliminar el 2do colorante.
6. Decolorar la muestra con alcohol-acetona, luego enjuagar con agua.
7. Agregar safranina por 30 segundos, luego enjuagar con agua.
8. Secar la lámina usando el mechero.
9. Observar al microscopio con el objetivo de 100X.

### **ANEXO IV**

#### **PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO CON NARANJA DE METILO**

1. Preparar un Stock de Naranja de Metilo: 0.1 g de Naranja de Metilo en 100 mL de agua destilada.
2. Diluir 10 mL del Stock de Naranja de Metilo en 90 mL de agua destilada.
3. Agregar a cada medio de cultivo, luego de autoclavar, 10 gotas de la solución stock diluida de Naranja de Metilo por cada 100 mL de medio que contenga Tiosulfato.