



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

“LIXIVIACIÓN DE ARSÉNICO A  
PARTIR DE ARSENOPIRITA MEDIADA  
POR *Streptomyces*”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO  
EN MICROBIOLOGÍA

PAMELA MARUJA OBANDO CHÁVEZ

LIMA – PERÚ

2020



**ASESORA**

**Dra Jasmín Hurtado Custodio**

**DEDICATORIA.**

A mi madre Eva Chávez que me enseñó a terminar lo que empiezo, no importa lo  
duro que pueda ser.

A mis padrinos Máximo Díaz y María Chávez por ser pilares y forjar en mí el  
sentido de responsabilidad.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Dra. Jasmín Hurtado por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio.  
Agradezco al Dr. Bauer, a la Dra. Patricia Sheen, al Dr. Daniel Guerra, al Dr. Edgar Neyra, al MSc Camilo Díaz, a la Dra Luz Carbajal y a la profesora Gilma Fernández, por brindarme apoyo técnico y su tiempo en la realización de la presente tesis.

A Hans Carreño, Ricardo Antiparra, Gabriela Salazar, Jacqueline Paico, Betsabé Román, Keren Espinoza y Erika Valdivia, por ayudarme con las eventualidades que conllevó la finalización de la presente tesis.

A mi familia, Eva, Máximo, María, Ghysel, Logan y Shirley por su apoyo incondicional y por su paciencia. A mis amigos Daniel y Marianella por siempre darme ánimos.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO.**

Tesis autofinanciada

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

|       |   |    |
|-------|---|----|
| I.    | INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| I.1   | Minerología y extracción del oro.....   | 1  |
| I.2   | Biolixiviación de minerales .....   | 3  |
| I.3   | Género <i>Streptomyces</i> .....  | 6  |
| I.4   | Identificación molecular en base a los genes <i>gyrB</i> y <i>16S ARNr</i> .....  | 8  |
| I.5   | Planteamiento del problema .....  | 9  |
| I.6   | Justificación.....  | 11 |
| II.   | HIPÓTESIS.....  | 12 |
| III.  | OBJETIVOS .....   | 13 |
| III.1 | Objetivos Generales .....   | 13 |
| III.2 | Objetivos Específicos.....  | 13 |
| IV.   | METODOLOGÍA .....   | 14 |
| IV.1  | Muestra .....   | 14 |
| IV.2  | Metodología.....  | 14 |
| 2.1   | Diagrama de flujo de la metodología .....   | 14 |
| 2.2   | Caracterización fenotípica.....   | 15 |
| 2.3   | Caracterización bioquímica.....   | 16 |
| 2.4   | Extracción del ADN.....   | 17 |
| 2.5   | Amplificación de los genes <i>16S ARNr</i> y <i>gyrB</i> por PCR .....  | 18 |
| 2.6   | Purificación de productos de PCR .....  | 19 |
| 2.7   | Electroforesis de ADN .....   | 19 |
| 2.8   | Análisis filogenético .....   | 20 |
| 2.9   | Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry .....  | 21 |
| 2.10  | Crecimiento de las cepas de <i>Streptomyces</i> a diferentes valores de pH,<br>temperaturas y concentraciones de NaCl ..... | 22 |
| 2.11  | Capacidad de óxido – reducción de las cepas de <i>Streptomyces</i> .....  | 23 |
| 2.12  | Producción de sideróforos.....  | 23 |
| 2.13  | Cuantificación de arsénico .....  | 24 |
| 2.14  | Pre-selección de cepas en un proceso de lixiviación.....  | 25 |
| 2.15  | Lixiviación del mineral de arsenopirita.....  | 26 |
| IV.3  | Consideraciones éticas.....   | 27 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| IV.4  | Plan de análisis de los datos obtenidos en los ensayos .....   | 27 |
| V.    | RESULTADOS.....  | 28 |
| V.1   | Resultados en la identificación de las cepas de <i>Streptomyces</i> .....                              | 28 |
| 1.1   | Resultado de la caracterización fenotípica.....  | 28 |
| 1.2   | Resultado de las pruebas bioquímicas.....  | 31 |
| 1.3   | Resultado de la extracción de ADN.....   | 33 |
| 1.4   | Resultado de la amplificación por PCR .....  | 33 |
| 1.5   | Resultado de la purificación de los productos de PCR .....   | 35 |
| 1.6   | Resultado del análisis filogenético de las secuencias de los genes <i>16S ARNr</i> y <i>gyrB</i> 36    |    |
| V.2   | Resultados de los ensayos de crecimiento a diferentes condiciones de pH, % de NaCl y temperatura ..... | 39 |
| 2.1   | Resultado de la curva de calibración del método de Lowry .....   | 39 |
| 2.2   | Resultado del ensayo de crecimiento a diferentes valores de pH .....                                   | 40 |
| 2.3   | Resultado del ensayo de crecimiento a diferentes % NaCl.....   | 41 |
| 2.4   | Resultado del ensayo de crecimiento a diferentes temperaturas .....                                    | 42 |
| V.3   | Resultados de los posibles mecanismos presentes en la lixiviación .....                                | 43 |
| 3.1   | Resultados de la capacidad de óxido – reducción.....   | 43 |
| 3.2   | Resultado del ensayo de producción de sideróforos .....  | 45 |
| V.4   | Resultados de los ensayos de Lixiviación .....   | 46 |
| 4.1   | Resultado del ensayo de pre-selección de cepas según su capacidad de disolución de arsénico.....       | 46 |
| 4.2   | Resultados del ensayo de lixiviación .....   | 47 |
| VI.   | DISCUSIÓN .....  | 50 |
| VII.  | CONCLUSIONES .....   | 56 |
| VIII. | RECOMENDACIONES.....   | 57 |
| IX.   | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 58 |
| X.    | ANEXOS   |    |

## RESUMEN

El género de *Streptomyces* es muy usado por su valor biotecnológico y por tener la maquinaria necesaria para sobrevivir en ambientes extremos. El presente trabajo utilizó cuatro cepas de *Streptomyces* aisladas de concentrados mineros. El objetivo del estudio fue caracterizar fenotípica y genéticamente estas cepas y evaluar su capacidad de lixiviación de arsénico del mineral de arsenopirita así como los mecanismos relacionados en dicho proceso.

Las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente por su crecimiento en medio XGAL, y por su metabolismo según la producción de enzimas. La caracterización genética usando los genes *16S ARNr* y *gyrB*, las clasificaron en dos grupos; el primero fue similar en 95 % a la especie *S. hyderabadensis* y el segundo en 95 % a la especie *S. griseoincarnatus*.

El proceso de lixiviación fue realizado bajo las condiciones de pH 5, 5 % NaCl y 28°C, encontradas en los ensayos de crecimiento. Todas las cepas produjeron sideróforos y redujeron el ión férrico mas no oxidaron el ión ferroso. A pesar de presentar mecanismos involucrados en el proceso de lixiviación, las cepas disolvieron el arsénico en la misma proporción que el control.

### Palabras claves:

*Streptomyces*, biolixiviación, arsenopirita, filogenia



## ABSTRACT

The *Streptomyces* genus is widely used for its biotechnological value and for having the machinery to survive in extreme environments. The present work used four *Streptomyces* strains isolated from mining concentrates. The objective of the study was to phenotypically and genetically characterize these strains and to evaluate their arsenic leaching capacity from the arsenopyrite mineral as well as the related mechanisms in that process.

The strains were phenotypically characterized by their growth in XGAL medium, and by their metabolism according to the production of enzymes. Genetic characterization using the *16S rRNA* and *gyrB* genes classified them into two groups; the first was 95% similar to the *S. hyderabadensis* species and the second 95% similar to the *S. griseoincarnatus* species.

The leaching process was carried out under the conditions of pH 5.5% NaCl and 28 ° C, found in the growth tests. All the strains produced siderophores and reduced the ferric ion but did not oxidize the ferrous ion. Despite having mechanisms involved in the leaching process, the strains dissolved the arsenic in the same proportion as the control.

### Keywords:

*Streptomyces*, bioleaching, arsenopyrite, phylogeny

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1 Minerología y extracción del oro

El Perú es el primer productor de oro en América Latina y el octavo productor a nivel mundial, siendo poseedor del 4.2% de reservas de este metal a nivel mundial, distribuidas en las regiones de La Libertad, Cajamarca, Arequipa, Puno y Pasco (MINEN Perú, 2020).

El oro se encuentra en la naturaleza como un mineral nativo (en estado puro) y asociado a minerales sulfurados como pirita ( $\text{FeS}_2$ ), galena ( $\text{PbS}$ ), zincblende ( $\text{ZnS}$ ), arsenopirita ( $\text{FeSAs}$ ), estibnita ( $\text{SbS}_3$ ), pirrotita ( $\text{Fe}_{(1-x)}\text{S}$ ) y calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) (Adams, 2016). También se le puede encontrar asociados a telurios, compuestos carbonados, paladio y uranio (Adams, 2016). En el Perú, se practica la explotación minera de oro en yacimientos subterráneos asociados a minerales y en depósitos de aluviones en estado nativo, este último se refiere a la poca compactación de mineral en presencia de grava, limo o arcilla (MINEN Perú, 2019). La extracción de oro de depósitos aluviales no requiere mucha inversión; por otro lado, la extracción en yacimientos subterráneos requiere de una serie de pasos, el minado, la concentración y la refinación, como es el caso de la minera Yanacocha (Yanacocha, 2019).

Los procesos de concentración de oro se determinan por la granulometría y la exposición de este metal. Si el oro tiene un tamaño mayor a las  $200 \mu\text{m}$  y se encuentre en estado puro, el método de extracción usado es de gravimetría por su

densidad de 19.3 kg/m<sup>3</sup> (Marsden & House, 2006). En el caso de que el oro se encuentre asociado a otros minerales y además contenga un tamaño menor a 200  $\mu\text{m}$ , pasa por un proceso de disolución del mineral (lixiviación) en pila usando como solvente el cianuro (Misari & Jiménez, 1993). Si el oro se encuentra asociado superficialmente a minerales que contienen hierro, cobre, arsénico, antimonio o zinc pasa por un proceso de flotación seguido del proceso de lixiviación con cianuro (Misari & Jiménez, 1993). la flotación que es un método de concentración basado en las propiedades físico-químicas del mineral y las propiedades hidrofóbicas del oro (Gutierrez, 2017; Palomino & Rojas, 2008).

En el caso de los minerales refractarios que se caracterizan por encapsular el oro con un máximo de extracción del 70%, se utilizan pre tratamientos de oxidación antes del proceso de cianuración (lixiviación con cianuro). Los procesos de oxidación más comunes utilizados son: tostación, oxidación a presión (autoclave), proceso Nitrox y biooxidación (Misari & Jiménez, 1993). Los minerales refractarios más comunes son la pirita y la arsenopirita. El oro se encuentra en forma de inclusiones dentro de estos minerales sin formar complejos, lo que hace difícil su extracción, para lo cual se oxida los elementos presentes en el mineral hasta dejar accesible las partículas de oro (Milési et al., 1991).

La arsenopirita, que es objeto de estudio de este trabajo, está formado a aproximadamente 34.3% de hierro, 46% de arsénico y 19.69% de azufre (Anthony et al., 2003). Este mineral tiene una estructura tridimensional en forma de red que

encapsula el oro sin formar complejo con éste como se observa en la Figura 1 (Metodiev et al., 2016).



*Figura 1. Fotografía de microscopio electrónico de barrido del mineral de arsenopirita (Metodiev et al., 2016).*

## I.2 Biolixiviación de minerales

La lixiviación de minerales mediada por microorganismos se le conoce como proceso de biolixiviación (Rohwerder et al., 2003). Los mecanismos de biolixiviación se clasifican según la interacción de los microorganismos con el mineral, en ‘contacto’ y ‘no contacto’ (Schipper et al., 2014). En el mecanismo de contacto, los microorganismos se encuentran adheridos al mineral donde se realiza la oxidación del ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y de compuestos sulfurados, produciendo ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y protones ( $\text{H}^+$ ) que servirán para atacar la red del mineral en presencia de oxígeno (Schipper et al., 2014). Un caso derivado del mecanismo de ‘contacto’, es la formación de biopelículas, donde se ha observado la importancia del material extracelular (EPS) en la disolución de mineral sulfurado (Feng et al., 2019). El mecanismo de ‘no contacto’ es realizado por los microorganismos en su

forma planctónica o en suspensión (Schippers et al., 2014). A pesar de esta diferenciación, en la realidad, el proceso de biolixiviación ocurre por la combinación de ambos mecanismos.

Los mecanismos de biolixiviación también se clasifican según el tipo de disolución del mineral: por la vía de tiosulfatos, en el cual el tiosulfato es el primer intermediario de sulfuro soluble producido y por la vía de polisulfuros que combina la acción del ión férrico y los protones sobre el mineral (Mahmoud et al., 2017), Figura 2. Los microorganismos más estudiados en los procesos de oxidación son *At. thiooxidans*, *At. ferrooxidans* (Liu et al., 2017; Rohwerder et al., 2003) y *L. ferrooxidans*. Estas bacterias son moderadamente termófilas, quimiolitotróficas y resistente a metales (Schippers et al., 2014).

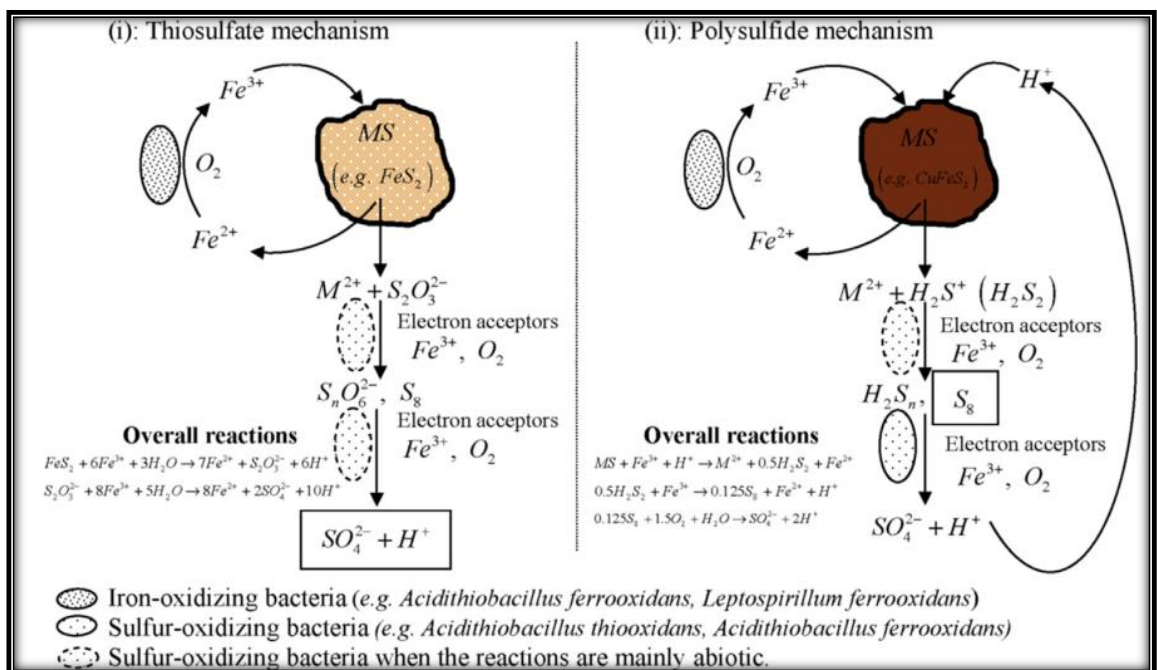


Figura 2. Mecanismos de lixiviación en minerales sulfurados (Drewniak et al., 2008).

Las bacterias *At. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* se encargan de oxidar el ión ferroso en presencia de oxígeno y en condiciones ácidas. El ión férrico formado sirve como agente oxidante para los metales sulfurados y para los compuestos intermediarios de sulfuros formados en el proceso de lixiviación (Schippers et al., 2014). La oxidación del ión ferroso se lleva a cabo en la membrana, específicamente en el proceso de respiración celular, en donde los electrones del ión ferroso ingresan a la cadena transportadora de electrones desde el citocromo C, siendo el oxígeno el aceptor de electrones, y resultando en la formación de ATP (Elbehti et al., 2000). De esta manera, el ión ferroso sirve como fuente de energía para este tipo de microorganismos.

Existe otro mecanismo que desestabiliza la red del mineral refractario usando sideróforos, los cuales son compuestos producidos por microorganismos del género *Streptomyces* y *Arthrobacter* en su forma planctónica, Figura 3 (Drewniak et al., 2008; Kalinowski et al., 2000).

El mecanismo de biocinauración se realiza cuando el oro se encuentra expuesto en los minerales refractarios por las especies *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas spp.*, y *Clitocybespypolysporu spp*; entre otras (Karthikeyan et al., 2015). Sin embargo, estos microorganismos también producen compuestos orgánicos, los cuales forman complejos con el oro, impidiendo su extracción. En estos casos, se utilizan microorganismos como *Streptomyces setonii* y *Pseudomonas spp.* que degradan los compuestos orgánicos (Amankwah et al., 2005).

### I.3 Género *Streptomyces*

Las bacterias del género *Streptomyces* pertenecen al Phylum Actinobacteria y al Orden Streptomycetales y se los encuentran en la superficie terrestre y en sedimentos marinos (Whitman et al., 2012). Estas bacterias poseen metabolismo aerobio, son quimioorganotróficos, Gram positivas y presentan filamentos que se asemejan a las hifas de los hongos; además presentan micelio aéreo y pueden producir esporas (Whitman et al., 2012). Algunas especies producen pigmento en su micelio vegetativo y otras producen pigmentos extracelulares. Tienen una temperatura óptima de crecimiento en el rango de 25 – 35°C, pH óptimo en el rango de 6.5 a 8, aunque pueden tolerar valores de pH más bajos (Whitman et al., 2012). Estas bacterias son muy estudiadas porque producen metabolitos secundarios de valor biotecnológico, como antibióticos (Chater, 2016).

Algunas especies producen sideróforos, compuestos de un tamaño menor a 1kDa, los cuales son excretados al medio externo para capturar el ión férrico (Andrews et al., 2003). Los sideróforos pueden ser clasificados según los grupos funcionales que usan como ligandos del ión férrico: catecol, hidroximato o hidroxicarboxilatos (Andrews et al., 2003; Neilands, 1995; Patel et al., 2010). La gran afinidad de los sideróforos por el ión férrico les permite tener un efecto fuerte en la solubilización de óxidos de hierro como ferrihidrita, goetita y hematita (Kraemer et al., 2005).

Un estudio propuso un modelo de lixiviación de arsénico del mineral de escorodita a partir de *Streptomyces spp.* (Drewniak et al., 2008). En este modelo las bacterias

secretan sideróforos, los cuales forman complejos con el ión férrico del mineral y estos complejos son reintroducidos por un sistema de transporte activo. La reducción del ión férrico se da por agentes reductores dentro de la bacteria y el ión ferroso se separa del sideróforo por baja afinidad (Drewniak et al., 2008). Además, el arsenato del mineral se solubiliza, ingresa a la bacteria y por medio de arsenato reductasa se forma arsenito, el cual es transportado fuera de las bacterias (Drewniak et al., 2008), Figura 3.

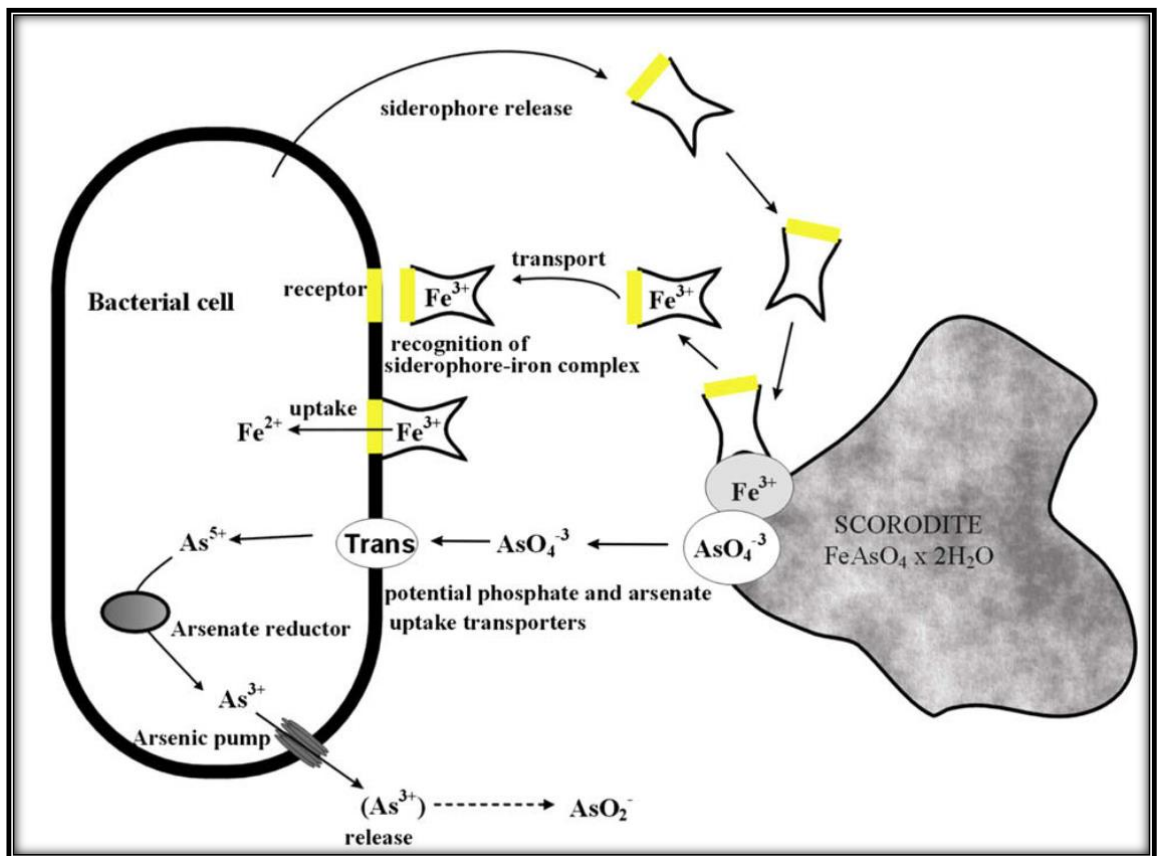


Figura 3. Modelo de la lixiviación de arsénico del mineral de scorodita a partir de sideróforos (Drewniak et al., 2008).



Los *Streptomyces* son resistentes a metales pesados y emplean mecanismos de encapsulamiento por micelas (Mnif & Ghribi, 2015; Santos et al., 2017) y la expresión de genes de resistencia semejantes al *operón ars* presentes en plásmidos (Wang et al., 2006).

En un estudio previo del Laboratorio de Biotecnología Ambiental – UPCH, se aislaron cepas del género de *Streptomyces* de cultivos concentrados de minerales (Matsubara & Hurtado, 2013). En este estudio se revisaron las propiedades de tolerancia a metales pesados, pH ácidos, diferentes temperaturas y en presencia de cloruro de sodio como también la capacidad de oxidar el ión ferroso (Matsubara & Hurtado, 2013). En otro estudio del mismo laboratorio se usaron las cepas E1, 21 y AB5 del estudio anterior y se analizó la capacidad de lixiviación en minerales de arsenopirita y enargita (Ugarte, 2016). En este último estudio se llegó a solubilizar el arsénico del mineral de arsenopirita en un 16% sobre el control. Aún son necesarios más estudios del mecanismo de lixiviación y sobrevivencia en ambientes de minas por representantes de este género.

#### I.4 Identificación molecular en base a los genes *gyrB* y *16S ARNr*.

La identificación molecular comúnmente se realiza amplificando una región del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal (gen *16S ARNr*), empleando primers universales; sin embargo, estos primers en algunos casos son de baja especificidad y generan productos de la amplificación con insuficiente variabilidad genética,

llegando solo hasta la identificación por género (Frank et al., 2008; Labeda et al., 2012; Osborne et al., 2005).

Por ejemplo, el clado de *Streptomyces griseus* es el grupo menos definido en términos filogenéticos (Rong & Ying, 2010). En un estudio se usaron los genes de mantenimiento celular: *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *trpB* además el gen de *16S ARNr*, concluyendo que el análisis filogenético de árboles concatenados de hasta 5 genes, es más preciso y robusto para la delimitación dentro del grupo de *Streptomyces* (Guo et al., 2008).

El gen *gyrB* que expresa a la enzima girasa y que pertenece a los genes de mantenimiento es un buen candidato en la identificación molecular de las especies de este género ya que rara vez se transfiere horizontalmente, su tasa de evolución molecular es más alta que el gen de *16S ARNr* y su distribución abarca casi todo el dominio Bacteria (Kasai et al., 1998). La base de datos del GenBank almacena las secuencias parciales y totales del gen *16S ARNr* y de otros genes de interés público (Nicomrat et al., 2006).

## I.5 Planteamiento del problema

La importancia del oro está basada por su uso en tecnología, joyas y en bancos (Global Gold Demand, 2020). Por lo cual, su extracción ha aumentado desde el 2005 al 2018 en 1000 toneladas métricas a nivel mundial (World Gold Production 2005-2018, 2020). También ha aumentado la inversión de nuevos proyectos de

extracción, reduciendo las reservas naturales de oro; a pesar de ello, la producción de oro ha decaído. En el caso del Perú se observó una reducción del 8% con respecto al año 2018 (MINEN Perú, 2020).

Las tecnologías de extracción se clasifican según el grado de exposición del oro y según su granulometría, si ésta es mayor a 200 um se usan procesos de pirometalurgia y gravimetría (Marsden & House, 2006). La pirometalurgia es un proceso muy antiguo y requiere adición excesiva de energía, por lo cual se prefiere la gravimetría. En el caso de minerales con oro de granulometría menor a 200 um se utilizan procesos de flotación y de hidrometalurgia (Gutierrez, 2017; Palomino & Rojas, 2008). El proceso de flotación aprovecha las características físico – químicas del metal mientras que la hidrometalurgia usa el cianuro como solvente en procesos de lixiviación (Gutierrez, 2017; Palomino & Rojas, 2008). Con estos procedimientos se asegura la extracción mayor al 80%. En el caso del Perú, son los procesos utilizados para la extracción de oro, dejando sin explotar las menas con minerales refractarios (MINEN Perú, 2020).

Si el oro está asociado a minerales refractarios como la arsenopirita, se aumenta la carga de estos procesos, aumentando los costos y deteriorando el medio ambiente por el uso excesivo de solventes como el cianuro, sin mencionar los efectos sobre la salud de las personas (International Cyanide Management Institute, 2018). Por lo cual se han desarrollado pre tratamientos pre tratamientos de oxidación, bio-oxidación, autoclave y tostación (Mestas, 2015).

Con el presente trabajo se quiere utilizar bacterias del género de *Streptomyces* en los procesos de pre tratamiento de lixiviación en la extracción del oro, con el fin de mejorar la eficiencia de extracción del mineral refractario de arsenopirita y entender los mecanismos presentes en dicho proceso.

## I.6 Justificación

En la actualidad, la extracción de oro de minerales refractarios es ineficiente y con el presente trabajo se quiere aumentar dicha eficiencia utilizando bacterias del género *Streptomyces*, ya que son capaces de lixiviar arsénico del mineral de arsenopirita. Con lo cual se disminuiría los costos de extracción del oro y la contaminación del medio ambiente por la sobre utilización del cianuro, que tiene efectos contraproducentes hacia el medio ambiente y a la salud humana. Además se quiere determinar algunos de los mecanismos presentes en estas bacterias y que estuvieran involucrados en el proceso de lixiviación del mineral de arsenopirita.

## II. HIPÓTESIS

Las cepas de *Streptomyces* aisladas de concentrados mineros poseen mecanismos que pueden intervenir en la lixiviación de arsénico del mineral de arsenopirita.

### III. OBJETIVOS

#### III.1 Objetivos Generales

Caracterizar fenotípica y genéticamente cuatro cepas de *Streptomyces* y evaluar su capacidad de lixiviación de arsénico del mineral de arsenopirita.

#### III.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar fenotípicamente a las cepas de *Streptomyces*.
- Caracterizar genéticamente a las cepas de *Streptomyces* en base al gen *16S ARNr* y al gen *gyrB*.
- Evaluar las condiciones de crecimiento de las cepas de *Streptomyces* en diferentes concentraciones de NaCl, pH y temperatura.
- Evaluar la capacidad lixivante de las cepas de *Streptomyces*, mediante la disolución de arsénico del mineral de arsenopirita.
- Determinar la presencia de sideróforos y la capacidad de óxido reducción de las cepas de *Streptomyces*, relacionados en el proceso de lixiviación de arsenopirita.

## IV. METODOLOGÍA

### IV.1 Muestra

#### 1.1 Cepas de *Streptomyces*

Se usaron cuatro cepas del género de *Streptomyces* con código de laboratorio: E1, 21, K1B y AB5; previamente caracterizadas (Pacheco-Huertas, 2016) y que mostraron capacidad lixivante de arsénico (Ugarte, 2016), proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental-LID-UPCH.

#### 1.2 Mineral de arsenopirita

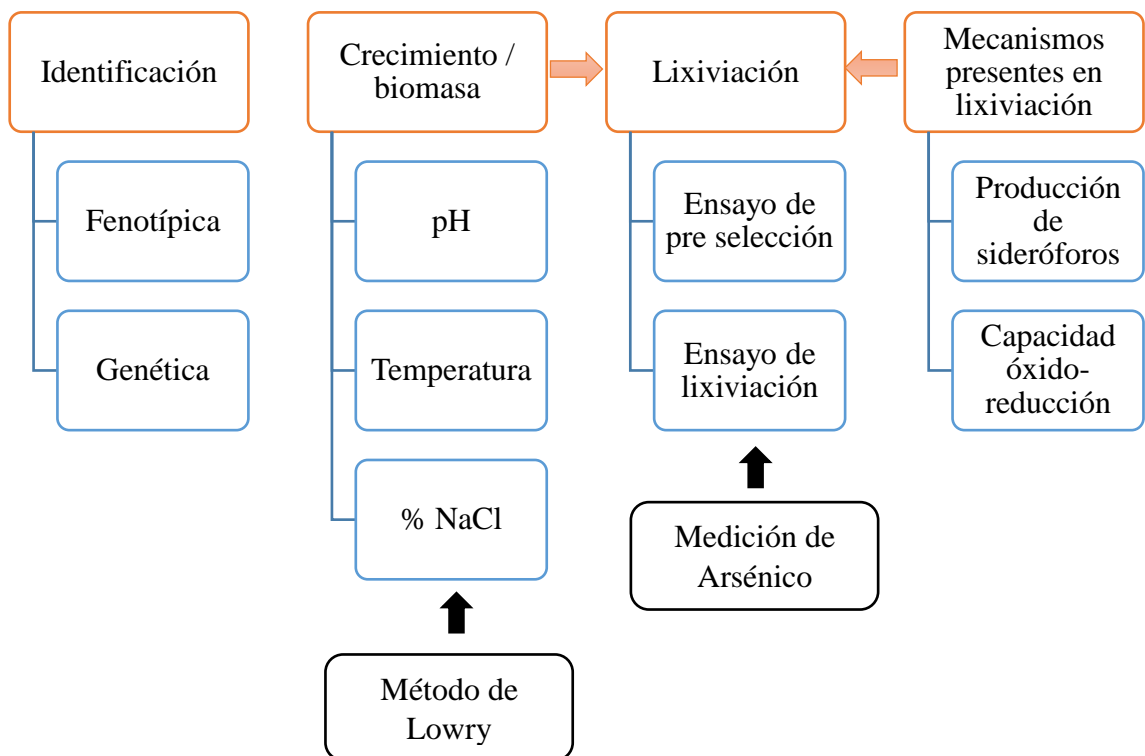
Se utilizaron muestras de mineral de arsenopirita procedentes de un yacimiento aurífero en Chivilca, Perú, que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental-LID, UPCH.

### IV.2 Metodología

#### 2.1 Diagrama de flujo de la metodología

La metodología de identificación permitió, a través de las características fenotípicas y genotípicas, identificar las cepas hasta nivel género y clasificarlas. Los ensayos de crecimiento se realizaron para identificar las condiciones mínimas de pH, temperatura y NaCl, cercanas a los procesos mineros del oro. El primer ensayo de lixiviación se realizó con el fin de escoger las cepas que disolvieron en mejor grado el arsénico con menor concentración de mineral. En el segundo ensayo de

lixiviación se utilizaron estas cepas y se evaluó la capacidad de disolución de arsénico a una concentración mayor de mineral. Por último, se evaluaron la capacidad de producción de sideróforos y la capacidad de óxido reducción de hierro, los cuales son mecanismos observados en bacterias lixiviantes del mineral de arsenopirita.



## 2.2 Caracterización fenotípica

Las cepas de *Streptomyces* se encontraban almacenadas en medio líquido XGAL con glicerol al 20% y a -20°C. Primero, se reactivaron las bacterias en caldo líquido XGAL a 28°C y 150 rpm de agitación por tres días. De este pre-inóculo, se procedió a sembrar por agotamiento en medio sólido y líquido XGAL; se incubó a 28°C por



15 días, hasta observar la formación de esporas. Se anotaron las características macroscópicas y microscópicas y se realizó tinción GRAM (Madigan, 2009).

### 2.3 Caracterización bioquímica

Las cepas de *Streptomyces* que sirvieron de pre-inóculo fueron sembradas en medio agar XGAL y con un periodo de incubación de 15 días a 28°C hasta la formación de esporas. Las esporas se utilizaron como inóculo en los ensayos bioquímicos para la determinación de las enzimas catalasa (CAT), oxidasa (OXI), amilasa (AMI), gelatinasa (GEL), lisina descarboxilasa (LIA) y ureasa (URE). Además, se determinó la fermentación de glucosa, lactosa o sacarosa (medio agar hierro triple azúcar) y la utilización de citrato como fuente de carbono (Whitman et al., 2012). Las pruebas bioquímicas fueron incubadas a 37°C por una semana y se procedió a leer los resultados.

De la misma manera se procedió con las pruebas fisiológicas de uso de fuentes de carbono. Para ello, se prepararon los hidratos de carbono al 1% (ver Anexo) con indicador de Andrade (Whitman et al., 2012). Los hidratos de carbono utilizados fueron Myo-Inositol (Myo), L-Rhamnosa (Rha), D-Glucosa (Glu), Melibiosa (Mel), L-Arabinosa (Ara), Rafinosa (Raf), D-Fructuosa (Fru), D-Manitol (Man), Sucrosa (Suc) y D-Xylosa (Xyl). Las esporas de las cepas fueron usadas como inóculos y colocados en tubos con 2ml del medio con el hidrato de carbono respectivo, se incubaron a 28°C por una semana. La fermentación del carbohidrato, es decir la

acidificación del medio, se observó como un viraje al color rojo (pH menor o igual a 5.5).

#### 2.4 Extracción del ADN

Las esporas de las cepas se sembraron en tubos con 20 mL de caldo XGAL, y se incubaron a 28°C y 150 rpm de agitación por 4 días. Se tomó 1 mL del caldo con las bacterias, se centrifugó por 15 min y se procedió a descartar el sobrenadante. Los pasos de centrifugación se llevaron a cabo a 10000 rpm. Seguidamente se agregó a cada una 180 µL de la solución de lisis (Anexo 1) y 80 µL de lisozima a 50 mg/mL (Sigma), se mezcló vigorosamente con vórtex para resuspender el precipitado formado en el paso anterior. Se incubó a 37°C por 1 hora. Al terminar la incubación se agregó 20 µL de Proteinasa K (New England BioLabs), 75 µL de Sulfato dodecil de sodio (SDS, Sigma) al 10 % y 300 µL de solución TE (Anexo 1); se mezcló con vórtex y se dejó incubando por 2 horas a 37°C. Se agregó 100 µL de NaCl a 5 M y 100 µL de CTAB/NaCl (Anexo 1) calentado previamente a 56 °C. Se mezcló e incubó a 56°C por 10 minutos. Se agregó 750 µL de Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico en una proporción 25:24:1, se mezcló y centrifugó por 10 minutos. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo de 1.5 mL, se le agregó 1 mL de Etanol Absoluto frío y se dejó a -20 °C por 1 hora. Terminado el tiempo, se procedió a centrifugar por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado formado se lavó con 1mL de etanol frío al 70 % y se procedió a centrifugar por 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado a

temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió en 20  $\mu$ L de solución TE y se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

## 2.5 Amplificación de los genes *16S ARNr* y *gyrB* por PCR

Para el caso del gen *16S ARNr*, se realizó una reacción de amplificación de la enzima Polimerasa (PCR, siglas en inglés) usando la enzima ADN Polimerasa Phusion High Fidelity de New England Biolabs. Los primers usados fueron 27F (5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1525R (5'- AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Rainey et al., 1996). La concentración final para la reacción de PCR de cada reactivo fue el siguiente: 1X del Buffer de la enzima, 200  $\mu$ M de dNTP a 10 mM, 0.2  $\mu$ M de primer 1525R a 10  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M de primer 27F a 10  $\mu$ M y 200 ng del ADN molde para un volumen final de 25  $\mu$ L. El ciclo de la reacción de amplificación fue el siguiente: 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 ciclos de 30 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ , 45 segundos a  $58^{\circ}\text{C}$  y 1.5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ , con una extensión final de 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ .

Para el caso del gen *gyrB*, se realizó un PCR usando la enzima ADN Polimerasa de Thermo Scientific. Los primers usados fueron gyrBPFA (5'- CTCGAGGGTCTGGACGCGGTCCGCAAGCGACCCGGTATGTA-3') y gyrBPRA (5'-GAAGGTCTTCACCTCGGTGTTGCCAGCTTCGTCTT-3) (Rong et al., 2009). La concentración final para la reacción de PCR de cada reactivo fue el siguiente: 1X del Buffer de la enzima, 252  $\mu$ M de dNTP a 10 mM, 0.1  $\mu$ M de primer gyrBPFA a 10  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M de primer gyrBPRA a 10  $\mu$ M, 3 mM de  $\text{MgCl}_2$

a 50 mM, 10% de DMSO y 200 ng de ADN molde para un volumen final de 25  $\mu$ L. El ciclo de la reacción de amplificación fue el siguiente: 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 65 °C y 1.5 minutos a 72 °C, con una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

## 2.6 Purificación de productos de PCR

Se agregó 1  $\mu$ L de acetato de sodio a 3 M, pH 5.2, por cada 10  $\mu$ L de volumen del producto de PCR, luego se agregó 2.5 volúmenes de Etanol Absoluto frío por cada volumen del producto de PCR. Se procedió a mezclar con vórtex y se dejó a -20°C por 1.5 horas. Seguidamente se centrifugó por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado formado con 300  $\mu$ L de Etanol frío al 70% y se procedió a centrifugar por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado formado se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el precipitado con 15  $\mu$ L de agua ultra pura. Además se midió la concentración de ADN verificando su pureza utilizando TECAN Instrument. Las muestras fueron enviadas a MACROGEN para su secuenciación usando la técnica SANGER y usando los mismos primers de la reacción de PCR para sus respectivos genes. Los pasos de centrifugación se realizaron a 14000 rpm.

## 2.7 Electroforesis de ADN

Se prepararon geles de agarosa al 1% y se usó GelRed de Biotium para teñir el ADN. Para un gel de 100 mL se utilizó 1  $\mu$ L de GelRed disuelto en la solución TAE 1X

(Anexo 1) junto con la agarosa minutos antes que gelifique. Además se utilizó como marcador de ADN, a InnuSTAR 1 kb DNA Ladder Express de Analytikjena. La electroforesis se llevó a cabo usando la solución TAE 1X como buffer de corrida a 85 voltios por 35 minutos.

## 2.8 Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas del gen de *16S ARNr* y del gen *gyrB* fueron revisadas con el programa FinchTV versión 1.4.0 con el fin de corroborar la posición de las bases nitrogenadas con respecto al cartograma enviado por MacroGen. Luego se empleó el programa CLC Genomics Workbench 3 para realizar el corte de los extremos y el ensamblaje de las secuencias. De esta manera, las secuencias editadas fueron usadas en el blast con la base de datos del GenBank. Para el análisis filogenético, se escogieron secuencias de especies descritas que se alineaban a las secuencias de las cepas en este estudio con 97% de identidad o más. El alineamiento y el árbol filogenético se realizó utilizando el programa MEGA-X vs 10.0.5 (Kumar et al., 2018). El alineamiento de las secuencias para cada gen se realizó usando el método MUSCLE y la obtención del árbol filogenético se realizó usando el método estadístico de Neighbor-Joining, con el modelo de sustitución de Kimura 2 parámetros y 1000 réplicas de Bootstrap. La concatenación de las secuencias para los dos genes se realizó usando el programa SequenceMatrix, dando un archivo en formato NEXUS, el cual se convirtió a FASTA y seguidamente se procedió a la obtención del árbol filogenético.

## 2.9 Cuantificación de proteínas totales por el método de Lowry

Se usó el método Lowry modificado para la determinación de proteínas totales (Waterborg, 2002). La técnica se basa en la reacción que ocurre en los enlaces peptídicos con el cobre y el reactivo de Folin en un medio alcalino, originando un color azul, cuya intensidad corresponde a la cantidad de proteína total en la solución problema. La intensidad de color se midió por espectrofotometría a 750 nm. Primero se realizó la curva de calibración con un stock de suero de albumina bovina (BSA) a 0.2 mg/ml disuelta en agua destilada autoclavada. Se tomó 150  $\mu$ L de BSA correspondientes a 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu$ g de proteína. Se añadió 100  $\mu$ L de NaOH a 1 N, se mezcló vigorosamente con vórtex y se incubó por 15 minutos (paso de lisis celular). Seguidamente, se añadió 1 mL de la solución Lowry A (Anexo 1), se mezcló con vórtex y se incubó por 10 minutos. Se añadió 125  $\mu$ L de la solución Lowry B (Anexo 1), se mezcló con vórtex y se incubó por 30 minutos más. Terminado el tiempo, se leyó y anotó la densidad óptica. Finalmente se realizó el ajuste de los datos en una curva de calibración que relaciona las proteínas totales con la absorbancia obtenida. Cada punto de la curva se realizó por triplicado.

En el caso de las muestras con las cepas, se utilizó un volumen de 1 mL del inóculo que fue centrifugado por 15 minutos a 10000 rpm y se descartó el sobrenadante. El proceso anterior se repitió lavando con 1 mL de agua destilada. Al precipitado formado, se le añadió 150  $\mu$ L de agua destilada y se procedió desde el paso de la adición de NaOH del ensayo de Lowry para la calibración de la curva.

## 2.10 Crecimiento de las cepas de *Streptomyces* a diferentes valores de pH, temperaturas y concentraciones de NaCl

Se preparó un stock de cepas sembrando las esporas en 20 mL de caldo XGAL por un periodo de incubación de 4 días a 28 °C y 150 rpm de agitación. Se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en agua destilada. Se utilizó 1 mL de stock de cada cepa para la cuantificación de proteínas totales usando el método modificado de Lowry. Los ensayos iniciaron con un inóculo correspondiente a 10 µg de proteínas totales de cada cepa.

Se prepararon medios líquidos de XGAL 1/10 y de ACL 1/10. Luego estos medios fueron llevados a diferentes valores de pH (2, 3, 4, 5, 6 y 7) usando ácido sulfúrico a 1 N y se repartieron 4 mL en tubos de ensayo. También, se prepararon medios XGAL 1/10 y ACL 1/10 a pH 7 con 0 %, 5 %, 10 % y 15 % de NaCl. Finalmente, se prepararon medios líquidos de XGAL 1/10 y de ACL 1/10 a pH 7 y se repartieron en tubos con 4 mL de cada medio, los que sirvieron para las pruebas a diferentes temperaturas (28 °C, 37 °C y 50 °C). Cada cepa fue sembrada por duplicado por tratamiento, incubada por 15 días a 150 rpm de agitación. Los tratamientos de pH y % NaCl se incubaron a 28°C.

Finalizado los experimentos, se anotaron las características de crecimiento y se cuantificaron las proteínas totales por cada tratamiento usando el método modificado de Lowry.

### 2.11 Capacidad de óxido – reducción de las cepas de *Streptomyces*

El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera. Primero se preparó el medio líquido XGAL 1/10. Luego se preparó agua destilada a pH 1.8 usando ácido sulfúrico 10 N, que sirvió para preparar la solución de FeSO<sub>4</sub> y se esterilizó con filtro de membrana, tamaño de poro 0.2 µm. La solución de ión férrico provino de una solución de FeSO<sub>4</sub> oxidada por bacterias lixiviantes y fue esterilizado por filtro de membrana. En un ambiente estéril se mezcló el medio XGAL con la solución FeSO<sub>4</sub> hasta obtener concentraciones finales de 0.2, 1 y 5 g/L de Fe<sup>2+</sup>. Del mismo modo se procedió con la solución de ión férrico hasta obtener concentraciones finales de 1, 2 y 5 g/L de Fe<sup>3+</sup>. Cada tratamiento se repartió en tubos con 4 mL de medio. El inóculo se preparó de la manera descrita anteriormente y se sembró a una concentración de bacterias correspondientes a 6 µg/mL de proteínas totales. Cada tratamiento se realizó por duplicado y se incubó a 28 °C por 15 días. La oxidación del ión ferroso se determinó por el viraje de color del medio a amarillo y la reducción del ión férrico se determinó por viraje del color del medio a translúcido.

### 2.12 Producción de sideróforos

La producción de sideróforos se observó usando el medio sólido, CAS (Chrome Azurol S, Anexo 1). Este medio contiene como indicadores el Chrome Azurol S y el bromuro de Hexadeciltrimetil amonio (HDMTA) que forma complejo con ión férrico, lo que le da el color azul característico al medio (Louden et al., 2011). Cuando los microorganismos producen sideróforos, estas moléculas capturan el ión



férrico del medio y generan un cambio de color de azul a naranja. La preparación del medio se detalla en el Anexo 1. Primero se preparó el inóculo, tanto en medio líquido XGAL y ACL; se incubaron las cepas por tres días a 28 °C y en movimiento a 150 rpm, con el objetivo de observar alguna diferencia en el crecimiento previo a la producción de sideróforos. Se sembró 20 µL de cada cepa en el centro del medio sólido CAS, teniendo en cuenta que contengan el medio de crecimiento previo. El inóculo fue cuantificado por el método de Lowry modificado. Además se sembró *B. subtilis* (Dertz et al., 2006) como control positivo y *E. coli* como control negativo en la producción de sideróforos. Las placas con medio sólido fueron incubadas a 28 °C por 15 días. Finalizado el periodo de incubación, se midió el diámetro del halo formado.

### 2.13 Cuantificación de arsénico

La medición de la concentración de arsénico es un indicador de la desestabilización de la malla de sulfuro en el mineral de arsenopirita (Román Maldonado, 2000). La determinación de arsénico soluble en los medios se llevó a cabo usando la técnica: Determinación de arsénico por absorción atómica en flama e hidruros según “Standard Methods for the Examination of Water y Wastewater”(Eaton et al., 2005). Este ensayo fue realizado por el Laboratorio de Espectrometría de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera y Metalúrgica en la Universidad Nacional de Ingeniería, a cargo del MSc Atilio Mendoza. El procedimiento se resume de esta manera: La muestra fue aspirada y luego atomizada dentro de una flama, donde se

midió por medio de espectrofotometría, la cantidad de luz absorbida, siguiendo la ley de Lambert-Beer.

#### 2.14 Pre-selección de cepas en un proceso de lixiviación

En este ensayo se preparó caldo XGAL 1/10 y ACL 1/10 con la adición de mineral y cloruro de sodio. Se preparó cada medio de cultivo con 5% de NaCl. El mineral de arsenopirita fue esterilizado de la siguiente manera: se agregó un volumen de alcohol a 97% hasta cubrir el mineral, mezclando homogéneamente y se dejó evaporar a 60°C. Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces. Se repartió el mineral en matraces a una concentración de 2.5 % w/v en un volumen final de 50 mL de los caldos XGAL 1/10 y ACL 1/10, todo esto en condiciones estériles. Finalmente, se agregó NaOH hasta llegar a pH 5. El inóculo de cada cepa, se incubó en caldo XGAL por 3 días a 28°C y 150 rpm de agitación. Cada tratamiento fue realizado por duplicado con sus respectivas cepas y un inóculo correspondiente a 500 µg de proteínas totales (previamente lavadas con agua destilada estéril). Se prepararon los siguientes tratamientos: control de ambos medios con mineral sin cepas y caldo (XGAL 1/10 o ACL 1/10) con mineral más el inóculo. Los tratamientos se incubaron por 30 días a 28 °C y en reposo. Luego de terminado el periodo de incubación, cada tratamiento fue filtrado y llevado a analizar para medir la concentración de arsénico disuelto.

## 2.15 Lixiviación del mineral de arsenopirita

En este ensayo se escogieron dos cepas del ensayo anterior que disolvieron el arsénico en más 5 mg/mL y más de 2 mg/mL con respecto al control en medio XGAL y medio ACL respectivamente, siendo las cepas K1B y AB5. Este ensayo se realizó usando tanto mineral estéril como no estéril. El mineral se esterilizó de la manera descrita anteriormente. Se preparó matraces con caldo y 5 % de NaCl a pH 5 con 5 % w/v de mineral de arsenopirita en un volumen final de 250 mL. El inóculo fue preparado en caldo XGAL, incubado por 3 días a 28°C y 150 rpm de agitación. Luego se tomó 30 mL del caldo con la cepa, de los cuales 3ml sirvieron para cuantificar proteínas totales y 27 mL sirvió de inóculo para los tratamientos. Antes de ser sembradas, los inóculos se lavaron con agua destilada estéril a pH 5. La cepa K1B se sembró en caldo XGAL 1/10 y las condiciones antes expuestas, teniéndose los siguientes tratamientos: control con caldo y mineral estéril, control con caldo y mineral no estéril, inóculo más caldo y mineral estéril e inóculo más caldo y mineral no estéril, todo por duplicado. Del mismo modo, se sembró la cepa AB5 pero en caldo ACL 1/10, teniendo los mismos tratamientos. Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones estériles para evitar contaminación del ambiente. Terminado el periodo de incubación, cada tratamiento y sus duplicados fueron filtrados y llevados a analizar para medir la concentración de arsénico disuelto.

### IV.3 Consideraciones éticas

El presente trabajo siguió el manual de procedimientos de ética de la universidad, siendo exonerado de la evaluación por el Comité de Ética (Anexos).

### IV.4 Plan de análisis de los datos obtenidos en los ensayos

Las ensayos de pre-selección antes mencionados: tratamientos a diferentes valores pH, diferentes porcentajes de NaCl, diferentes temperaturas, selección en mineral esterilizado y la prueba de lixiviación; tuvieron como variable independiente a las variables cualitativas politómicas: pH, porcentaje de NaCl, temperatura y tratamiento-control. Mientras que las variables dependientes correspondieron a la concentración de proteínas totales y la concentración de arsénico disuelto (cuantitativa continua).

El análisis realizado en la prueba de pre-selección de cepas y lixiviación se llevó a cabo comparando las medias de la concentración de mineral disuelto para cada tratamiento utilizando el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis de una vía en el programa RStudio versión 1.2.1335, considerando que los tratamientos fueron independientes.

## V. RESULTADOS

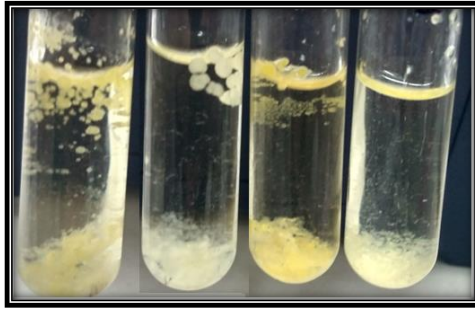
### V.1 Resultados en la identificación de las cepas de *Streptomyces*

#### 1.1 Resultado de la caracterización fenotípica

Las bacterias en medio líquido presentaron las siguientes características: formación de estructuras esféricas filamentosas de diferentes tamaños y colores, en algunos casos con presencia de pigmentos que tiñeron el medio, cepa AB5, Figura 4. También se observó la formación de una película en la superficie del medio y de esporas de color gris, luego de más de 15 días de incubación en condiciones de reposo. La descripción detallada se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización macroscópica de cepas de *Streptomyces* en medio líquido.

| <b>Morfología</b> | <b>E1</b>            | <b>21</b>            | <b>K1B</b>           | <b>AB5</b>           |
|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Color</b>      | Blanco               | Amarillo             | Amarillo-marrón      | Amarillo-marrón      |
| <b>Forma</b>      | Filamentosa circular | Filamentosa circular | Filamentosa circular | Filamentosa circular |
| <b>Tamaño</b>     | Pequeño              | Mediano              | Mediano              | Grande               |
| <b>Espora</b>     | Plomo-superficie     | Plomo-superficie     | Plomo-superficie     | Plomo-superficie     |
| <b>Pigmento</b>   | No                   | No                   | Si, rojizo           | Si, rojizo           |



*Figura 4. Crecimiento de las cepas de Streptomyces en medio líquido XGAL.*

El crecimiento de las cepas en medio sólido se caracterizó por la formación de colonias circulares de bajo relieve y con formación de surcos. En la primera semana de incubación, las colonias crecieron incrustados en el agar y de forma seca, Figura 5. Las primeras colonias de la cepa K1B, 21 y AB5 aparecieron después del primer día de incubación, mientras que las primeras colonias de la cepa E1 aparecieron al tercer día de incubación. Las cepas AB5 y K1B produjeron esporas pulverulentas de color gris a los 12 días de incubación aproximadamente. Mientras que la cepas 21 produjo esporas a los 15 días de incubación aproximadamente y la cepa E1 produjo esporas blancas a los 13 días de incubación y luego de 3 días produjo esporas grises. La descripción detallada se presenta en la Tabla 2. La variabilidad de las cepas se mostró por la diferencia en pigmentación en su estructura vegetativa, bajo las mismas condiciones de incubación. Por ejemplo, se observó que dos placas con medio sólido que contenían la cepa K1B provenientes del mismo inóculo e incubadas bajo las mismas condiciones, una de ellas presentó un color rojizo y la otra un color verduzco. Lo mismo sucedió con la cepa AB5. En el caso de la cepa E1, se observó un patrón de cambio de coloración de fucsia intenso a un rosado en su estructura vegetativa en la segunda semana de incubación.

Tabla 2. Caracterización macroscópica de las cepas de *Streptomyces* en medio sólido XGAL.

| Morfología               | E1                     | 21                     | K1B                    | AB5                    |
|--------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Color superficial</b> | Fucsia a rosado        | Crema                  | Crema                  | Crema                  |
| <b>Color envez</b>       | Fucsia a rosado        | Amarillo-marrón        | Amarillo-marrón        | Amarillo-marrón        |
| <b>Forma</b>             | Circular, bajo relieve | Circular, bajo relieve | Circular, bajo relieve | Circular, bajo relieve |
| <b>Textura</b>           | Seca - opaca           | Seca – opaca           | Seca - opaca           | Seca – opaca           |
| <b>Espora</b>            | Blanco – Gris          | Gris                   | Gris                   | Gris                   |
| <b>pigmento</b>          | No                     | Si, rojizo, leve       | Si, rojizo             | Si, rojizo             |

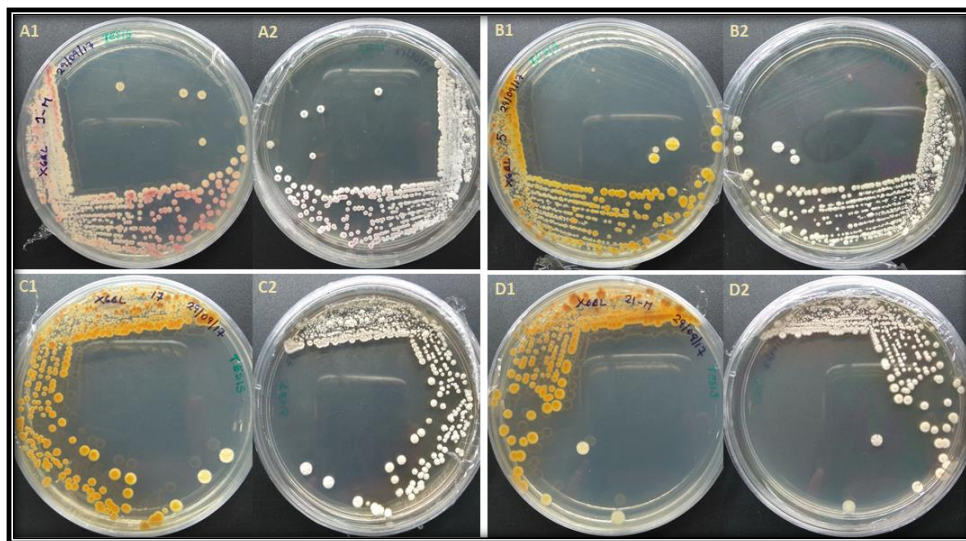
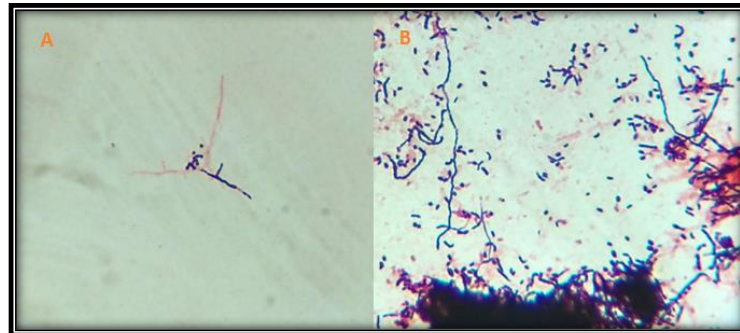


Figura 5. Morfología de las cepas de *Streptomyces* en medio sólido XGAL. Se muestra la vista desde arriba del agar (1) y debajo del agar (2). 'A', cepa E1; 'B', cepa 21; 'C', cepa K1B y 'D', cepa AB5.

La caracterización microscópica se realizó mediante la tinción GRAM observada en microscopio de luz a 1000X de aumento. Las cepas presentaron tinción GRAM positiva, filamentos de origen ramificado, bacilos sueltos y concatenados, y pequeñas esporas circulares. La Figura 6 muestra a la cepa K1B.



*Figura 6. Tinción GRAM de cepa K1B.*

## 1.2 Resultado de las pruebas bioquímicas

Todas las cepas presentaron la enzima catalasa y solo la Cepa E1 contiene la enzima oxidasa. Las cepas K1B, AB5 y 21 produjeron amilasas. En la prueba de TSI, las cepas 21 y K1B produjeron gas; sin embargo, ninguna fue capaz de fermentar alguno de los sustratos (glucosa, lactosa o sacarosa). Todas las cepas pudieron descarboxilar la lisina a excepción de la cepa K1B que no creció. Ninguna de las cepas presentó gelatinasa ni ureasa. Ninguna utilizó citrato como fuente de carbono. El resumen de las pruebas se observa en la Tabla 3. La notación ‘+’ se refiere a la presencia de la enzima; la notación ‘-’, a la ausencia de la enzima; la notación ‘k’, a la alcalinización del medio y la notación ‘Nc’, a que no hubo crecimiento por parte de la cepa.



*Tabla 3. Resultados de los ensayos bioquímicos de las cepas de Streptomyces.*

|            | <b>CAT</b> | <b>OXI</b> | <b>AMI</b> | <b>TSI</b> | <b>LIA</b> | <b>CIT</b> | <b>GEL</b> | <b>URE</b> |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>E1</b>  | +          | +          | -          | k/k        | +          | -          | -          | -          |
| <b>21</b>  | +          | -          | +          | k/k/gas    | +          | -          | -          | -          |
| <b>K1B</b> | +          | -          | ++         | k/k/gas    | Nc         | -          | -          | -          |
| <b>AB5</b> | +          | -          | ++         | k/k        | +          | -          | -          | -          |

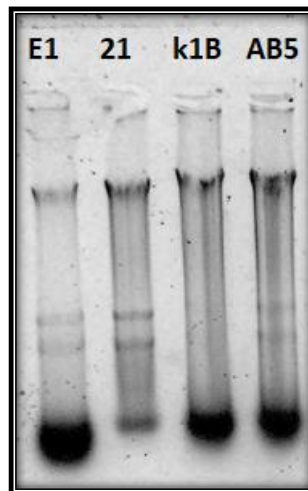
La fermentación de sustratos de carbono se observó por el viraje de color del medio a rojo (pH menor a 5). La cepa E1 y AB5 fermentaron glucosa. La cepa AB5 no creció ni en arabinosa ni en rafinosa. Las demás cepas no fermentaron ningún sustrato, a pesar de que mostraron crecimiento. La cepa K1B produjo pigmento externo de color marrón. La Tabla 4 muestra el resumen de los resultados.

*Tabla 4. Resultados de la utilización de hidratos de carbono.*

| <b>Cepa</b> | <b>Glu</b> | <b>Man</b> | <b>Mel</b> | <b>Ara</b> | <b>Raf</b> | <b>Fru</b> | <b>Myo</b> | <b>Rha</b> | <b>Suc</b> | <b>Xyl</b> |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>E1</b>   | +          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          |
| <b>21</b>   | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          |
| <b>K1B</b>  | -          | - (M)      | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          | -          |
| <b>AB5</b>  | +          | -          | -          | Nc         | Nc         | -          | -          | -          | -          | -          |

### 1.3 Resultado de la extracción de ADN

La calidad de la extracción del ADN, se observó mediante la electroforesis de las muestras, tomando 5  $\mu\text{L}$  de cada una más 1  $\mu\text{L}$  del buffer de carga. La Figura 7 muestra bandas del ADN cromosómico de un tamaño mayor a 10000 pares de bases (pb) y bandas de menor tamaño posiblemente ARN o ADN fragmentado. Además se cuantificó la concentración de ADN obtenido con Nanodrop, obteniéndose las siguientes concentraciones: 460  $\text{ng}/\mu\text{L}$  para la cepa E1, 378  $\text{ng}/\mu\text{L}$  para la cepa 21, 379  $\text{ng}/\mu\text{L}$  para la cepa K1B y 351  $\text{ng}/\mu\text{L}$  para la cepa AB5.



*Figura 7. Fotografía del gel de electroforesis del ADN extraído.*

### 1.4 Resultado de la amplificación por PCR

La amplificación se comprobó por un gel de electroforesis de agarosa. Se tomó 8  $\mu\text{L}$  de la reacción, se diluyó con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (Anexo 1) y se procedió a cargar en un gel de agarosa. También se cargó en un carril 3  $\mu\text{L}$  del marcador de

ADN que ya contenía buffer de carga incorporado y en otro carril 3  $\mu$ L de la muestras con ADN genómico más 1  $\mu$ L de buffer de carga (previamente se le adicionó 5 $\mu$ l de RNAsa A para eliminar el ARN presente). La Figura 8 muestra la ubicación de las bandas en el gel. El tamaño de las bandas que corresponden al cromosoma están por encima de los 10000 pares de bases, mientras que las bandas del producto de la amplificación por PCR del gen *16S ARNr* se ubicaron entre 1500 y 2000 pb. La notación ‘M’ se refiere al marcador de ADN; la notación ‘c-’, al control de PCR sin ADN molde y la notación ‘p’, al producto del PCR obtenido.

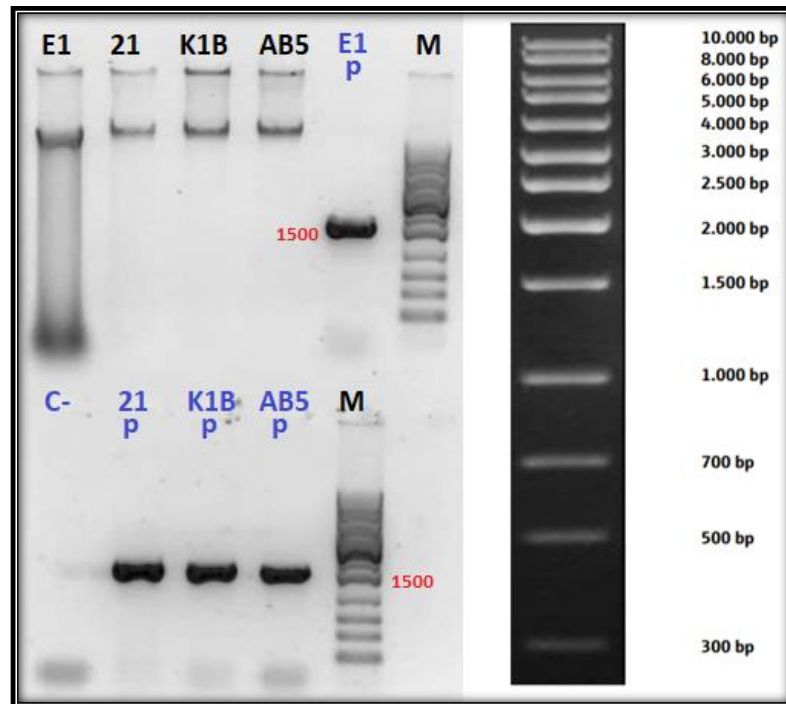


Figura 8. Fotografía del gel de electroforesis del producto de PCR del gen *16S ARNr*.

Los productos de PCR generados del gen de *gyrB* presentaron tamaños de aproximadamente 1000 y 1500 pares de base como se muestra en la Figura 9. La notación ‘M’ se refiere al marcador de ADN.

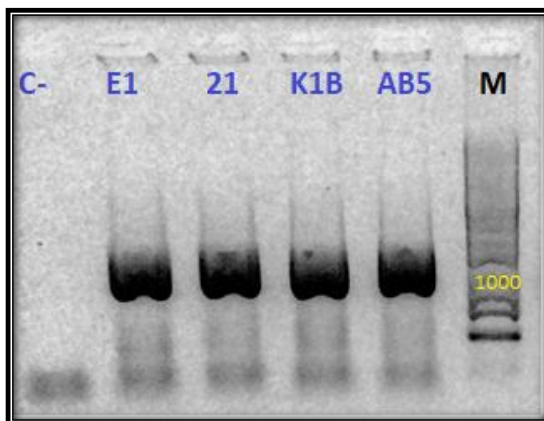


Figura 9. Fotografía del gel de electroforesis del producto de PCR del gen *gyrB*.

### 1.5 Resultado de la purificación de los productos de PCR

La calidad de los productos de PCR purificados para ambos genes se muestra en la Figura 10. La Tabla 5 presenta las concentraciones y relación de pureza para ambos genes usando Nanodrop.

Tabla 5. Resultados de la medición de la concentración de los productos de PCR purificados.

| Cepa       | Gen <i>16S ARNr</i> |         | Gen <i>gyrB</i> |         |
|------------|---------------------|---------|-----------------|---------|
|            | Concentración       | 260/280 | Concentración   | 260/280 |
| <b>E1</b>  | 259 ng/μL           | 1.84    | 207 ng/μL       | 1.85    |
| <b>21</b>  | 218 ng/μL           | 1.84    | 210 ng/μL       | 1.8     |
| <b>K1B</b> | 178 ng/μL           | 1.84    | 248 ng/μL       | 1.8     |
| <b>AB5</b> | 196 ng/μL           | 1.84    | 262 ng/μL       | 1.78    |

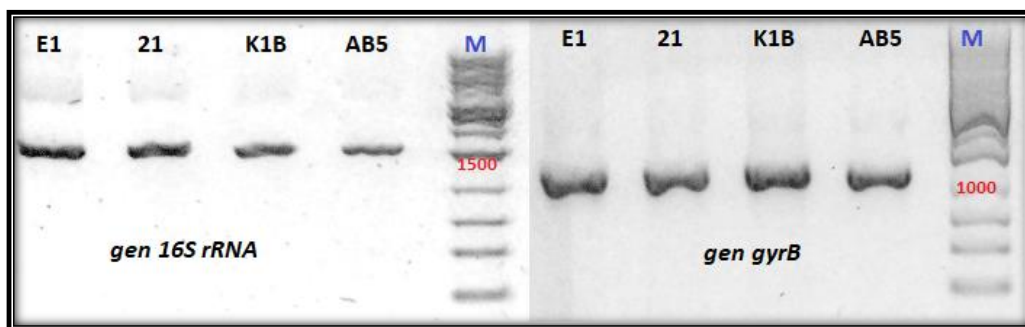


Figura 10. Fotografía del gel de electroforesis de la purificación de los productos de PCR de los genes 16S ARNr y de gyrB de las cepas de *Streptomyces*.

### 1.6 Resultado del análisis filogenético de las secuencias de los genes *16S ARNr* y *gyrB*

Las cepas 21, K1B y AB5 fueron analizadas en un trabajo previo utilizando los primers 8F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'); y depositadas en el GenBank bajo los códigos *S. variabilis* cepa KY609136.1, *S. thermocarboxidus* cepa KY628829.1 y *S. variabilis* cepa KY608897.1 respectivamente (Pacheco-Huertas, 2016).

En este trabajo, se obtuvieron secuencias del gen *16S ARNr* de tamaños de 1088 pb, 1336 pb, 1100 pb y 1320 pb para las cepas E1, 21, K1B y AB5 respectivamente. Para el caso de las secuencias del gen *gyrB* se obtuvieron tamaños de 975 pb, 820 pb, 985 pb y 906 pb para las cepas E1, 21, K1B y AB5 respectivamente. Las secuencias obtenidas de la amplificación del gen *gyrB* presentaron 60% de contenido GC. Las secuencias fueron editadas y ensambladas antes de realizar el blast usando la base de datos del GenBank. De las secuencias alineadas en el GenBank, se escogieron para el gen *16S ARNr*, las especies *S. hyderabadensis* OU-

40 y *S. diastaticus subsp ardesiacus* NBRC 15402 alineadas con 99% de identidad a la cepa E1; y las especies *S. variabilis* NRLB 3984 y *S. griseoincarnatus* LMG 19316 con 100% de identidad para las cepas 21, K1B y AB5. Por otro lado, para el gen *gyrB* no se encontró ninguna especie cuya secuencia contuviera una identidad mayor o igual al 97% para la cepa E1. Se escogió la secuencia para el gen *gyrB* de la especie *S. variabilis* ARRS001 que se alineó con 98% de identidad con las cepas 21, K1B y AB5. El alineamiento se realizó con las especies escogidas y las cepas de este estudio. Además se utilizó a *E. coli* como especie fuera de grupo con sus respectivas secuencias para cada gen.

Previamente al alineamiento, se comprobó que ninguna secuencia estuviese invertida. Las Figuras 11, 12 y 13 corresponden al árbol filogenético del gen *16S ARNr*, del gen *gyrB* y de los genes concatenados respectivamente.

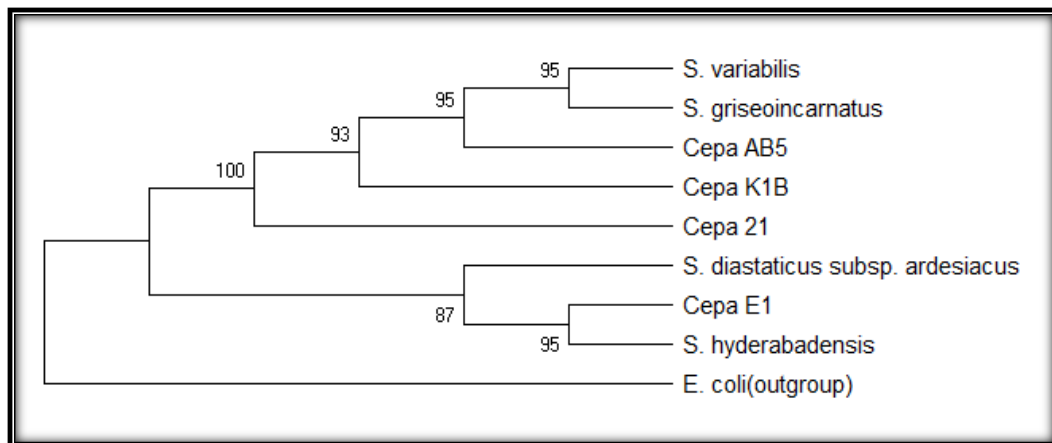


Figura 11. Árbol filogenético de las secuencias para el gen *16S ARNr*.

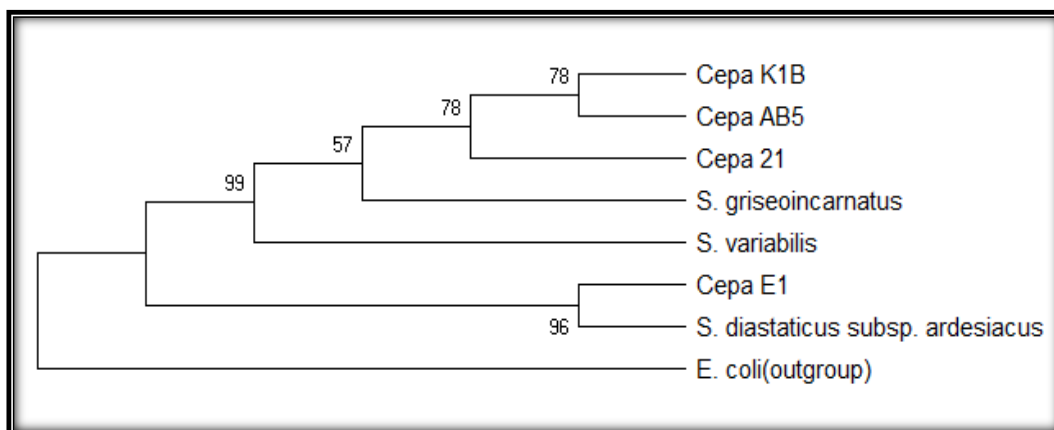


Figura 12. Árbol filogenético de las secuencias para el gen *gyrB*.

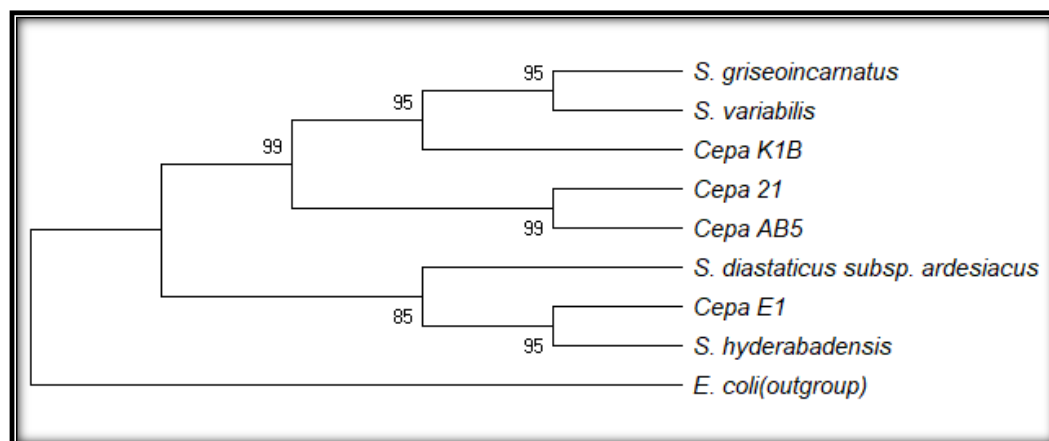


Figura 13. Árbol filogenético de las secuencias para los genes concatenados.

Los tres árboles filogenéticos muestran que la cepa E1 forma un grupo diferente a las cepas 21, K1B y AB5. Los números en cada rama representa el porcentaje de árboles en los cuales ocurren las asociaciones.

## V.2 Resultados de los ensayos de crecimiento a diferentes condiciones de pH, % de NaCl y temperatura

### 2.1 Resultado de la curva de calibración del método de Lowry

Se realizó la curva de calibración de proteínas totales usando el método modificado de Lowry por triplicado, Las absorbancias obtenidas para cada cantidad de proteína se muestran en la Tabla 6. La curva de calibración resultante dio un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.98 indicando un buen grado de correlación entre la cantidad de proteína total y la absorbancia medida.

La ecuación de correlación obtenida fue:

$$\text{Abs} = 0.0103 \times P + 0.0188$$

Donde,

Abs: absorbancia y P: proteína total en  $\mu\text{g}$

*Tabla 6. Resultados de la curva de calibración del método de Lowry modificado.*

| <b>Proteínas totales (<math>\mu\text{g}</math>)</b> | <b>Absorbancia 750 nm</b> |       |       | <b>Promedio</b> | <b>Promedio corregido</b> |
|---|---------------------------|-------|-------|-----------------|---------------------------|
| <b>0</b>  | 0.064                     | 0.041 | 0.042 | 0.049           | 0.000                     |
| <b>5</b>  | 0.184                     | 0.110 | 0.098 | 0.131           | 0.082                     |
| <b>10</b>   | 0.175                     | 0.175 | 0.172 | 0.174           | 0.125                     |
| <b>15</b>   | 0.239                     | 0.243 | 0.230 | 0.237           | 0.188                     |
| <b>20</b>   | 0.277                     | 0.265 | 0.274 | 0.272           | 0.223                     |
| <b>25</b>   | 0.324                     | 0.331 | 0.318 | 0.324           | 0.275                     |
| <b>30</b>   | 0.378                     | 0.347 | 0.377 | 0.367           | 0.318                     |



## 2.2 Resultado del ensayo de crecimiento a diferentes valores de pH

La cepa E1 presentó colonias de color rosado desde el pH 4 hasta el pH 7 en caldo ACL 1/10. La cepa 21 presentó colonias de color anaranjado a marrón a pH 7. La cepa K1B y la cepa AB5 produjeron pigmento externo, de color anaranjado a marrón a pH 7. Todas las cepas presentaron crecimiento filamentososo irregular en el medio.

La cepa K1B presentó bajo crecimiento en pH 2 y pH 3, aunque no fue suficiente para medir las proteínas totales de cada tratamiento. Para el análisis estadístico usando el test de Kruskal-Wallis se agruparon los resultados en: grupo 1 (pH 2, 3, 4) y grupo 2 (pH 5, 6 y 7). Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos 1 y 2 para cada cepa en cualquiera de los medios de cultivo. Todas las cepas crecieron en promedio 3 veces más en el grupo 2 con respecto al grupo 1. Además se analizó la diferencia de crecimiento en los dos medios de cultivo, obteniendo casi el doble de crecimiento en el medio XGAL con respecto al medio ACL, Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de crecimiento a diferentes valores de pH de las cepas de *Streptomyces*.

| Cepa     | Medio de cultivo | Promedio Proteínas totales<br>( $\mu\text{g}$ ) |          | p value |
|----------|------------------|---|----------|---------|
|          |                  | pH $\leq$ 4                                     | pH $>$ 4 |         |
| Cepa E1  | Medio XGAL       | 4   | 23.2     | 0.009   |
|          | Medio ACL        | 3.8   | 14.5     | 0.03    |
| Cepa 21  | Medio XGAL       | 4.9   | 17.3     | 0.004   |
|          | Medio ACL        | 4.5   | 9.6      | 0.004   |
| Cepa K1B | Medio XGAL       | 12.6  | 31       | 0.004   |
|          | Medio ACL        | 10.9  | 16.3     | 0.03    |
| Cepa AB5 | Medio XGAL       | 6.6   | 25.4     | 0.004   |
|          | Medio ACL        | 5.8   | 13.8     | 0.004   |

### 2.3 Resultado del ensayo de crecimiento a diferentes % NaCl

En el medio XGAL 1/10, la cepa E1 presentó colonias blancas y filamentosas de forma irregular de color blanco a excepción del medio con 5 % de NaCl que fue de color fucsia. En el medio ACL 1/10, la cepa E1 presentó colonias blancas a excepción del medio con 0 % y 5 % de NaCl que fue de color rosado. La cepa 21 presentó coloración anaranjado a marrón en el medio XGAL 1/10 a concentraciones de 5 % y 10 % de NaCl y en el medio ACL 1/10 en ausencia de NaCl. La cepa K1B presentó tonalidades de color beige a marrón en sus colonias para las concentraciones de 5 % y 10 % de NaCl en medio XGAL 1/10.

La cepa E1 no presentó diferencias significativas entre tratamientos con diferentes porcentajes de NaCl. Las cepas 21 y K1B tuvieron crecimiento casi 7 veces más a 5 % y 10 % de NaCl en medio XGAL con respecto a los mismos porcentajes de NaCl en medio ACL ( $p < 0.02$ ) y crecieron 5 veces más a % 5 y 10% de NaCl con respecto a 0% y 15% de NaCl. La cepa AB5 creció casi 4 veces más a 5 % y 10 % de NaCl con respecto a los mismos porcentajes de NaCl en medio ACL ( $p < 0.02$ ) y creció casi 3 veces más a 5 % y 10 % de NaCl con respecto a 0 % y 15 % de NaCl, Tabla 8.

*Tabla 8. Resultados de crecimiento a diferentes % NaCl de las cepas de Streptomyces.*

| Cepa     | Medio de cultivo | Promedio Proteínas totales<br>( $\mu\text{g}$ ) |                       | p value    |
|----------|------------------|---|-----------------------|------------|
|          |                  | 0 % y 15 %<br>NaCl                              | 5 % y 10 %<br>de NaCl |            |
| Cepa E1  | Medio XGAL       | 11.3  | 16                    | $p > 0.05$ |
|          | Medio ACL        | 13.2  | 16.4                  | $p > 0.05$ |
| Cepa 21  | Medio XGAL       | 9.6   | 47.6                  | 0.02       |
|          | Medio ACL        | 7.6   | 9.2                   | $p > 0.05$ |
| Cepa K1B | Medio XGAL       | 9.2   | 46.6                  | 0.02       |
|          | Medio ACL        | 8.8   | 7.6                   | $p > 0.05$ |
| Cepa AB5 | Medio XGAL       | 15.8  | 42                    | 0.02       |
|          | Medio ACL        | 8.1   | 12.5                  | $p > 0.05$ |

#### 2.4 Resultado del ensayo de crecimiento a diferentes temperaturas

La cepa E1 presentó formación de colonias filamentosas de color blanco para el tratamiento de 28°C y 37°C. Las cepas 21, K1B y AB5 presentaron la formación de colonias filamentosas de color rojizo para los tratamientos con 28°C y 37°C y la

cepa AB5 produjo pigmento en estas temperaturas. Todas las cepas presentaron colonias puntiforme de color blanco a la temperatura de 50°C.

Todas las cepas mostraron buen crecimiento a temperatura de 28°C y en mayor medida a temperatura de 37°C en medio XGAL 1/10. Hubo diferencia significativa entre los medios utilizados para cada cepa ( $p < 0.05$ ), con mejor crecimiento para el medio XGAL 1/10, Tabla 9.

*Tabla 9. Resultados de crecimiento a diferentes temperaturas de las cepas de Streptomyces.*

| Cepa            | Promedio Proteínas totales<br>( $\mu\text{g}$ ) a 28°C y 37°C |           | p value |
|-----------------|---|-----------|---------|
|                 | Medio XGAL  | Medio ACL |         |
| <b>Cepa E1</b>  | 38.1  | 15.3      | 0.04    |
| <b>Cepa 21</b>  | 23.2  | 10.5      | 0.02    |
| <b>Cepa K1B</b> | 34.9  | 14.4      | 0.02    |
| <b>Cepa AB5</b> | 28.8  | 14.1      | 0.02    |

### V.3 Resultados de los posibles mecanismos presentes en la lixiviación

#### 3.1 Resultados de la capacidad de óxido – reducción

La oxidación del medio que contiene  $\text{FeSO}_4$  se observa como el viraje al color amarillo. Las cepas no oxidaron el ión ferroso del medio a ninguna de las concentraciones en estudio. Solo se observó precipitación del metal en las concentraciones de 1 y 5 g/L, como se observa en la Figura 14 para la cepa AB5. Todas las cepas redujeron el ión férrico a partir de la concentración de 2 g/L de

Fe<sup>3+</sup>, Tabla 10. La notación ‘-’ se refiere a que fue negativo tanto para la oxidación como para la reducción y la notación ‘+’, que fue positivo. Las cepas crecieron en todos los tratamientos. No se pudo medir proteínas totales por el método de Lowry ya que este método sobre-estimó los valores de proteínas ya que reacciona con el ión Fe.

Tabla 10. Resultados de la capacidad de óxido - reducción

|            | Oxidación de Fe <sup>2+</sup> |       |       | Reducción de Fe <sup>3+</sup> |       |       |
|------------|-------------------------------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|
|            | 0.2 g/L                       | 1 g/L | 5 g/L | 1 g/L                         | 2 g/L | 5 g/L |
| <b>E1</b>  | -                             | -     | -     | -                             | +     | +     |
| <b>21</b>  | -                             | -     | -     | -                             | -     | +     |
| <b>K1B</b> | -                             | -     | -     | -                             | -     | +     |
| <b>AB5</b> | -                             | -     | -     | -                             | -     | +     |

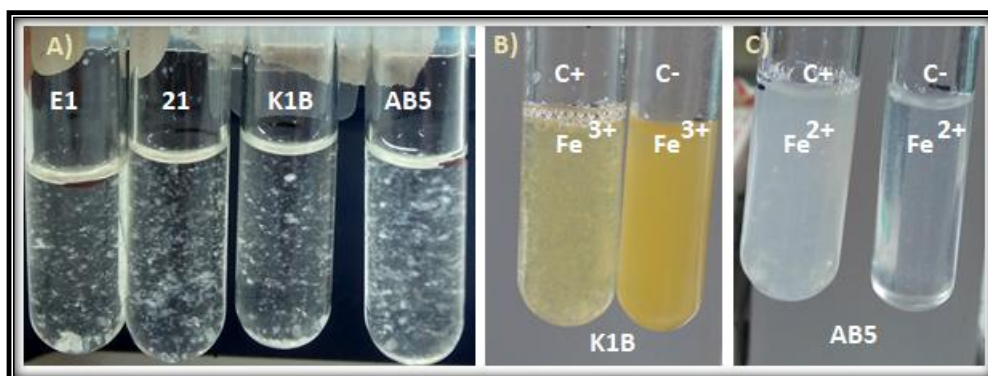


Figura 14. Fotografía de la capacidad de óxido – reducción de las cepas de *Streptomyces*.

### 3.2 Resultado del ensayo de producción de sideróforos

La presencia de sideróforos se observó por medio de la formación de halos de color naranja alrededor de la colonia, independientemente del medio en el cual fue sembrado el inóculo (XGAL o ACL). El halo formado se produjo cuando los sideróforos capturaron el ión férrico del medio. Se tomó como control negativo a *E. coli* que no produjo sideróforos y como control positivo a *B. subtilis*; sin embargo, no creció, posiblemente por algún inhibidor dentro del medio CAS. Se utilizó un inóculo correspondiente a 0.26, 0.46, 0.47, 0.41  $\mu\text{g}$  de proteínas totales de las cepas E1, 21, K1B y AB5 respectivamente. Se midió el diámetro del halo formado (Figura 15), obteniéndose para el caldo XGAL, 4.2 cm para la cepa E1, 2.2 cm para la cepa 21 y K1B y 2.7 cm para la cepa AB5. Mientras que para el caldo ACL, 4.1 cm para la cepa E1, 2.5 cm para la cepa 21 y K1B y 2.2 cm para la cepa AB5. A pesar que no hubo réplicas de las siembras, se resalta el hecho que la cepa E1 produjo casi el doble de diámetro de halo que las otras cepas.

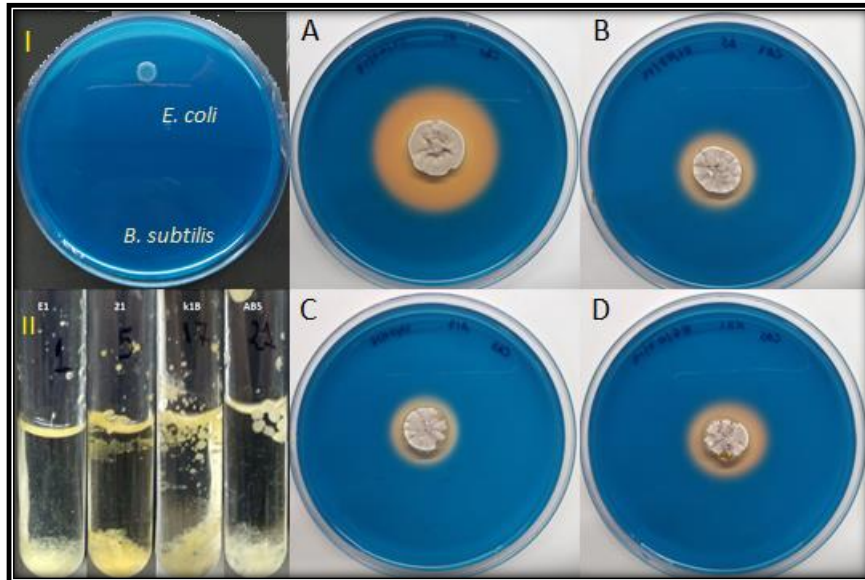


Figura 15. Fotografía de la producción de sideróforos A, cepa E1; B, cepa Z1; C, cepa K1B; D, cepa AB5; I, *E. coli* (C-) y *B. subtilis* (C+, no creció) y II, inóculo de las cepas en medio XGAL.

#### V.4 Resultados de los ensayos de Lixiviación

##### 4.1 Resultado del ensayo de pre-selección de cepas según su capacidad de disolución de arsénico.

En los ensayos anteriores se determinaron las condiciones mínimas de pH y temperatura cercanas a un proceso minero de oro. La adición de NaCl evita la formación de complejo del oro con materia orgánica y ayuda a la extracción final del oro. Las condiciones escogidas fueron: 28°C, 5 % de NaCl y pH 5. Este ensayo evaluó la capacidad de las cepas para disolver arsénico bajo las condiciones escogidas en diferentes medios de cultivo. El inóculo para el inicio del ensayo de cada cepa correspondió a 500 µg de proteínas totales. La cepa K1B aparentemente disolvió 80% más de arsénico en medio XGAL 1/10 en comparación con las otras

cepas. Las cepa AB5 y K1B aparentemente disolvieron 10% más de arsénico que el control y 58% más que las otras cepas en medio ACL 1/10 , Tabla 11. También se observó que los microorganismos que sobrevivieron a la esterilización del mineral en medio ACL 1/10 disolvieron aparentemente 70% más arsénico con respecto al medio XGAL 1/10.

*Tabla 11. Resultados del ensayo de pre-selección de cepas en mineral.*

| <b>Medio de cultivo</b> | <b>Cepa</b> | <b>Promedio de As disuelto (mg/mL)</b> |
|-------------------------|-------------|--|
| <b>XGAL 1/10</b>        | Control     | 10.13                                  |
|                         | E1          | 8.50                                   |
|                         | 21          | 12.94                                  |
|                         | K1B         | 18.22                                  |
|                         | AB5         | 10.29                                  |
| <b>ACL 1/10</b>         | Control     | 17.30                                  |
|                         | E1          | 9.94                                   |
|                         | 21          | 12.59                                  |
|                         | K1B         | 19.30                                  |
|                         | AB5         | 19.38                                  |

#### 4.2 Resultados del ensayo de lixiviación

El ensayo de pre selección permitió escoger las cepas con un mayor grado de disolución de arsénico para cada medio de cultivo: la cepa K1B con el medio XGAL 1/10 y la cepa AB5 con el medio ACL 1/10. Los medios contenían 5% de NaCl y se encontraron a pH 5. Las condiciones de incubación fueron de 28°C, 150 rpm de



agitación y por 30 días. El inóculo inicial de las cepas K1B y AB5 correspondió a 400 µg de proteínas totales. Una vez terminado el periodo de incubación se observaron abundantes colonias en los tratamientos con cepas. El pH final del ensayo fue de 2. La tinción GRAM permitió comprobar, la presencia de las cepas de *Streptomyces* en estudio (presencia de filamentos) finalizado el ensayo. También se encontraron levaduras en los tratamientos de mineral no estéril, siendo mayor su presencia en medio líquido ACL 1/10; bacilos cortos y bacilos espiralados. El tratamiento con mineral estéril con alcohol aún mostraba microorganismos propios del mineral pero en muy bajas proporciones con respecto al mineral no estéril.

El porcentaje de arsénico extraído se calculó teniendo en cuenta que la concentración de arsénico es de 16.90 g/Kg de arsenopirita. En la Tabla 12 se muestra que no hay diferencia significativa entre los tratamientos para el ensayo de lixiviación con el medio líquido XGAL 1/10 ni el medio ACL 1/10. La notación NE corresponde a mineral no estéril, E corresponde al mineral estéril y C al control sin cepas. En el control no estéril, el medio ACL 1/10 extrajo aparentemente 1 punto más de arsénico que el medio XGAL 1/10.

*Tabla 12. Promedio del porcentaje de arsénico extraído del mineral en el ensayo de lixiviación.*

| <b>Cepas</b> | <b>Arsénico extraído (%)</b> |           |                |               |
|--------------|------------------------------|-----------|----------------|---------------|
|              | <b>CNE</b>                   | <b>CE</b> | <b>Cepa NE</b> | <b>Cepa E</b> |
| Cepa K1B     | 1.99                         | 1.71      | 1.95           | 2.09          |
| Cepa AB5     | 2.96                         | 2.25      | 2.82           | 2.42          |

CNE: Control con mineral no estéril

CE: control con mineral estéril

NE: mineral no estéril

E: mineral estéril

## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron cuatro cepas bacterianas con los siguientes códigos de laboratorio: E1, 21, K1B y AB5. La formación de micelio vegetativo con pigmento, micelio aéreo y esporas, y su tinción GRAM positivo (Tablas 1,2 y 3) permitieron la identificación de las cepas dentro del género *Streptomyces* (Whitman et al., 2012). De la misma manera, su identificación genotípica usando los genes *16S ARNr* y *gyrB* lo ubican en dicho género.

Los *Streptomyces* son heterótrofos que utilizan compuestos de carbono para producir energía liberando CO<sub>2</sub> en el proceso (Rawlings & Johnson, 2007). En la prueba bioquímica de triple azúcar- hierro (TSI), la cepa E1 y la cepa AB5 no fermentaron glucosa, lactosa ni sacarosa, Tabla 3. La lectura de esta prueba se llevó a cabo después de una semana de incubación por el lento crecimiento de las cepas; sin embargo la literatura especifica que las pruebas deben realizarse máximo a las 24 horas para tener un resultado verdadero (Buckley et al., 2015). La prueba de utilización de hidratos de carbono permitió observar la capacidad fermentativa de estos compuestos después de una semana de incubación. Las cepas E1 y AB5 solo fermentaron glucosa, de los 10 hidratos de carbono, Tabla 4.

La identificación común de bacterias del género *Streptomyces* se basa en las características de crecimiento, formación de pigmentos y esporas según el medio de cultivo usado, además de la utilización de diferentes fuentes de carbono (Whitman et al., 2012). La información obtenida en este estudio de dicha

caracterización se comparó con la información en el manual de Bergey's (Whitman et al., 2012) y el libro de Procariontes (Dworkin et al., 2006), sin llegar a una identificación hasta especie de las cepas.

La identificación genotípica se realizó empleando los genes *16S ARNr* y *gyrB*. En un trabajo previo, la identificación de las mismas cepas se realizó usando los primers 8F y 1492R para el gen *16S ARNr* (Pacheco-Huertas, 2016); sin embargo, al comparar los resultados no se encontró concordancia completa con la caracterización fenotípica según el manual de Bergey's y el libro de Procariontes (Dworkin et al., 2006; Whitman et al., 2012). Debido a ello, en este estudio se emplearon los primers, 27F y 1525R para la amplificación de la región del gen *16S ARNr*.

El análisis filogenético usando las secuencias obtenidas de la amplificación de los genes *16S ARNr* y *gyrB* mostró que las cepas se asociaron en dos grupos, el primero que contenía a las cepas 21, K1B y AB5 y el segundo a la cepa E1 (Figura 11, 12 y 13). Esto concuerda con las características fenotípicas observadas de crecimiento macroscópico, donde la cepa E1 produjo esporas de color blanco a los 13 días y luego esporas de color gris; además presentó pigmentación de color fucsia en su estructura vegetativa en medio sólido XGAL. En cambio, las cepas 21, K1B y AB5 presentaron pigmentación de color crema a rojizo-marrón en su estructura vegetativa, pigmentación rojiza extracelular y esporas de color gris.

El grupo filogenético que contenía a las cepas K1B, 21 y AB5 también contenía a las especies *S. variabilis* y *S. griseoincarnatus*. La especie *S. variabilis* no produce pigmento extracelular (Whitman et al., 2012) como es el caso de estas cepas en el mismo medio de cultivo. La especie *S. griseoincarnatus* tiene pigmentación amarillenta a rojiza en su micelio vegetativo y es capaz de producir pigmentos extracelulares de un color rojizo utilizando medios sólidos de cultivo diferentes a los usados en este estudio (Whitman et al., 2012). La producción de pigmento es útil en la identificación de *Streptomyces* siempre y cuando se sigan las mismas condiciones de crecimiento.

El grupo filogenético que contenía a la cepa E1 también contenía a las especies *S. hyderabadensis* y *S. diastaticus* subsp. *ardesiacus*. Comparándolas, éstas no coincidieron con la caracterización fenotípica ni bioquímica ni en la fermentación de hidratos de carbono por parte de la cepa E1. Como se aprecia en los resultados, es muy difícil la identificación de este género por tener un genoma complejo y ser muy diverso; a pesar de ello, la utilización de otros genes multilocus podrían mejorar la resolución en la identificación (Guo et al., 2008).

Las condiciones del ensayo de lixiviación se escogieron teniendo en cuenta el crecimiento de las cepas a condiciones cercanas a un proceso minero. El pH del mineral de arsenopirita es aproximadamente 2. La temperatura de proceso de lixiviación se realiza a temperatura ambiente y solo adicionando cianuro como disolvente (Yanacocha, 2019). El valor de pH 7 es el de crecimiento óptimo para las cepas en estudio; sin embargo, llevar el mineral a dicho pH requiere adición de

soluciones básicas, aumentando costos y generando más problemas en el medio ambiente, por eso se escogió el pH mínimo de crecimiento moderado, pH 5, Tabla 7. Del mismo modo, la temperatura óptima de crecimiento de las cepas fue de 37 °C, a pesar de ello, se escogió la temperatura de 28 °C (Tabla 8) por estar cercana a la temperatura de procesos de lixiviación en mina. También se añadió 5% de NaCl ya que esta sal forma complejos con el oro (Dutrizac & MacDonald, 1971) y evita la formación no deseada de complejos con la materia orgánica.

El ensayo de pre selección de cepas en mineral permitió escoger los medios de cultivo y las cepas para el ensayo de lixiviación, XGAL para la cepa K1B y ACL para la cepa AB5. En el ensayo de lixiviación, las cepas K1B y AB5 no mostraron diferencias para ningún tratamiento. Se realizó tinción Gram a los medios con el mineral y se observó la presencia de bacilos cortos espiralados, bacilos cortos y levaduras. Estos microorganismos propios del mineral estarían efectuando la lixiviación del arsénico como se observó en otros estudios (Liu et al., 2017). Además, se observó que el medio ACL 1/10 mejora aparentemente en un 50% la lixiviación por las bacterias propias del mineral en comparación del medio XGAL 1/10, Tabla 12. En un estudio previo con las cepas en estudio se logró una extracción del 16% de arsénico bajo otras condiciones (Ugarte, 2016).

Las cepas presentaron hipervariabilidad en la producción de pigmentos, lo cual puede explicar otras características fenotípicas que están gobernadas por esta inestabilidad genética. La inestabilidad genética en *Streptomyces* se debe a los genes regulatorios pleiotrópicos, es decir, que la expresión de estos genes se observa

en características fenotípicas diferentes (Leblond et al., 1990). Esta inestabilidad se debe a la delección, amplificación y cambios en regiones extensas de ADN, lo que se traduce en pleiotropismo, es decir, en la expresión diferente de un mismo gen (Leblond et al., 1990). Se ha visto que esta hipervariabilidad afecta la producción de enzimas y de antibióticos en bacterias del género de *Streptomyces* (Hütter et al., 1988). Es posible que esta hipervariabilidad explique las diferencias encontradas en el crecimiento en medio sólido y los resultados obtenidos en el ensayo de lixiviación.

Las cepas en estudio demostraron resistencia a la presencia metales pesados durante el proceso de lixiviación. Se sabe que los *Streptomyces* utilizan estrategias para tolerar los metales pesados como por ejemplo, la acumulación de cromo (Amoroso et al., 2001) o la biosorción de plomo y uranio (Golab et al., 1991). También, se han encontrado especies de este género en relaves mineros (Drewniak et al., 2008; Matsubara & Hurtado, 2013; Pacheco-Huertas, 2016; Ugarte, 2016). Esta resistencia está asociada a la relación simbiótica con plantas (Shi et al., 2013). Las cepas del presente estudio han demostrado tolerar hasta 166 mg/L de arsénico (Ugarte, 2016), pudiendo deberse a la presencia de genes similares a los del *operón ars* (Cervantes et al., 1994; Oremland & Stolz, 2003; Wang et al., 2006), los cuales reducen el arsenato en arsenito y lo transportan al exterior de las bacterias.

Las cepas soportaron pH 2, valor final del proceso de lixiviación. La tolerancia a pH ácidos puede deberse a las bombas de protones ubicados en la membrana plasmática que se encargan del eflujo de iones de hidrógeno y activan la producción

de metabolitos involucrados bajo estrés de pH (Kim et al., 2008). También demostraron tolerar altas concentraciones de NaCl, Tabla 8. Una estrategia de tolerancia a la alta salinidad puede ser la modificación del dominio N-terminal en las enzimas (Uraji et al., 2007) o a la producción de enzimas proteasas intra o extracelulares como Lon y Clp, que eliminan más eficazmente las proteínas no funcionales en *Streptomyces* (Sadeghi et al., 2014).

Las cepas demostraron poseer mecanismos que pueden estar relacionados directa o indirectamente en el proceso de lixiviación. Uno de los mecanismos es la producción de sideróforos, los cuales actúan directamente en la disolución de arsénico en minerales como escorodita (Drewniak et al., 2008), Figura 15. Por otro lado, los microorganismos lixiviantes de minerales sulfurados reducen el ión férrico y el ión ferroso resultante lo usan como fuente de energía (Mahmoud et al., 2017). En este estudio las cepas demostraron reducir el ión férrico (Figura 14), que podría ser utilizado como fuente de energía por los microorganismos propios del mineral en el proceso de lixiviación.



## VII. CONCLUSIONES

Las cepas E1, 21, K1B y AB5 produjeron las enzimas amilasa, catalasa y solo la cepa E1 produjo oxidasa. Solo las cepas E1 y AB5 fermentaron glucosa. La cepa E1 produjo pigmento interno de color fucsia y las cepas 21, K1B y AB5 produjeron pigmento interno y externo de color rojizo.

El árbol filogenético separó a las cepas de *Streptomyces* según la secuencia de sus genes *16S ARNr* y *gyrB*, en dos grupos. El primero contenía las cepas 21, K1B y AB5 y el segundo contenía a la cepa E1. La especie *S. griseoincarnatus* fue similar en 95% al grupo de las cepas 21, K1B y AB5, mientras que la especie *S. hyderabadensis* fue similar en 95% al grupo de la cepa E1.

Las cepas E1, 21, K1B y AB5 tuvieron crecimiento moderado a partir de pH 5, temperatura de 28°C y concentración de 5% de NaCl.

La lixiviación realizada por las cepas K1B y AB5 fue igual al control, extrayendo el 2% de arsénico bajo las condiciones encontradas en este trabajo.

Las cepas E1, 21, K1B y AB5 produjeron sideróforos captadores de ión férrico y presentaron la capacidad de reducción del mismo ión.

## VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar ensayos de lixiviación, considerando las siguientes variables: concentración de las cepas usadas en este estudio, condiciones de aeración y diferentes metodologías de esterilización. También se recomienda estudios de identificación, utilizando otros genes involucrados en el mantenimiento celular.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. D. (2016). *Gold Ore Processing: Project Development and Operations*. Elsevier.
- Amankwah, R. K., Yen, W.-T., & Ramsay, J. A. (2005). A two-stage bacterial pretreatment process for double refractory gold ores. *Minerals Engineering*, 18(1), 103–108.
- Amoroso, M. J., Castro, G. R., Durán, A., Peraud, O., Oliver, G., & Hill, R. T. (2001). Chromium accumulation by two *Streptomyces spp.* Isolated from riverine sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 210–215.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quifones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 215–237.
- Anthony, J., Bideaux, R., Bladh, K., & Nichols, M. (2003). *Handbook of Mineralogy: Vol. Volumn I*. Mineralogical Society of America. Recuperado de: <http://www.handbookofmineralogy.org/>
- Buckley, D. H., Madigan, M. T., Bender, D. A., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Bender, K. S. (2015). *Brock, biología de los microorganismos, 14ª Edición*. Pearson Educación.
- Cervantes, C., Ji, G., Ramírez, J. L., & Silver, S. (1994). Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 15(4), 355–367.
- Chater, K. F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*, 5.
- Dertz, E. A., Stintzi, A., & Raymond, K. N. (2006). Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(8), 1087–1097.

- Drewniak, L., Styczek, A., Majder-Lopatka, M., & Sklodowska, A. (2008). Bacteria, hypertolerant to arsenic in the rocks of an ancient gold mine, and their potential role in dissemination of arsenic pollution. *Environmental Pollution*, *156*(3),
- Dutrizac, J. E., & MacDonald, R. J. C. (1971). The effect of sodium chloride on the dissolution of chalcopyrite under simulated dump leaching conditions. *Metallurgical and Materials Transactions B*, *2*(8), 2310–2312.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (Eds.). (2006). *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria* (3a ed.). Springer-Verlag.
- Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Franson, M. A. H., Rice, E. W., & Greenberg, A. E. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. American Public Health Association.
- Elbehti, A., Basseur, G., & Lemesle-Meunier, D. (2000). First Evidence for Existence of an Uphill Electron Transfer through the bc 1 and NADH-Q Oxidoreductase Complexes of the Acidophilic Obligate Chemolithotrophic Ferrous Ion-Oxidizing Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, *182*(12), 3602–3606.
- Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008). Critical Evaluation of Two Primers Commonly Used for Amplification of Bacterial *16S rRNA* Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(8), 2461–2470.
- Golab, Z., Orłowska, B., & Smith, R. W. (1991). Biosorption of lead and uranium by *Streptomyces* sp. *Water, Air, and Soil Pollution*, *60*(1), 99–106.
- Guo, Y., Zheng, W., Rong, X., & Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus 16S rRNA* gene clade: Use of multilocus sequence analysis

- for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 149–159.
- Gutierrez, L. (2017). *Estudio del tratamiento de minerales sulfurados auríferos mediante procesos secuenciales de flotación, lixiviación alcalina, biolixiviación y cianuración para la recuperación de oro*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Hütter, R., Eckhardt, T., Goodfellow, M., Williams, S., & Mordarski, M. (1988). *Actinomycetes in Biotechnology*.
- Kalinowski, B. E., Liermann, L. J., Givens, S., & Brantley, S. L. (2000). Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: A review of problems and approaches. *Chemical Geology*, 169(3), 357–370.
- Karthikeyan, O. P., Rajasekar, A., & Balasubramanian, R. (2015). Bio-Oxidation and Biocyanidation of Refractory Mineral Ores for Gold Extraction: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(15), 1611–1643.
- Kasai, H., Watanabe, K., Gasteiger, E., Bairoch, A., Isono, K., Yamamoto, S., & Harayama, S. (1998). Construction of the *gyrB* Database for the Identification and Classification of Bacteria. *Genome Informatics*, 9, 13–21.
- Kim, Y. J., Song, J. Y., Hong, S. K., Smith, C. P., & Chang, Y. K. (2008). Effects of pH shock on the secretion system in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(4), 658–662.
- Kraemer, S. M., Butler, A., Borer, P., & Cervini-Silva, J. (2005). Siderophores and the Dissolution of Iron-Bearing Minerals in Marine Systems. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 59(1), 53–84.

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Labeda, D. P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A. C., Lanoot, B., Vannanneyt, M., Swings, J., Kim, S.-B., Liu, Z., Chun, J., Tamura, T., Oguchi, A., Kikuchi, T., Kikuchi, H., Nishii, T., Tsuji, K., Yamaguchi, Y., Tase, A., Takahashi, M., ... Hatano, K. (2012). Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101(1), 73–104.
- Leblond, P., Demuyter, P., Simonet, J. M., & Decaris, B. (1990). Genetic instability and hypervariability in *Streptomyces ambofaciens*: Towards an understanding of a mechanism of genome plasticity. *Molecular Microbiology*, 4(5), 707–714.
- Liu, J., Wu, W., Zhang, X., Zhu, M., & Tan, W. (2017). Adhesion properties of and factors influencing *Leptospirillum ferriphilum* in the biooxidation of refractory gold-bearing pyrite. *International Journal of Mineral Processing*, 160, 39–46.
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education : JMBE*, 12(1), 51–53.
- Madigan, M. T. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. Pearson/Benjamin Cummings.
- Mahmoud, A., Cézac, P., Hoadley, A. F. A., Contamine, F., & D'Hugues, P. (2017). A review of sulfide minerals microbially assisted leaching in stirred tank reactors. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 118–146.
- Marsden, J., & House, I. (2006). *The Chemistry of Gold Extraction*. SME.
- Matsubara, A., & Hurtado, J. E. (2013). Isolation and Characterization of Actinomycetes from Acidic Cultures of Ores and Concentrates. *Advanced Materials Research*, 825, 406–409.

- Metodiev, S., Peytcheva, I., Kouzmanov, K., Dimitrova, D., Stefanova, E., & Dimitrov, D. (2016, noviembre 1). *QUANTITATIVE MINERALOGY AND GEOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF ORES FROM Au-Ag-W DEPOSITS, TRAN REGION, WESTERN BULGARIA: A COMBINED SEM, QEMSCAN AND LA-ICP-MS STUDY*. Comptes Rendus de l'Académie Bulgare Des Sciences. Recuperado de: <https://link.galegroup.com/apps/doc/A570688615/AONE?sid=lms>
- Milési, J. P., Ledru, P., Ankrah, P., Johan, V., Marcoux, E., & Vinchon, Ch. (1991). The metallogenic relationship between Birimian and Tarkwaian gold deposits in Ghana. *Mineralium Deposita*, 26(3), 228–238.
- MINEN Perú. (2019). *Anuario Minero 2018, Ministerio de Energía y Minas* (pp. 3–104). Ministerio de Energía y Minas.
- MINEN Perú. (2020). *Anuario Minero 2019, Ministerio de Energía y Minas* (pp. 10–142). Ministerio de Energía y Minas.
- Misari, F. S., & Jiménez, J. A. F. (1993). *Metalurgia del oro*. Centro de Estudios y Promoción en Ciencias de la Tierra.
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2015). Microbial derived surface active compounds: Properties and screening concept. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(7), 1001–1020.
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723–26726.
- Nicomrat, D., Dick, W., & Tuovinen, O. (2006). Assessment of the Microbial Community in a Constructed Wetland that Receives Acid Coal Mine Drainage | SpringerLink. *Microbial Ecology*, 51(1), 83–89.
- Oremland, R. S., & Stolz, J. F. (2003). The Ecology of Arsenic. *Science*, 300(5621), 939–944.

- Osborne, C. A., Galic, M., Sangwan, P., & Janssen, P. H. (2005). PCR-generated artefact from *16S rRNA* gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, *248*(2), 183–187.
- Pacheco-Huertas, S. (2016). *Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos en presencia de metales pesados*.
- Palomino, A., & Rojas, O. (2008). *Evaluación en la recuperación del oro y plata a partir de minerales sulfurados en una matriz de cuarzo*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Patel, P., Song, L., & Challis, G. L. (2010). Distinct Extracytoplasmic Siderophore Binding Proteins Recognize Ferrioxamines and Ferricoelichelin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry*, *49*(37), 8033–8042.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., & Stackebrandt, E. (1996). The Genus *Nocardiopsis* Represents a Phylogenetically Coherent Taxon and a Distinct Actinomycete Lineage: Proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *46*(4), 1088–
- Rawlings, D., & Johnson, D. (2007). The microbiology of biomining: Development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology Society*, *153*(2), 315–324.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., & Sand, W. (2003). Bioleaching review part A: *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*(3), 239–248.
- Rong, X., Guo, Y., & Huang, Y. (2009). Proposal to reclassify the *Streptomyces albidoflavus* clade on the basis of multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, and taxonomic elucidation of *Streptomyces griseus* subsp. *Solvifaciens*. *Systematic and Applied Microbiology*, *32*(5), 314–322.



- Rong, X., & Ying, H. (2010). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species | Microbiology Society. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(3), 696–703.
- Sadeghi, A., Soltani, B. M., Jouzani, G. S., Karimi, E., Nekouei, M. K., & Sadeghizadeh, M. (2014). Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces sp.* Strain C-2012 and the effect of salt and ectoine on lon expression level. *Microbiological Research*, 169(2), 232–238.
- Santos, A. P. P., Silva, M. D. S., Costa, E. V. L., Rufino, R. D., Santos, V. A., Ramos, C. S., Sarubbo, L. A., & Porto, A. L. F. (2017). Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces sp.* DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(2).
- Schippers, A., Glombitza, F., & Sand, W. (Eds.). (2014). *Geobiotechnology I: Metal-related Issues*. Springer-Verlag. Recuperado de:  
<https://www.springer.com/gp/book/9783642547096>
- Shi, Y., Zhang, X., & Lou, K. (2013). Isolation, characterization, and insecticidal activity of an endophyte of drunken horse grass, *Achnatherum inebrians*. *Journal of Insect Science (Online)*, 13, 151.
- Ugarte, D. (2016). *Evaluación de la capacidad lixiviante de actinomicetos aislados de concentrados y relaves mineros en Perú*.
- Uraji, M., Arima, J., Uesugi, Y., Iwabuchi, M., & Hatanaka, T. (2007). Effect of salt on the activity of *Streptomyces prolyl aminopeptidase*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1774(11), 1462–1469.

Wang, L., Chen, S., Xiao, X., Huang, X., You, D., Zhou, X., & Deng, Z. (2006). arsRBOCT Arsenic Resistance System Encoded by Linear Plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. Strain FR-008. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3738–3742.

Waterborg, J. H. (2002). The Lowry Method for Protein Quantitation. En *The Protein Protocols Handbook* (pp. 7–9). Humana Press.

Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W., Suzuki, K., & Parte, A. (Eds.). (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria* (2a ed.). Springer-Verlag.

Yanacocha. (2019). *Proceso de producción*. Recuperado de:  
<http://www.yanacocha.com/proceso-de-produccion/>

## X. ANEXOS

### **Medios de cultivo básicos**

***Medio Agar Almidón Caseína (AAC):*** Contiene almidón 10 g/L, Caseína 0.3 g/L, KNO<sub>3</sub> 2 g/L, NaCl 2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, CaCO<sub>3</sub> 0.02 g/L y Agar Agar 15 g/L.

***Medio Almidón Caseína Líquido 1/10 (ACL):*** Contiene almidón 1 g/L, Caseína 0.03 g/L, KNO<sub>3</sub> 0.2 g/L, NaCl 0.2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.005 g/L, CaCO<sub>3</sub> 0.002 g/L.

***Medio Glicerol extracto de levadura agar (XGAL):*** contiene glicerol 5 ml/L, extracto de levadura 2 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L y agar 15 g/L.

***Medio Glicerol extracto de levadura líquido (XGAL-liq):*** contiene glicerol 5 ml/L, extracto de levadura 2 g/L y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/L.

Todos los medios se esterilizaron por medio de calor húmedo (autoclave) a 121°C, 15 lb de presión por 30 minutos.

### **Medio para la utilización de carbohidratos.**

| <u>Solución A</u>    |      | <u>Solución B: Indicador de Andrade</u> |       |
|----------------------|------|---|-------|
| Peptona              | 5g   | Fucsina ácida                           | 0.5g  |
| Extracto de levadura | 1g   | NaOH 1N                                 | 10ml  |
| Cloruro de sodio     | 5g   | Agua destilada                          | 100ml |
| Indicador de Andrade | 10ml |   |       |
| Agua destilada       | 1Lt  |   |       |

Se autoclavó la solución A. Se prepara el stock de cada carbohidrato al 10% y luego se pasa por filtro de membrana con tamaño de poro de 0.2 $\mu$ m, con excepción de la celulosa y del Myo-Inositol que se esterilizan con dietil-éter. Se preparan los medios, llevando el stock del carbohidrato a una concentración final del 1% con la solución A.

### **Soluciones para la extracción de ADN**

| <u>Solución de lisis</u> | <u>Solución de Lisozima</u> | <u>Solución TE</u> |
|--------------------------|-----------------------------|--------------------|
| 20mM Tris-HCl pH 8       | 10mM Tris-HCl pH 8          | 10mM Tris-HCl pH 8 |
| 2mM EDTA pH 8            | 50mg/ml de Lisozima         | 1mM EDTA pH 8      |
| 1% SDS                   |                             |                    |

| <u>Solución TAE 50X</u> |        | <u>Solución buffer de carga 6X</u> |       |
|-------------------------|--------|------------------------------------|-------|
| Tris-Base               | 242g   | Bromophenol blue                   | 25mg  |
| Ac. Acético glacial     | 57.1ml | Xylene cyanol FF                   | 25mg  |
| EDTA 0.5M               | 100ml  | Glicerol                           | 3.3ml |
| Agua destilada          | 1Lt    | Agua destilada                     | 6.7ml |

Cuando se preparó la solución de EDTA se adicionó pastillas de NaOH hasta que se observó completa disolución de EDTA, inmediatamente se midió el pH para no sobrepasar el valor de 8. De la misma manera, cuando se preparó la solución de Tris-HCl, se adicionó HCl concentrado hasta que se disolvió por completo y a partir de ese momento se midió el pH hasta llegar al valor de 8.

### **Método modificado de Lowry**

#### Solución Pre-Stock

Se disolvió 30g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en agua destilada hasta llegar a 1 litro (se almacena a temperatura ambiente)

#### Solución de Tartrato de sodio y potasio

Se disolvió 4g de  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada hasta llegar a 100ml (se almacenó a 4°C).

#### Solución de sulfato cúprico

Se disolvió 2g de  $\text{CuSO}_4$  en agua destilada hasta llegar a 100ml (se almacenó a temperatura ambiente)

### Solución Lowry A

Se mezcló 1 ml de solución de tartrato de sodio y potasio más 1 ml de solución sulfato cúprico aforando con la solución pre-stock hasta llegar a 100ml. Se debe respetar el orden y se debe preparar cada vez que se hagan mediciones.

### Solución Lowry B

Se preparó una relación de reactivo de Folin con agua destilada de 1:1. Se debe preparar cada vez que se hagan mediciones.

### **Medio CAS (Chrome Azurol S)**

#### Solución 1: Fe – CAS

FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (1M diluido en 10mM de HCl) 10ml

Chrome Azurol S (1.21 mg/ml) 50ml

Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (HDMTA 1.82mg/ml) 40ml

Primero se mezcló FeCl<sub>3</sub> y el CAS, luego se adiciona HDMTA y se procedió a autoclavar.

#### Solución 2: medio MM9

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3g

NaCl 0.5g

NH<sub>4</sub>Cl 1.0g

PIPES 30.24g

NaOH discos hasta llegar a pH 6.8

Agar agar 15g

dH<sub>2</sub>O 800ml

Se mezclaron todos los reactivos y se agregó los discos de NaOH con cuidado hasta que la solución se volvió transparente. Se procedió a ajustar el pH a 6.8 y se agregó el agar agar. Finalmente se autoclavó.

Solución 3: Buffer

|   |        |
|---|--------|
| Glucosa   | 2g     |
| Manitol   | 2g     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 493mg  |
| CaCl <sub>2</sub>                                   | 11mg   |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 1.17mg |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 1.4mg  |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 1mg    |
| dH <sub>2</sub> O                                   | 70ml   |

Se mezclaron los reactivos y se procedió a autoclavar

Solución 4:

Ácido casamino (caseína hidrolizada 10% v/v) 30ml

Se filtró con membrana de 0.2µm de diámetro de poro

Las soluciones 2, 3 y 4 se mezclaron y por último se añadió la solución 1 con cuidado y mezclando constantemente. Todas las soluciones estuvieron a 50°C antes de mezclar. Finalmente se reparten 20ml de la mezcla en placas y se deja secar.

## CERTIFICADO

Por la presente, se certifica que las cepas *Streptomyces spp.* E1, *Streptomyces spp.* 21, *Streptomyces spp.* K1B y *Streptomyces spp.* AB5, que fueron aisladas de minerales en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia son caracterizadas fenotípicamente con las siguientes características:

### 1. Características fenotípicas

*Streptomyces spp* E1 : En agar XGAL y luego de 7 días de crecimiento a 28°C, las colonias son de color fucsia y en el envés de color rosado. Luego de 10 días presentan esporas de color blanca y luego de 15 días, esporas de color gris. Es una bacteria que presenta filamentos, estructura aérea y pigmentación en la estructura vegetativa.

*Streptomyces Spp* 21 : En agar XGAL y luego de 7 días de crecimiento a 28°C, las colonias son de color beige y en el envés de color crema. Luego de 10 días presentan esporas de color gris y producen pigmento rojizo extracelular. Es una bacteria que presenta filamentos, estructura aérea y produce pigmentos.

*Streptomyces spp* K1B: En agar XGAL y luego de 7 días de crecimiento a 28°C, las colonias son de color beige y en el envés de color crema. Luego de 10 días presentan esporas de color gris y pigmento extracelular de color rojizo o verduzco. Es una bacteria que presenta filamentos, estructura aérea y produce pigmentos.

*Streptomyces spp.* AB5. En agar XGAL y luego de 7 días de crecimiento a 28°C, las colonias son de color beige y en el envés de color crema. Luego de 10 días presentan esporas de color gris y pigmento extracelular de color rojizo o verduzco. Es una bacteria que presenta filamentos, estructura aérea y produce pigmentos.

### 2. Condiciones de crecimiento de las 4 cepas

- Temperatura: 28°C
- Atmósfera: microaerofilia

### 3. Condiciones de mantenimiento de las 4 cepas

- Congelado a -20°C
- Refrigerado de 2°C a 8°C

### 4. Bioseguridad: las cepa ha sido manejada en un nivel de bioseguridad I (Según ATT para *S. coelicolor*)

Esta cepas han sido usada por la Lic. Pamela Obando para realizar su tesis de maestria.

Lima, 17 de Junio de 2020

Dra. Jasmin Hurtado C.  
Jefe del Lab. Biotecnología Ambiental  
LID - UPCH