

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



**“ESTUDIO DE BACTERIAS ACIDÓFILAS
FERROOXIDANTES PRESENTES EN MINERAL
MAGNETITA DE TOQUEPALA,
CONCENTRADO DE PIRITA DE PORACOTAY
AGUA DE MINA DE COBRE DE QUIRUVILCA”**

Betsabé Liliana Román León

Tesis para optar el título de Licenciado en Biología

Lima – Perú

2017

A Dios, por sus infinitas bendiciones.

A mis padres, Sabina y Abel, por su amor y gran apoyo.

A mis hermanos Arturo y Carolina por siempre sacarme una sonrisa.

A mi abuelita Josefina por sus constantes oraciones.

A mis tías Marina y Guadalupe que se fueron muy pronto.

AGRADECIMIENTOS

*El hierro se pule con el hierro, y el hombre se pule en el trato con su prójimo.
Proverbios 27:17*

Esta tesis no hubiera sido lograda sin el apoyo de las siguientes personas:

A mi asesora, **Dra. Jasmín Hurtado**, por sus consejos, ánimos y apoyo. Además de confiar en mí desde el principio y durante el desarrollo de esta tesis.

Al profesor **Camilo Díaz**, por sus sabios consejos, guía y amistad.

Al **Sr. David** y la **Sra. Betty** por su ayuday paciencia en la parte experimental durante el desarrollo de esta tesis.

A mi tía **Mónica** por su confianza y cariño en mí.

A mis amigos de **CBU** y de **CDV** por su incondicional amistad, sus constantes ánimos y oraciones.

A mis amigos de **FAB LAB Perú**, de quienes aprendí que la ciencia es para todos.

A mis compañeros del **Laboratorio de Biotecnología Ambiental**: Sara, Miguel, Yuri, Ángela, Jorge, Sara Liz, Daniel, Andrea, Sandro, Gabriela C., Jacqueline, Pamela y Gabriela S. Porque desde el principio me hicieron sentir en familia, y me apoyaron en infinidad de situaciones.

A **Diana Vargas**, por entender esta pasión por la biología y la minería. Además de siempre tener tiempo para escucharme y darme buenos consejos.

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Cantidad de cepas aisladas por el efecto del medio de cultivo según el origen de la muestra..... | 34 |
| Tabla 2: Cantidad de cepas aisladas por el efecto de la temperatura según el origen de la muestra..... | 35 |
| Tabla 3: Cantidad de los tipos de células observadas de las cepas aisladas..... | 35 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: promedio de UFC/ml en los medios sólidos FeO y FeSo entre las tres temperaturas en la muestra Magnetita..... | 28 |
| Figura 2: Promedio de UFC/ml en los medios sólidos FeO y FeSo entre las tres temperaturas en la muestra Pirita..... | 29 |
| Figura 3: Promedio de UFC/ml en los medios sólidos FeO y FeSo entre las tres temperaturas en la muestra Agua de Mina..... | 30 |

ABREVIATURAS

DRA: Drenaje de Roca Ácida

DAM: Drenaje Ácido de Mina

TSB: Siglas en inglés de Caldo de Tripticasa de soya.

FeTSB: Medio de cultivo simple de hierro ferroso con caldo de tripticasa de soya

Feo: medio de cultivo en superposición de hierro ferroso con caldo de tripticasa de soya creado por Johnson (1995) (20).

FeSo: medio de cultivo en superposición de sulfato ferroso y tetrionato de potasio con caldo de triptona de soya creado por Johnson (1995) (20).

TK: Medio de cultivo líquido a base de Sulfato ferroso creado por Tuovien y Kelly (1972) (54).

DMSO: Dimetilsulfóxido

UFC: unidades formadoras de colonias

NMIC: National Minerals Information Center

MINEN: Ministerio de energía y minas

COMEX: Cámara de Comercio Exterior del Perú.

RESUMEN

La industria minera genera diferentes productos ya sea de manera directa o indirecta. En donde los productos mineros son los concentrados obtenidos de la extracción y minerales obtenidos luego del proceso de refinación. Además esta actividad antrópica genera cambios en los ecosistemas y puede afectar las fuentes de agua naturales. En el Perú, poco se sabe de los microorganismos que existen en los yacimientos mineros, los cuales podría traer múltiples beneficios en el campo científico como industrial.

La finalidad de este proyecto fue saber qué microorganismos acidófilos ferrooxidantes existen en las muestra de mineral magnetita de Toquepala, concentrado de pirita de Poracota y agua de mina de Quiruvilca a diferentes temperaturas (4°C, 14-20°C, 28°C). Se utilizó técnicas aplicativas para la adaptación e identificación de bacterias que habitan en ambientes similares a las muestras. Entre los 17 microorganismos preservados se encuentran del género *Acidithiobacillus spp.*, la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* y levaduras.

Palabras clave

Bacterias ferrooxidantes

Acidithiobacillus ferrooxidans

ABSTRACT

The mining industry generates different products directly or indirectly. These are concentrates obtained from the extraction, and minerals obtained after the refinery process. In addition, this anthropic activity generates changes in ecosystems and can affect natural water sources. In Peru, little is known of the microorganisms that exist in the mining deposits, which could bring multiple benefits in the scientific and industrial fields.

The purpose of this project was to know which ferroxidans acidophilic microorganisms exist in Toquepala magnetite ore samples, Poracota pyrite concentrate and Quiruvilca acid mine water at different temperatures (4° C, 14-20° C, 28° C). The techniques were used for the adaptation and identification of bacteria that have similar media to the samples. Among the 17 microorganisms preserved are the species of the genus *Acidithiobacillus* spp., *Acidithiobacillus ferrooxidans* specie and yeasts.

Keywords

Ferroxidans bacteria

Acidithiobacillus ferrooxidans

INDICE

| | | |
|-------------|--|----|
| I. | Introducción | 4 |
| 1.1 | Antecedentes históricos de la minería..... | 4 |
| 1.2 | Etapas de la extracción minera..... | 4 |
| 1.3 | Derivados de la actividad minera..... | 6 |
| 1.4 | Metabolismo de las bacterias quimiolitótrofas..... | 7 |
| 1.5 | Lixiviación Bacteriana en el Perú..... | 7 |
| 1.6 | Biodiversidad..... | 8 |
| 1.7 | Microorganismos presentes en los minerales..... | 8 |
| 1.8 | Identificación y descripción del problema..... | 12 |
| 1.9 | Antecedentes existentes..... | 12 |
| 1.10 | Situación legal y actual..... | 13 |
| 1.11 | Propósito del estudio..... | 14 |
| II. | Hipótesis | 17 |
| III. | Objetivos | 18 |
| 3.1 | Objetivo general..... | 18 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 18 |
| IV. | Materiales y métodos | 19 |
| 4.1 | Materiales..... | 19 |
| 4.2 | Características..... | 19 |
| 4.3 | Determinación del pH inicial | 19 |
| 4.4 | Preparación de los Medios para adaptación..... | 19 |
| 4.4.1 | Procedimiento de adaptación..... | 20 |
| 4.5 | Preparación de los Medios para conteo..... | 20 |
| 4.5.1 | Procedimiento de conteo | 21 |
| 4.6 | Preparación de los Medios para purificación..... | 21 |
| 4.6.1 | Procedimiento de purificación..... | 22 |
| 4.7 | Preparación de los Medios para identificación..... | 23 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.7.1 | Procedimiento de identificación..... | 24 |
| 4.7.1.1 | Observación..... | 24 |
| 4.7.1.2 | Macroscópica..... | 24 |
| 4.7.1.3 | Microscópica..... | 24 |
| 4.7.1.4 | Pruebas bioquímicas..... | 24 |
| 4.8 | Fungicidas..... | 25 |
| 4.9 | Preservación..... | 26 |
| V. | Resultados..... | 27 |
| 5.1 | Determinación del pH inicial de las muestras..... | 27 |
| 5.2 | Adaptaciones de cepas..... | 27 |
| 5.3 | Conteo de cepas..... | 27 |
| 5.3.1 | Conteo en Mineral Magnetita de Toquepala..... | 27 |
| 5.3.2 | Conteo en concentrado de Pirita de Poracota..... | 28 |
| 5.3.3 | Conteo de Agua de Mina de Quiruvilca..... | 29 |
| 5.4 | Descripción macroscópica y microscópica de las colonias de conteo..... | 30 |
| 5.5 | Purificación selectiva..... | 31 |
| 5.6 | Aislamiento..... | 31 |
| 5.7 | Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias purificadas..... | 31 |
| 5.7.1 | Caracterización en mineral Magnetita de Toquepala..... | 31 |
| 5.7.2 | Caracterización en concentrado de Pirita de Poracota | 31 |
| 5.7.3 | Caracterización en Agua de mina de cobre de Quiruvilca | 32 |
| 5.8 | Pruebas Bioquímicas..... | 32 |
| 5.9 | Diversidad..... | 34 |
| 5.9.1 | Cepas aisladas por el efecto del medio de cultivo | 34 |
| 5.9.2 | Cepas aisladas por efecto de la temperatura..... | 35 |
| 5.9.3 | Distribución de las morfologías observadas..... | 35 |

| | | |
|--------------|----------------------------------|-----------|
| 5.10 | Almacenamiento de las cepas..... | 35 |
| VI. | Discusión..... | 36 |
| VII. | Conclusiones | 42 |
| VIII. | Recomendaciones..... | 43 |
| IX. | Bibliografía..... | 44 |
| X. | Anexos..... | 50 |

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes históricos de la minería

El Perú está ubicado geográficamente entre la Cordillera de los Andes y el Océano Pacífico y es reconocido a través de todo el mundo por ser un país muy diverso en flora y fauna, por su infinidad de recursos y materia prima, por su diversidad climática y esto es debido a diferentes eventos geológicos y geográficos que han permitido al país poseer una gran variedad de recursos minerales que son una gran fuente de materias prima.

Los recursos minerales han sido aprovechados desde épocas pre-hispánicas según evidencia histórica, donde la metalurgia ha estado vinculada a los habitantes del antiguo Perú. Según Daniel Lovera (1) en el país existe una tradición vinculada a la metalurgia desde hace más de 10 mil años, cuya finalidad era el desarrollo de herramientas para la recolección, la caza y la pesca así como para fines religiosos y artísticos. Entre las técnicas que llegaron a desarrollar para procesar los minerales y obtener objetos se encuentran: la fundición, aleación, laminación, soldadura. Esta última técnica se aprecia en la creación de joyas e instrumentos mediante el uso de oro, cobre y plata encontrados en los restos arqueológicos del señor de Sipán, cultura Moche (2).

Durante el periodo colonial, la explotación minera entra en apogeo porque se descubren más yacimientos y se convierte en la actividad económica principal, siendo la plata el mineral más explotado (2). Esto dio lugar a la sobre explotación de los yacimientos mineros y, lamentablemente, de los pobladores indígenas que fueron obligados a realizar trabajos forzados en condiciones deplorables, que llevó a una drástica reducción de la población nativa (3). Durante la época colonial se empieza a experimentar con la hidrometalurgia, que es una técnica para extraer metales como el cobre mediante el uso de soluciones líquidas provenientes de la mina y a fines de siglo XIX, se empieza a realizar los primeros ensayos en lixiviación empleando cianuro para el tratamiento del oro (1).

1.2 Etapas de la actividad minera

En la actualidad, la actividad minera se desarrolla en las siguientes etapas:

- 1) Cateo, consiste en el estudio e identificación del posible yacimiento pero de manera muy superficial.
- 2) Exploración, que radica en un estudio más profundo de la zona y del futuro impacto ambiental mediante el uso de herramientas más avanzadas.

- 3) Estudio técnico económico y de factibilidad, que consiste en hacer una aproximación del presupuesto de los futuros gastos y ganancias. A partir de esta etapa, ya se entra en contacto con el yacimiento minero por lo que el siguiente paso a dar es la explotación.
- 4) La explotación consiste en la extracción del mineral y depende del tipo de mina; que puede ser mina subterránea o superficial (3). Las rocas obtenidas pasan por un par de procesos de reducción de volumen que son el chancado y la molienda. La primera, reduce las rocas de manera uniforme a casi media pulgada y la otra fase reduce aún más las rocas mediante el uso de molinos especiales.
- 5) La flotación es una técnica de concentración que permite la separación de los minerales valiosos del resto mediante el uso de reactivos y espumantes. Los minerales hidrófobos se adhieren a las burbujas y los hidrofílicos al agua y se mantienen en el fondo. Esto permite que se recupere de una 80-90% del mineral objetivo. El limitante en este proceso es gran uso de agua, así que en la actualidad se trata de reciclar el agua usada.
- 6) Procesamiento o concentración, la cual se da al mineral obtenido para producir una mayor concentración de los elementos valiosos y se da principalmente aplicando la pirometalurgia o la hidrometalurgia (4):
 - a) La pirometalurgia es el método más usado históricamente y se caracteriza por el gran uso de energía ya que necesita altas temperaturas para purificar al mineral. El proceso general es el siguiente: secado de concentrado, tostación, fusión para separar fases, conversión de la fase sulfurada y pirorefinación de la fase metálica (5). Esta técnica es muy usada para la obtención de hierro, níquel, estaño, oro y plata. Aunque es una técnica muy contaminante ya que genera gases tóxicos como SO_2 y CO_2 .
 - b) La hidrometalurgia es un método que consiste en emplear agentes solubilizantes en los metales, que permiten la posterior recuperación del mineral deseado. Se emplea principalmente para la obtención de sulfuros y concentración de oro y zinc. El procesamiento principalmente es mediante la lixiviación. Proceso por el cual el mineral luego de pasar por la molienda o flotación, es puesto en pilas donde se le agrega agua ácida por aspersión y así empieza el mineral a disolverse. La finalidad de la lixiviación es solubilizar los metales y separar el de interés del resto. La ventaja es que necesita menos energía pero se utiliza medios muy ácidos que sin un buen manejo pueden ser desechados al medio ambiente. En el mercado existen varios agentes

solubilizantes químicos de diferente composición pero también se puede emplear bacterias y denominar el proceso como lixiviación bacteriana. Finalmente el metal obtenido es purificado mediante el uso de electricidad usando un cátodo, aumentando la pureza del metal.

1.3 Derivados de la actividad minera

La minería y el proceso metalúrgico generan elementos directos e indirectos durante de los cuales mencionaremos a tres que son: Mineral, concentrados y agua de mina.

- a) El mineral, es un elemento homogéneo y se caracteriza por su composición química y sus propiedades físicas definidas debido a un agrupamiento a nivel atómico. Sus propiedades son predecibles y constantes. Bajo buenas condiciones posee una estructura cristalina definida (6). De manera natural se encuentra disperso en la corteza terrestre y es por el proceso metalúrgico donde está mayor contracción y pureza.
- b) El concentrado, es un producto a nivel intermedio del proceso metalúrgico, que se caracteriza por ser fino y heterogéneo que depende de sus componentes minerales. Es resultado del proceso de concentración de minerales (molienda). Dentro de este producto existe el concentrado "bulk" que es un concentrado que se caracteriza por tener más de un metal con valor comercial, debido a procesos de separación y concentración. Luego estos metales son extraídos de los concentrados mediante procesos pirometalúrgicos e hidrometalúrgicos en las fundiciones y refineras.
- c) El agua ácida puede tener dos orígenes:
 - 1) De manera natural llamado Drenaje de Roca Ácida (DRA) donde el ácido sulfúrico se produce cuando los sulfatos de las rocas son expuestos al aire o agua por ejemplo un río subterráneo o filtraciones. Se caracteriza por tener un pH menor a 7, lo cual es nocivo para la mayoría de seres vivos multicelulares (7). Estas soluciones son calientes por las reacciones exotérmicas de oxidación de los sulfuros metálicos. el metal predominante en este tipo de rocas es la pirita (FeS_2) (21).
 - 2) El Drenaje Ácido de Mina (DAM) que posee similares características al DRA pero con intervención del hombre, como la minería, que magnifica el área de exposición. La formación de este también se da por entrar en contacto con minerales sulfurosos, y a la vez por la acción catalizadora de bacterias. Este tipo de solución, es mucho más ácida y tóxica de lo que se puede generar de manera natural, y es debido a la disolución de minerales sulfurosos como

la piritita, arsenopiritita, calcopiritita, esfalerita y marcasita (8) que se encuentran en los yacimientos mineros. Además se encuentra una gran diversidad de microorganismos que habitan estos ambientes, incrementando la formación del DAM, el cual puede convertirse en un problema medioambiental (21).

1.4 Metabolismo de las bacterias quimiolitótrofas

Las bacterias quimiolitótrofas son aquellos organismos autótrofos que obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos y utilizan el CO₂ como fuente de carbono por el ciclo de Calvin. Por ejemplo para la oxidación de hierro, las bacterias como el *Acidithiobacillus ferrooxidans* usan el hierro ferroso como donador de electrones, a pH 2, ya que a esta acidez el hierro es más estable y no tiende a la oxidación espontánea y como aceptor de electrones al oxígeno. La oxidación comienza en el periplasma celular donde la proteína rusticianina oxida el hierro ferroso (+2) a hierro férrico (+3). Para la fijación de CO₂ se necesita NADH el cual se obtiene mediante las reacciones de transporte inverso de electrones pero el consumo de energía es muy elevado. Pero se genera poca energía y materia celular por lo tanto se debe oxidar grandes cantidades de hierro para obtención de mayor biomasa.

Para la oxidación de compuestos reducidos del azufre, los donadores de electrones son: sulfuro de hidrógeno, azufre elemental o tiosulfato. Esta oxidación se da por etapas, siendo el producto final el Sulfato (SO₄⁻²) y se genera H⁺, lo cual reduce el pH, como por ejemplo ante la presencia del microorganismo *Acidithiobacillus thiooxidans* (72).

1.5 Lixiviación Bacteriana en Perú

Existen bacterias que de manera natural oxidan y lixivian minerales sulfurados. Al utilizar a estos microorganismos en la metalurgia, se implementa la biolixiviación como medida de biorremediación (11). Esta tecnología pertenece a la rama de biominería, que consiste en una serie de reacciones químicas y biológicas (síntesis de ATP) para disolver y hacer más solubles a minerales de mayor valor mediante microorganismos bacterianos que oxidan minerales sulfurados como fuente de energía. Esta tecnología fue aplicada como una alternativa de solución a la problemática ocasionada a partir de los relaves que deja la lixiviación tradicional y que contamina seriamente la tierra y agua de ríos o lagos. La ventaja es que se requiere poca inversión y energía (12). Porque los microorganismos son capaces de sintetizar sus componentes celulares a partir del CO₂ (13). La desventaja es el largo tiempo que demora el proceso. La aplicación de esta tecnología en el Perú se viene aplicando desde los noventa aproximadamente. Por ejemplo, en Tamboraque para tratar los minerales arsenopiritita y piritita aurífera contenido en los depósitos de relaves, también es aplicada de manera combinada con la lixiviación

química en Toquepala por la minera Southern Perú Copper Corporation y en Cerro Verde en Arequipa (14).

1.6 Biodiversidad

La biodiversidad consiste en la variabilidad y variedad de todas las formas de vida que puede ser a nivel multicelular como también unicelular. En esta categoría se encuentran no solo las bacterias sino también hongos, protistas y virus. Estos microorganismos tienen una larga historia evolutiva, y fueron las primeras formas de vida en la Tierra de las que se tiene reporte. Las cianobacterias aparecieron hace más de 3.5 mil millones de años y son los seres vivos más abundantes y este tipo de microorganismos son los que han permanecido por más tiempo en el planeta. Esta longevidad y permanencia es debido a su larga historia evolutiva y rápida adaptabilidad que se demuestra en su gran diversidad genética, metabólica y morfológica (15). En la actualidad, muchos medicamentos y enzimas son elaborados por microorganismos y estos no solo han salvado vidas sino han traído muchos beneficios económicos.

A pesar de este interés, poco se sabe de la gran diversidad de las especies microbianas, y el rol del que forman parte en el ecosistema. Según Locey y Lennon (16), quienes realizaron una predicción matemática para saber la cantidad de especies microbianas, lograron estimar que existen de 10^{11} a 10^{12} especies microbianas total, de las cuales solo 10^4 han logrado ser cultivadas y de las que se logran catalogar, muchas veces han sido detectadas solo dos veces.

La comprensión actual de la ecología y de la diversidad microbiana es muy limitada. Incrementar las investigaciones en diversidad permitiría por ejemplo, la rehabilitación de las zonas deforestadas o mejora de un campo de cultivo, ya que al tener un conocimiento de las bacterias del suelo podríamos entender la simbiosis entre una bacteria y una planta, y el aporte nutricional que le proporciona y mejorar las características del cultivo (17); también en la biorremediación como alternativa de limpieza del medio contaminado usando bacterias. Otra aplicación sería la biolixiviación para la obtención de minerales en un estado más concentrado pero sin el uso de elementos químicos tóxicos que contaminan al medio ambiente y para un país como el Perú, aún hay mucho camino por recorrer pero se puede empezar por la investigación de la diversidad de la vida microbiana y así establecer colecciones de los microorganismos sacando provecho de nuestra diversidad geográfica.

1.7 Bacterias presentes en los minerales

Los procariontes son los seres más abundantes en la Tierra y han logrado establecerse en cada rincón de ella, sin importar las condiciones extremas que pueda presentar el

ambiente. Por eso se destaca la gran diversidad de arqueobacterias y bacterias y el importante aporte que realizan a los ecosistemas así como también a la humanidad.

En el ambiente donde se encuentra el hierro y por ende sus variantes oxidadas, se encuentran las bacterias oxidantes del hierro que son litótrofas que se caracterizan por obtener su energía a partir de la oxidación del hierro. Por lo tanto es muy común encontrar este tipo de bacterias en minas donde se extrae minerales sulfurados (8). Entre los géneros más comunes de bacterias tenemos *Acidithiobacillus spp*, *Leptospirillum spp*, *Acidimicrobium spp.*, *Sulfobacillus spp.*, *Ferrimicrobium spp.* y *Thiomonas spp*.

El género ***Acidithiobacillus spp***. Incluye a las proteobacterias quimiolitótrofas ya que usa compuestos inorgánicos como donadores de electrones pero también son autotróficos porque transforman el CO₂ en material celular mediante las reacciones del ciclo de Calvin. Dentro de los *Acidithiobacillus* tenemos entre otros 4 especies ferrooxidantes: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. ferrivorans*, *A. ferridurans*, *A. ferriphilus* *A. Thiooxidans* (oxidante de azufre) y *A. caldus* (crecimiento a 50°C).

La especie más estudiada es ***Acidithiobacillus ferrooxidans*** proveniente de drenajes ácidos, del cual se tiene registro de su aislamiento en 1950, aunque su estudio data desde 1920. Los investigadores Colmer y Temple (18) describieron que esta bacteria se caracteriza por ser un bacilo recto Gram negativo, perteneciente al grupo filogenético gamma. Se desarrolla en un medio ácido y posee la capacidad quimiosintética de oxidar compuestos de azufre a ácido sulfúrico y de hierro a ión férrico. Siendo el oxígeno el aceptor de la mayor parte de los electrones, por lo que otra característica por la que destaca es por ser aeróbica. Los factores que influyen en la respuesta de los microorganismos encargados de la biolixiviación según Pradhan *et al.* son: pH (1.5), oxígeno y dióxido de carbono, nutrientes, fuente de energía, luz, temperatura (25-35°C), presencia de inhibidores, potencial redox (Eh) y tamaño de partícula; pero pueden variar según el tipo de microorganismo (19). Por su actividad metabólica el *Acidithiobacillus ferrooxidans* genera acidificación del medio en el que se encuentra, así como también se caracteriza por un largo tiempo de crecimiento (Tiempo generacional: 52 horas aproximadamente). Crece en medios sólidos como Feo y FeSo(20). Las colonias en medio Feo se caracterizan en ser pequeñas o grandes de color bronce (Óxido naranja marrón), su forma es variable ya que puede ser de borde entero, irregular: estrellada o anillos concéntricos (21). Mientras que las colonias que crecen en el medio FeSo, mantienen una característica menos variable porque son muy pequeñas (0.5-1.0mm) y son de color anaranjado marrón. Asimismo se han descrito recientemente otras *Acidithiobacillus ferrooxidantes*.

La especie ***Acidithiobacillus ferrivorans*** se caracteriza por tener bacilos Gram negativo móviles, pero sin formar endosporas. Su pH óptimo es de 2.5 y no es muy tolerante a pH más bajos, su temperatura ideal de crecimiento es de 30°C. Es un anaerobio facultativo. Las colonias crecen mejor con hierro que con sulfuro. Estas colonias crecen tanto en medio Feo como en FeSo, se caracterizan por ser largas (>1mm) con apariencia de un huevo frito. Poseen un color anaranjado al principio pero al madurar estas se ponen opacas y de color crema. Su tiempo de duplicación es de 32 horas y tienen una fase lag muy larga antes de crecer con tetrionato. Puede tolerar a minerales como zinc y cobre. Una característica también importante es que es psicrotolerante (4-10°C) (23).

La especie ***Acidithiobacillus ferridurans***, fue aislado el 2013 mediante pruebas genéticas. Se caracteriza por su tolerancia al ácido por lo que su crecimiento se da con el hidrógeno como único donador. Tolera altas concentraciones de hierro y a otros elementos como aluminio, cobre, níquel, zinc y molibdeno. Es un quimiolitótrofo obligado, mesófilo, crece con oxígeno y extracto de levadura (24).

La especie ***Acidithiobacillus ferriphillus*** fue aislado el 2016, se caracteriza por ser un bacilo móvil Gram negativo que no forma esporas. Es un quimiolitótrofo obligado, anaerobio facultativo y mesófilo, siendo su temperatura óptima 30°C. Es un acidófilo extremo, siendo su pH óptimo 2.0. Podría ser psicrotolerante (5°C). Crece con hierro ferroso y sulfuros reducidos o tetrionato de potasio. Sus colonias crecen en medios sólidos como Feo y FeSo, estas son pequeñas y anaranjadas (25).

La especie ***Acidithiobacillus thiooxidans*** es otra bacteria acidófila y aerobia que fue aislada en 1949 (22). Es un bacilo móvil Gram negativo, cuya temperatura óptima va entre 28-30°C pero puede crecer a menor o mayor temperatura. Crece en medios sólidos como FeSo y en medios líquidos con tiosulfato porque puede oxidar azufre. Sus colonias son de menor tamaño (0.8 mm de diámetro) y son de color blanco o amarillo muy claro. Una característica es que puede reducir el pH del medio a 0.5-0.8. La

La especie ***Acidithiobacillus caldus***, es un bacilo Gram negativo. Crece con tiosulfato, tetrionato, azufre, sulfuro e hidrógeno molecular. Crecimiento mixotrófico con tetrionato y glucosa o extracto de levadura. Las colonias en agar con tetrionato son pequeñas, circulares y convexas, lisas y transparentes con precipitado de sulfuro en su centro. Su crecimiento es óptimo entre las temperaturas de 32-52°C y pH: 1-3.5 (26).

El género ***Leptospirillum spp.*** representa a una parte de la población hierro ferroso oxidantes y se caracteriza por ser un quimiolitótrofo que solo metaboliza hierro ferroso y pirita. Su mayor característica es la forma de vibrio o espirilo muy móvil (20). Además

tiene un pH óptimo de 1.5 y es Gram negativo .Pueden crecer tanto en medio sólido Feo como en FeSo.

La especie ***Leptospirillum ferrooxidans*** en medios sólidos como Feo se caracteriza por su definido color naranja, borde entero y pequeño tamaño (20). Es un mesófilo ya que su crecimiento es abundante a temperaturas mayores a 20°C

La especie ***Leptospirillum ferriphilum*** se caracteriza porque sus colonias son redondas, de color amarillo y superficie suave. Su pH óptimo va de 1.4-1.8. Es un termófilo moderado, siendo 40°C la temperatura optima de su crecimiento pero puede crecer hasta los 60°C (27).

La especie ***Acidimicrobium ferrooxidans*** que es una bacteria acidófila Gram positivo y termófila moderada cuya temperatura óptima es 45-50°C y pH 2. Su crecimiento se puede dar en cultivos mixtos y también es autotrófico con hierro ferroso o tener un crecimiento heterótrofo con extracto de levadura(28).

El género ***Sulfobacillus spp.*** se caracteriza por los bacilos Gram positivos con poca o ninguna motilidad y poseen esporas. Pueden ser mesófilos o termófilos con un rango 40-60°C y un pH entre 1.2-2.4 y también son quimiolitótrofos oxidadores de hierro. Puede crecer en medio sólido FeSo y se caracterizan por requerir de material orgánico. Además sus colonias en medio sólido tienen forma de huevo frito (21).

El género ***Acidiphilium spp.*** Es un bacilo aerobio, quimioorganotrófico, acidófilo y Gram negativo, además es mesófilo, ya que puede crecer de manera lenta a 20°C y más rápido entre 35-41°C. Su crecimiento óptimo va de un pH de 1.9 a 5.9. No forma endosporas. Reduce, hierro ferroso, requiere pocos sustratos orgánicos y el acetato de sodio inhibe su crecimiento. Sus células tienen apariencia de bastón. (31) (32). Es posible encontrarlas y aislarlas de cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*(19).

La especie ***Acidiferrobacter thiooxydans*** son bacilos Gram negativo, que forma células únicas sin esporas y no tiene movilidad. Es termotolerante, siendo 38°C su temperatura óptima. Puede crecer en medios sólidos como Feo y FeSo pero se desarrolla mejor en medio líquido porque es autotrófica por la oxidación de hierro ferroso y por la oxidación de azufre elemental, sulfuro y tetratoato. Sus colonias son de color anaranjado muy pequeñas y de borde entero (33).

La especie ***Ferrimicrobium acidiphilum*** es una actinobacteria aislada el 2009 y sus células son bacilos en cadena. Es un heterótrofo cuyo pH óptimo oscila entre 1.4-2.0 y su temperatura óptima es de 35°C .Posee la capacidad de oxidación para hierro ferroso y necesita de glicerol, ácido cítrico y ácido glutámico. Oxida hierro y pirita. Crece con extracto de levadura y su morfología es de un huevo frito de 1-3mm de diámetro con

depósito de Fe en el centro, de apariencia gelatinosa en medio sólido de Feo. Esta especie ha podido ser aislada en USA, Reino Unido, España y China (34).

El género *Thiomonas spp* que se caracteriza por ser un bacilo corto Gram negativo que no forma esporas pero posee un flagelo polar. Es una beta proteobacteria mixotrófica que crece en azufre y sulfuros pero no oxida hierro. Tienen un buen crecimiento en medios sólidos como FeSo. Su temperatura óptima es entre 30-36°C pero puede crecer a 50°C y pH está en el rango de 3-6 (35).

1.8 Identificación y descripción del problema

A pesar de la gran diversidad en flora y fauna por la cual se reconoce al Perú, el conocimiento de los microorganismos y sus interacciones con el ambiente, es decir la ecología microbiana, es aún limitado. Por lo tanto, es importante conocer la actividad microbiana, mediante los procesos metabólicos que los microorganismos desarrollan y también la diversidad microbiana, la cual se desarrolla mediante la identificación y cuantificación de los microorganismos. Para poder llevar a cabo estudios de ecología microbiana en ambientes mineros, es importante utilizar métodos de cultivo para aislamiento selectivo y de identificación de los microorganismos deseados (36).

1.9 Antecedentes existentes

Las bacterias acidófilas ferrooxidantes han sido estudiadas desde hace más de un siglo y cuando se pudo aislar al *Thiobacillus thiooxidans* en 1921 (37) y al *Thiobacillus ferrooxidans* en 1950 (38), se creó un gran interés científico ya que esto evidenciaba la existencia de microorganismos en ambientes tan extremos como la acidez del suelo o el agua, trayendo así nuevas posibilidades en el desarrollo de la biotecnología. También porque se trataba de lugares donde el hombre está presente como es el caso de las minas, lo que hizo que esta industria muestre un cierto interés económico ya que se trataba de microorganismos que podrían hacer procesos, como lixiviación, con poca demanda de nutrientes. Todas estas razones y posiblemente el hecho que con el tiempo se aislaron más bacterias como *Thiobacillus albertis* (39, 40) o *Leptospirillum ferrooxidans* (41), hicieron que el interés en las bacterias acidófilas se incremente. Pero para poder identificar y conocer la variedad a este tipo de microorganismos, primero se debió ingeniar medios de cultivos que puedan realizarse en un laboratorio.

En principio, la mayoría de los microorganismos fueron identificados y mantenidos en medios líquidos con partes pequeñas de sulfato de amonio, sulfato de magnesio, fosfato de potasio y/o cloruro de calcio (42).

Entre los primeros medios de cultivos exitosos para el estudio de bacterias ferrooxidantes fue el medio utilizado por Olli H. Tuovinen y Donovan P. Kelly (1973) o también llamado “medio TK”, cuya finalidad fue evaluar el crecimiento del (*acidi*)*thiobacillus ferrooxidans*. Este medio fue usado en dos versiones, la primera fue una versión líquida para adaptar y mantener las cepas. Mientras que la segunda versión fue el medio sólido agregando agarosa pero esta no dio resultado porque hubo una inhibición de la cepa por el agar debido a que la D-galactosa puede ser tóxica para la bacteria o por la hidrólisis del agar (54). Otro medio de cultivo es el de Manning quien preparó el medio ISP (hierro-sales-agar purificado) - por sus siglas en inglés- con agar L28 purificado pero aparecieron puntos oscuros en agar luego de inocular la cepa aunque permite el crecimiento de ferrooxidantes y heterótrofas. Otro medio de cultivo es el de Visca et al (73), llamado: TSMI, el cual contiene sulfato ferroso y un mínimo de sales y solo permite el crecimiento de *At. Ferrooxidans* y su eficiencia cambiaba con la concentración del fosfato (20).

A partir de esto, Johnson y su equipo se dedicaron por varios años a crear un medio que pueda estar compuesto de minerales, mantener un pH bajo y tener componentes orgánicos a bajos niveles (20). Lográndose así preparar los medios de cultivo sólidos con Caldo de Triptona de Soya junto con hierro ferroso y agarosa (FeTSB) y que llevó a llamarse “Feo” cuando esta fue realizada en doble capa (overlay en inglés). Existe también la variante mixta la cual tenía tetrionato de potasio (FeSo) de doble capa, ya que la primera capa tenía un inóculo de un heterótrofo (*Acidiphilum SJH*), y por último el medio con agarosa lavada (WAYE). Estos medios demostraron un buen crecimiento de bacterias acidófilas y su adaptabilidad para el crecimiento de acidófilas sulfuro-oxidantes en diferentes temperaturas.

1.10 Situación legal y actual

En las últimas décadas, la minería se ha dividido en dos grupos de acuerdo a su legalidad.

- a) Esta puede ser formal, por la obtención de permisos legales para la exploración y explotación de minerales.
- b) Mientras la minería ilegal o artesanal, no posee los permisos, ni derechos para realizar actividad minera. Esta se realiza en áreas abandonadas, tiene como objetivo la obtención de mercurio y oro. Lamentablemente esta actividad, es muy riesgosa y ha ocasionado la muerte de miles personas, sobre todo en zonas como Madre de Dios, Puno, Ica, Arequipa y Ayacucho (3).

En general, la minería siempre ha estado en conflicto con la sociedad, ya sea por la sobreexplotación a los obreros y sus pagos injustos; o también con el medio ambiente,

por la generación de pasivos ambientales. Esta confrontación, está generando un aumento en riesgo a invertir en nuestro país (9). Esto se evidencia en las estadísticas del MINEM¹ (10) del año 2016, donde evidencia que desde el 2013 la inversión minera ha disminuido. La solución debe darse en varios aspectos, empezando por la búsqueda de nuevas tecnologías que reduzcan los efectos nocivos de la minería, así como políticas más a favor de la población y el medio ambiente.

En la actualidad la industria minera está muy interesada en la investigación de microorganismos acidófilos nativos ya que estos podrían contribuir a la recuperación de metales. Porque podrían ser la alternativa más económica a las usadas actualmente y sobre todo porque al ser elementos biológicos su impacto ambiental sería menor. Por ejemplo, la extracción del oro permite la investigación de más microorganismos; ya que muchas veces este mineral tan apreciado, se encuentra asociado a minerales en base a sulfuros como la pirita y la arsenopirita; y como alternativa se necesita de microorganismos que de manera eficiente y rentable oxiden y/o lixivien al mineral en base a sulfuros y permitan la obtención del oro. Solucionando los problemas de impacto ambiental que tanto afectan a las minas, así como la mayor recuperación de oro.

En la actualidad la minería sigue siendo una industria que aporta mucho a la economía del país, porque tiene una gran demanda en industrias como la joyería, construcción y tecnología. Genera divisas, inversiones, empleo directa e indirectamente (43). Según de NMIC², en sus últimos reportes de producción de minerales, el Perú a nivel mundial se encuentra entre los primeros productores de cobre, plata, zinc, plomo y molibdeno (44). Siendo el cobre el mineral más producido en el país (MINEM³) y tercero en el mundo, después de Chile y China (COMEX⁴).

1.11 Propósito del estudio

Es estudiar la diversidad de bacterias hierro-oxidantes acidófilas en tres muestras de diferentes zonas mineras del Perú.

- a) **Magnetita de Toquepala:** Es la primera muestra en analizar, su composición se basa en óxido ferroso-diférrico (Fe_3O_4). Es un mineral de color negro con cierto brillo metálico. Es conocido por sus propiedades magnéticas, ya que puede atraer el hierro y al acero; y su estabilidad a altas temperaturas. De manera natural se puede encontrar este mineral de forma masiva granular o cristalizada y es muy importante porque es el mineral con más contenido de hierro (50). El

¹MINEM: Ministerio de Energías y Minas del Perú

² National Minerals Information Center

³Ministerio de Energía y Minas

⁴Cámara de Comercio Exterior del Perú.

origen de esta muestra es del Yacimiento de Toquepala, ubicado en la provincia de Jorge Basadre, Distrito de Ilabaya en el departamento de Tacna, Perú a 3352 m.s.n.m. Se caracteriza por ser un lugar desierto, frío y seco. Este yacimiento se caracteriza por la presencia de cobre y oro pero también de minerales como la magnetita.

La magnetita, un mineral muy abundante en la tierra, esta presencia importante de hierro generó la interrogante si la presencia de bacterias ferrooxidantes era similar o mayor a las encontradas a las muestras con pirita. La magnetita ha sido una muestra donde se han encontrado bacterias magnetotácticas, de amplio estudio en la actualidad; aunque en su mayoría a estas se las han hallado en muestras con cierto grado de humedad (45). En la actualidad ha sido demostrada la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en este tipo de muestras, y ha surgido un gran interés en diferentes campos de la ciencia, sobre su actividad magnetotáctica (46).

- b) **Concentrado de pirita de Poracota:** Es la segunda muestra a analizar. Su composición de hierro y azufre ya nos prevé la presencia de este tipo de bacterias. Aunque no hay un registro oficial de las bacterias que hay en los suelos mineros peruanos. La muestra proviene de un yacimiento minero de pirita y plata ubicado en el distrito de Cayarani, provincia de Condesuyos, departamento de Arequipa entre 4,200 y 4,800 m.s.n.m. Ubicado en la parte superior de la cuenca del río Majes y en los parajes de Poracota, Quellococha y Perseverancia. Se caracteriza por ser una zona árida. El suelo de esta zona se caracteriza por ser de poca profundidad, generalmente neutro y de fertilidad media, porque hay presencia de plantas como ichu y tola. La región donde está establecido el yacimiento minero se han identificado 5 unidades geológicas: rocas sedimentarias del Mesozoico, rocas volcánicas del Terciario, rocas intrusivas del Terciario, rocas volcánicas del cuaternario y depósitos aluviales (gravas y bolones) (53).
- c) **Agua de Mina de Cobre de Quiruvilca:** es la tercera muestra en analizar porque es uno de los contaminantes más importantes que se genera por la excavación minera y el hallazgo de ríos subterráneos. El agua al entrar en contacto con los minerales como sulfuros o hierro y el oxígeno genera un cambio en su pH, convirtiendo a esta masa de agua más ácida. El tratamiento de este tipo de aguas es de muy alto costo y siempre es dejado de lado. El cual lo convierte en un medio de contaminación y puede arruinar no solo ríos con los

cuales convergen, sino también suelos y sus cultivos (47). Por lo que la identificación de la población bacteriana de esta muestra sería de alto interés.

La muestra de agua provino de un yacimiento minero de cobre, ubicado en el distrito de Quiruvilca, en la provincia de Santiago de Chuco, a 4008 m.s.n.m., en la región de La Libertad, Perú. Por la zona se encuentran dos lagunas: San Lorenzo y Callacuyán de ellas se da el inicio de los ríos Moche y Chicama que desembocan por el océano Pacífico. Quiruvilca limita por el norte con un yacimiento de cuarzo llamado Tres Ríos, límite con Huamachuco. Por el este limita con Mundonuevo lugar también de cuarcitas y arcilla. Y por el oeste con Callacuyán donde hay carbón. Se encuentra aproximadamente a más de 35 kilómetros al noroeste de Santiago de Chuco y otros pueblos, así como está rodeado por los cerros de San Lorenzo, La Soledad, Chimborazo y más (51).

El clima es frío y seco con poca diversidad en plantas y animales. Según los registros antiguos de la zona de Santiago de Chuco, se le provee el nombre de Quiruvilca a esta zona minera por las palabras “quiru” diente y “vilca” sagrado porque los afloramientos que aparecieron tenían la forma de una dentadura y también la existencia del metal plata. La formación de minerales de esta zona es de origen mesotermal y epitermal sur, con presencia de oro-diseminado (52).

Con todo lo anteriormente dicho, se desea demostrar la diversidad de bacterias que hay en estos tipos de muestras, usando el medio de cultivo más versátil, que serían Feo y FeSo creados por Johnson et al 1995. También determinar los parámetros de la temperatura óptima para el crecimiento y capacidad oxidativa de estos microorganismos ya que existe la evidencia que a más temperatura, mayor será la tolerancia hacia los metales pesados. (48).

Las bacterias lixiviantes permiten obtener metales en solución a partir de sulfuros. Hay mucha diversidad microbiana en las minas que permitirían implementar procesos innovadores y queda en nosotros investigar y buscar nuevas alternativas biotecnológicas. Pero antes se debe conocer, estudiar e identificar las bacterias que forman parte de estos ambientes mineros.

II. HIPÓTESIS

Las muestras de mineral magnetita de Toquepala, concentrado de pirita de Poracota y agua de mina de cobre de Quiruvilca poseen diversidad de bacterias acidófilas ferroxidantes presentes en ellas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar la diversidad de las bacterias presentes en mineral de magnetita de Toquepala, concentrado de pirita de Poracota y agua de mina de cobre de Quiruvilca provistos por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental - UPCH.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar microorganismos acidófilos de las muestras.
- Evaluar la capacidad de oxidación de hierro de los microorganismos de mineral Magnetita de Toquepala, concentrado de Pirita de Poracota y Agua de Mina de Cobre de Quiruvilca para poder identificarlos.
- Evaluar la capacidad de oxidación de tiosulfato de los microorganismos de mineral Magnetita de Toquepala, concentrado de Pirita de Poracota y Agua de Mina de Cobre de Quiruvilca para poder identificarlos.
- Evaluar el crecimiento heterótrofo de las colonias aisladas de mineral Magnetita de Toquepala, concentrado de Pirita de Poracota y Agua de Mina de Cobre de Quiruvilca para poder identificarlos.
- Preservar las bacterias aisladas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

Equipos

- Balanza (AR3130 Adventurer OHAUS)
- Agitador magnético (PC 351-Corning)
- pH metro (HI 2213 - Hanna Instruments).
- Autoclave (YX-280D)
- Congeladora (Ultra Guard Freezer- BINDER)
- Membrana de papel a 0.2 μm (Whatman)
- Agitador (C76 New Brunswick Scientific)
- Microscopio (Primo Star- ZEISS).

4.2 Características de las muestras

Se emplearon tres muestras diferentes: Mineral de Magnetita de Toquepala, se caracterizó por ser una muestra sólida homogénea, polvorienta y de color plomo. El concentrado de Pirita de Poracota se caracterizó por ser una muestra sólida heterogénea, granulada y de color plomo verdoso. La composición de esta muestra dada fue de 48.0 g/t Ag, 51.39 g/t Au, 0.19 % Cu, 14.1% Fe, 15.1% S, 14.6% S. Finalmente, se utilizó una muestra líquida de agua ácida de una mina de cobre de Quiruvilca, esta era incolora e inodora proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología Ambiental.

4.3 Determinación del pH inicial

El pH inicial para las muestras sólidas de Magnetita y Pirita fue determinando colocando 30g de la muestra en 100 mL de agua destilada (76). Luego, se dejó sedimentar y se midió el pH en la solución. Para la muestra de Agua de mina de Quiruvilca, la medición de pH fue directo a la solución acuosa proporcionada.

4.4 Preparación de los Medios para adaptación

El medio líquido para la adaptación de las bacterias es el medio TK (54), la preparación fue la siguiente: Primero, se preparó la solución A que consiste en disolver en 800ml agua destilada, 0.5g fosfato de potasio, 0.4 g sulfato de amonio y 0.4g sulfato de magnesio. Esta preparación se acidifica a pH de 1.8 utilizando H_2SO_4 1N y homogenizando con agitador magnético y un pH metro. La solución A se esterilizó por 15 minutos a 121°C. Para la preparación de la solución B se mezcló 33.4 g de sulfato

de hierro heptahidratado con 50ml de agua ácida estéril a pH 1.8 en un matraz limpio. A continuación, esta mezcla fue esterilizada usando un filtro con una membrana de papel a 0.2 μm (Whatman)—esterilizados previamente en la autoclave por 15 minutos a 121°C- con la ayuda de una jeringa hacia otro matraz estéril. Este filtrado se completó con 150ml de agua ácida estéril y cuando la solución A estuvo a temperatura 14-20°C se procedió a mezclar con la solución B. Finalmente, se procedió a la distribución en matraces o tubos respectivamente.

4.4.1 Procedimiento de Adaptación

Se colocó en un matraz 10g de la muestra de magnetita de Toquepala con 100 mL de medio TK y 5g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 5g/L tiosulfato, se procedió de igual manera con la muestra de pirita de Poracota. Para la muestra de Quiruvilca, se agregó a un matraz 10 mL de agua de mina con 100 mL de medio TK y 5g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 5g/L tiosulfato.

Los 3 matraces se prepararon por triplicado y se colocó un matraz a las temperaturas de 28°C, 4°C y ambiente (entre 14 - 20°C) y se mantuvieron en agitación por 4 semanas. Durante este periodo de tiempo se observó sí había coloración anaranjada y formación de biofilm en las paredes de las botellas producido por la oxidación del medio TK). También se realizó tinción Gram para confirmar el crecimiento microbiano usando. A estos matraces se les consideró como “muestra original”. Posteriormente se hizo un repique en los mismos medios.

4.5 Preparación de Medios para conteo

Los **medios sólidos** empleados son los medios Feo y FeSo basados en la publicación de Johnson 1995 para aislar acidófilas y ferrooxidantes. Sirven para la obtención de bacterias hierro y azufre oxidantes. Se hizo la siembra por triplicado y en las temperaturas de 28°C, 4°C y a temperatura 14-20°C respectivamente.

La preparación del medio sólido Feo (20) fue la siguiente: Primero se preparó la solución A, que consistió en disolver en un matraz y la ayuda de un agitador 40ml de solución basal 10x (Anexo 1), 0.1 g de TSB, 0.4ml de elementos traza (Anexo 1) y 250 ml de agua ácida y ajustada a 2.5-2.8 pH con H_2SO_4 . Fue esterilizado a 121°C por 15 minutos. La solución B, consistió agregar 2g de agar Oxoid (Tipo I) y alcohol 96° en un matraz y se dejó estable por media hora, luego fue lavado tres veces con agua destilada hasta que dejó de oler a alcohol. De esa manera se eliminaron los componentes orgánicos. Luego se agregó 100ml de agua destilada, y se procedió a esterilizar en la autoclave a 121 ° C por 15 minutos. La última preparación fue la solución C, que consistió en disolver 2.78 g de Sulfato ferroso heptahidratado con 10ml de agua ácida estéril a pH 1.8 en un

matraz. A continuación, esta mezcla fue esterilizada usando un filtro con una membrana de papel a 0.2 µm (Whatman) –esterilizados previamente en la autoclave por 15 minutos a 121°C- con la ayuda de una jeringa hacia otro matraz estéril. Finalmente cuando las dos primeras soluciones salieron de la autoclave, se dejaron enfriar un poco y se mezclaron con la solución C y rápidamente se plaqueó. Cuando estas solidificaron, se dejaron 24 horas para control y así evitar posibles contaminantes.

La preparación del medio FeSo (20) consistió, en preparar de manera semejante al medio Feo las soluciones A, B y C y adicionalmente se agregó la solución D. La solución D consistió en mezclar 0.2419 g de Tetrionato de Potasio en 10 ml de agua destilada estéril a pH neutro y al igual que con el sulfato ferroso, se filtró con la membrana de 0.2 µm en esterilidad.

4.5.1 Procedimiento de Conteo

Las muestras de la adaptación fueron usadas para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Para esto se empleó el método de dilución. Se colocaron 0.5 ml de la “Muestra original” y en 4.5 ml de caldo (1/10) Feo y FeSo y se homogenizó en el vórtex y se sembró la dilución de 100ul por el método de dispersión en placa correspondiente por triplicado con ayuda de una asa Driglasky.

Luego fueron incubadas en la estufa en su temperatura correspondiente y revisadas cada semana y se contaron el número de colonias presentes en cada una de las placas cada 15, 30, 45 y 60 días. Se procedió a revisar con ayuda de un estereoscopio y a anotar las colonias diferentes. El número de UFC se calculó usando la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{N * Vt}{Vi}$$

N: número de colonias

Vt: Volumen de dilución

Vi: volumen de inoculación

4.6 Preparación de los Medios para purificación

La preparación del medio para la purificación es el medio **Feo líquido**, que consistió en una variación del medio sólido Feo (12) ya que no se usó un agente gelante. Para este medio se prepararon dos soluciones. La primera, solución A, consistió en mezclar de 40ml de solución basal 10X (Anexo 1), 0.1g de TSB, 0.4ml de elementos traza y 250 ml de agua destilada. Todos estos elementos fueron homogenizados en un agitador

magnético y ajustado a 2.5-2.8 pH con H₂SO₄ en un matraz. Luego se esteriliza en una autoclave a 120 ° C por 15 minutos. La solución B en preparar fue disolver 2.78g de Sulfato ferroso heptahidratado con 110ml de agua ácida estéril a pH 1.8 en un matraz limpio. A continuación, esta mezcla fue esterilizada usando un filtro con una membrana de papel a 0.2 µm—esterilizados previamente en la autoclave por 15 minutos a 121°C- con la ayuda de una jeringa hacia otro matraz estéril. Finalmente, ambas soluciones se mezclaron obteniendo un volumen final de 400ml y se distribuyeron a los tubos.

La preparación de **FeSo líquido** también fue una variación del medio sólido FeSo elaborada por Johnson 1995 (20). La solución A consistió en mezclar de 40ml de solución basal 10X (anexo 1), 0.1g de TSB, 0.4ml de elementos traza y 240 ml de agua destilada. Todos estos elementos fueron homogenizados en un agitador magnético y fue ajustado a 2.5-2.8 pH con H₂SO₄ en un matraz. Luego se esterilizó en una autoclave a 120 ° C por 15 minutos. Además, se preparó la solución C, que consistió en 0.2419g de Tetrionato de Potasio en 10 ml de agua destilada a pH neutro. A continuación, esta mezcla fue esterilizada usando un filtro con una membrana de papel a 0.2 µm—esterilizados previamente en la autoclave por 15 minutos a 121°C- con la ayuda de una jeringa hacia otro matraz estéril. Finalmente, las tres soluciones se mezclaron y se distribuyeron a los tubos.

4.6.1 Procedimiento de Purificación

En paralelo al proceso de conteo se procedió a purificar a las colonias que aparecían. Esta técnica consiste en escoger a la colonia mejor aislada y sembrarla en esterilidad directamente a otra placa con el mismo medio del que provenía. En algunos casos la muestra era de consistencia muy seca y se realizó un paso intermedio, el cual consistía en poner a la colonia en un tubo estéril con medio de Feo o FeSo líquido y llevarlo al vórtex para que así este se descomponga en partes más pequeñas y se liberen los microorganismos. Luego se sembró por estría. Pero a veces la muestra era muy pequeña entonces se procedía a dejarlo crecer en el tubo por unos días en su temperatura correspondiente. Y cuando se producía cambio de color u oxidación se procedía a repicar la placa correspondiente.

Algunas colonias presentaron poblaciones mixtas y que no podían ser separadas por repiques, en ese caso se utilizó el medio “H”.

Los procesos de purificación tomaron varias etapas dependiendo de la cepa. (Ejemplo esquema en Anexo 2).

4.7 Preparación de los Medios de identificación

Se prepararon tres medios para la identificación de las colonias puras. El primer medio fue una modificación del medio TK y se llamó **“TK- Fe”**.

- a) Se preparó la solución A consistió en disolver en 800ml agua destilada, 0.5g fosfato de potasio, 0.4 g sulfato de amonio y 0.4g sulfato de magnesio. Todo esto debió estar a un pH de 1.8 acidificado con H₂SO₄ 1N mediante un agitador magnético. La solución A se esterilizó por 15 minutos a 121°C. La solución B, fue de 15g/L de sulfato ferroso heptahidratado disuelto en agua ácida a pH 2 y luego fue esterilizado en un filtro con membrana a 0.2 µm. Finalmente se mezclaron y luego se procedió a distribuir a los tubos estériles, listos para ser sembrados con las colonias seleccionadas.
- b) El segundo medio fue **“TK-Tio”**, también estuvo basado en el medio TK. La solución A consistió en disolver en 800ml agua destilada, 0.5g fosfato de potasio, 0.4g sulfato de amonio y 0.4g sulfato de magnesio. La solución A debió estar a un pH de 1.8 acidificado con H₂SO₄ 1N mediante un agitador magnético. La solución A se esterilizó por 15 minutos a 121°C. En esta preparación la Solución B, consistió en 5g/L de Tiosulfato de sodio y fue disuelto en agua destilada a pH 4. Su esterilización fue mediante el uso de un filtro con membrana de 0.2 µm, previamente esterilizados en la autoclave a 121°C por 15 minutos – con la ayuda de una jeringa hacia otro matraz estéril. Luego ambas soluciones fueron mezcladas en el matraz más grande y finalmente se agregó el indicador Anaranjado de metilo (Anexo 1) y luego se procedió a distribuir a los tubos estériles, listos para ser sembrados con las colonias seleccionadas.
- c) El tercer y último medio en ser preparado fue el medio **“TK- H”**. La solución A consistió en disolver en 800ml agua destilada, 0.5g fosfato de potasio, 0.4g sulfato de amonio y 0.4g sulfato de magnesio. La solución A debió estar a un pH de 1.8 acidificado con H₂SO₄ 1N mediante un agitador magnético. La solución A se esterilizó por 15 minutos a 121°C. Luego, la solución B consistió en agregar Extracto de levadura al 0.02% -cuya preparación se encuentra en el anexo. Finalmente se esterilizaron las soluciones A y B en la autoclave a 121°C por 15 minutos y luego se procedió a distribuir a los tubos estériles, listos para ser sembrados con las colonias seleccionadas.

4.7.1 Procedimiento de Identificación

4.7.1.1 Observación

Como ya se mencionó, en aproximadamente dos semanas ya se pueden observar a simple vista las primeras colonias. Entonces el paso siguiente, es observar de manera más detallada la colonia, identificarlas y clasificarlas.

4.7.1.2 Macroscópica

Con un estereoscopio se procede a identificarlas por medio del estereoscopio (Beltec Scientific) por tamaño, color y características macro-morfológicas: forma (puntiforme, circular, rizoide, irregular o filamentosa); borde (entero, ondulado, o lobulado); elevación (plana, elevada, convexa, crateriforme o acuminada) y superficie (lisa o rugosa, mate o brillante, invasiva o superficial). Pero si esta no era una placa con colonias puras, se procedía a repicarlas en nuevas placas de Feo, FeSo o H que les correspondía.

4.7.1.3 Microscópica

Tiene la finalidad de distinguir a las células que conforman la colonia, es decir su forma bacteriana y si está compuesta de endosporas o cápsulas. Para observar las características estos organismos se procedió a realizar tinción Gram a las colonias y a observarlas mediante el microscopio.

- Tinción Gram

Durante todo el procedimiento y las colonias seleccionadas se les hizo un frotis con una gota de solución salina usando un asa de siembra estéril. A continuación fueron fijadas con calor en las láminas correspondientes. Luego que el frotis estaba listo se procedió a realizar la coloración Gram. Esta consiste en cubrir la muestra con cristal violeta por un minuto y se procede a lavarla con agua corriente. Luego cubrir la muestra con lugol, dejándolo actuar por un minuto y se procede a lavar con agua; y se decolora con alcohol acetona y se lava con agua corriente nuevamente. Para finalizar se cubre con safranina por 10 minutos, se procede a lavar y luego a secar con el mechero. Con la lámina ya lista se procede a observar la muestra en el microscopio e identificar la morfología y la coloración.

4.7.1.4 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas permiten ayudar a la identificación de las cepas purificadas. Se emplearon tres medios: TK, TK con Tiosulfato (TK-TIO) (74) y TK con componentes orgánicos (TK-H) (41) y así identificar su inclinación metabólica.

Se les llamó “TK- Fe” a la fórmula original que contiene $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y permitió saber si la colonia oxidaba hierro mediante la coloración naranja del medio a las 2 - 4 semanas de haber estado en incubación en su temperatura determinada. El segundo tubo fue “TK-TIO” que estaba preparado en base al medio TK con tiosulfato de sodio más el indicador Anaranjado de metilo que sirvió para identificar si oxidaba sulfatos y su identificación consistía en observar una coloración rosada o amarilla de acuerdo a la variación de acidez ocasionada por la bacteria con la capacidad de consumir sulfatos. Para la preparación y guía del indicador de Naranja de metilo, se tuvo que hacer una escala con cada nivel de pH ya que el indicador estaba en presentación sólida y se tenía que realizar una preparación líquida y homogénea del indicador.

Por último el tubo “TK- H” para saber si la colonia consumía compuesto orgánicos. La manera de identificación consistía en que el tubo debía presentar turbiedad uniforme a los largo del tubo. La preparación de cada uno estos tubos se hicieron por triplicado por cada placa purificada y en su temperatura correspondiente.

La lectura de los tubos se hizo entre 7-20 días para observar si había crecimiento, se consideró la oxidación a anaranjado para los tubos con “TK-Fe”, coloración a rosado (oxidación) o amarillo para los tubos con medio “TK-Tio” y mediante la observación de turbidez blanquesina para los tubos con medio “TK-H” y se verificó por fijación Gram y observación al microscopio. Un recuadro de la metodología empleada se encuentra en el anexo.

4.8 Fungicidas utilizados

En ambos tipos de medios líquidos y sólidos se aplicaron fungicidas para eliminar la contaminación en el proceso de purificación. Estos fueron: Itraconazol, Voriconazole, Fluconazol y Nistatina. Estos compuestos son azoles que son un anillo heterocíclico aromático y algunos átomos son sustituidos son reemplazados por nitrógeno, Itraconazol y Voriconazole, son triazoles que se caracterizan por el anillo con 3 átomos de nitrógeno. Estos se caracterizan por una mayor capacidad de acción que los imidazoles (Fluconazol). En principio se usó Itraconazol, que tuvo que ser preparado en el laboratorio. Se trituró la pastilla en un mortero estéril y se disolvió en etanol para que así sea más fácil la administración en los medios, la dosis fue de 2ml/L. Luego se empleó Nistatina. Este antifúngico posee una cadena cíclica de 37 átomos de carbono y uno de oxígeno con una D-micosamina desoxiazúcar y un aminoglucósido. Cuya presentación ya estaba en solución por lo que se usó sin preparación previa. Más adelante el fungicida usado fue Voriconazole, que al igual que el Itraconazol su presentación es en pastilla, así que se necesitó de una preparación previa con etanol.

Tanto Nistatina y Voriconazole, fueron ampliamente utilizados durante el proceso de purificación, debido a que la presencia de hongos no permitía el adecuado crecimiento de las bacterias objetivo. La dosis usada fue para ambos antifúngicos fue de 2ml/L. Finalmente se usó el Fluconazol 310ul/5ml, que también tiene una presentación en solución, como refuerzo a la combinación de Nistatina 1ml/L con Voriconazole 2ml/L para las placas finales de purificación. Los fungicidas se usaron de manera individual y en conjunto.

4.9 Preservación

La preservación de las cepas se basó en el manual de Bangor Acidophile Research Team (BART) de la Universidad de Bangor en Reino Unido (B. Johnson, comunicación reservada). Las bacterias acidófilas crecen en medio de cultivo en densidades bajas por eso se tuvo en un cultivo en fase media exponencial y se centrifugó. Luego se re-suspendió el pellet en 930 ul del medio de sales basales para acidófilas 50x (Anexo 1) tratando de obtener alrededor de 10^9 células por mililitro, y se puso todo en un crio-vial. Finalmente se agregó 70 ul de DMSO, se mezcló bien e inmediatamente se guardó en la congeladora a -70°C . Esta preparación se hizo por triplicado. Se realizaron repiques de las bacterias preservadas al mes y 2 meses para asegurar su viabilidad.

V. RESULTADOS

5.1 Determinación del pH inicial de las muestras

La solución de agua destilada con la muestra del Magnetita tuvo el pH inicial de 1.04. La solución de agua destilada con la muestra de Pirita tuvo un pH inicial de 4.6. El agua de la mina tuvo un pH inicial fue 2.7.

5.2 Adaptación de cepas

Las tres muestras estuvieron por un lapso de 4 semanas en constante agitación en el medio de adaptación TK. Como ya se mencionó, la adaptación a estas nuevas condiciones de crecimiento sí se dio porque se observó biofilm y oxidación del medio.

5.3 Conteo de cepas

Una vez llevada a cabo la adaptación de las cepas, se procedió al conteo de las colonias en cada muestra.

5.3.1 Conteo en Mineral Magnetita de Toquepala

En la Figura 1, se observa el crecimiento del número de las colonias en la muestra de mineral magnetita de Toquepala, durante el periodo de 60 días, entre las temperaturas y los medios de cultivos respectivos. Se observó que solo las cepas del medio FeSo a 28°C mostraron crecimiento, y se dio un mayor aumento durante los últimos 15 días del periodo. En la temperatura de 4°C solo hubo crecimiento de hongo y no se consideró en la gráfica.

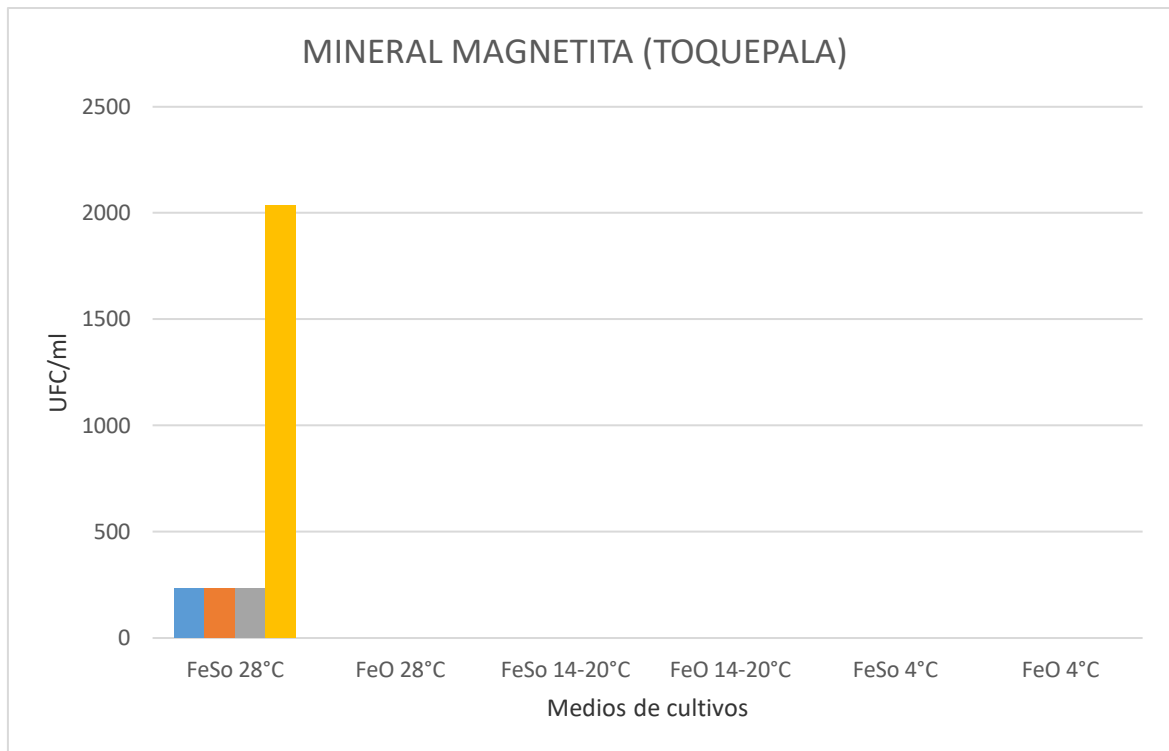


FIGURA 1: Crecimiento de colonias provenientes de la muestra de mineral Magnetita de Toquepala

5.3.2 Conteo en concentrado de Pirita de Poracota

En la Figura 2, se observa el crecimiento de las colonias en la muestra de Pirita de Poracota, durante el periodo de 60 días, entre las temperaturas y los medios de cultivos respectivos. Se observó que solo las colonias del medio FeSo a 28°C mostraron crecimiento, y este se dio durante los últimos 45 días del periodo.

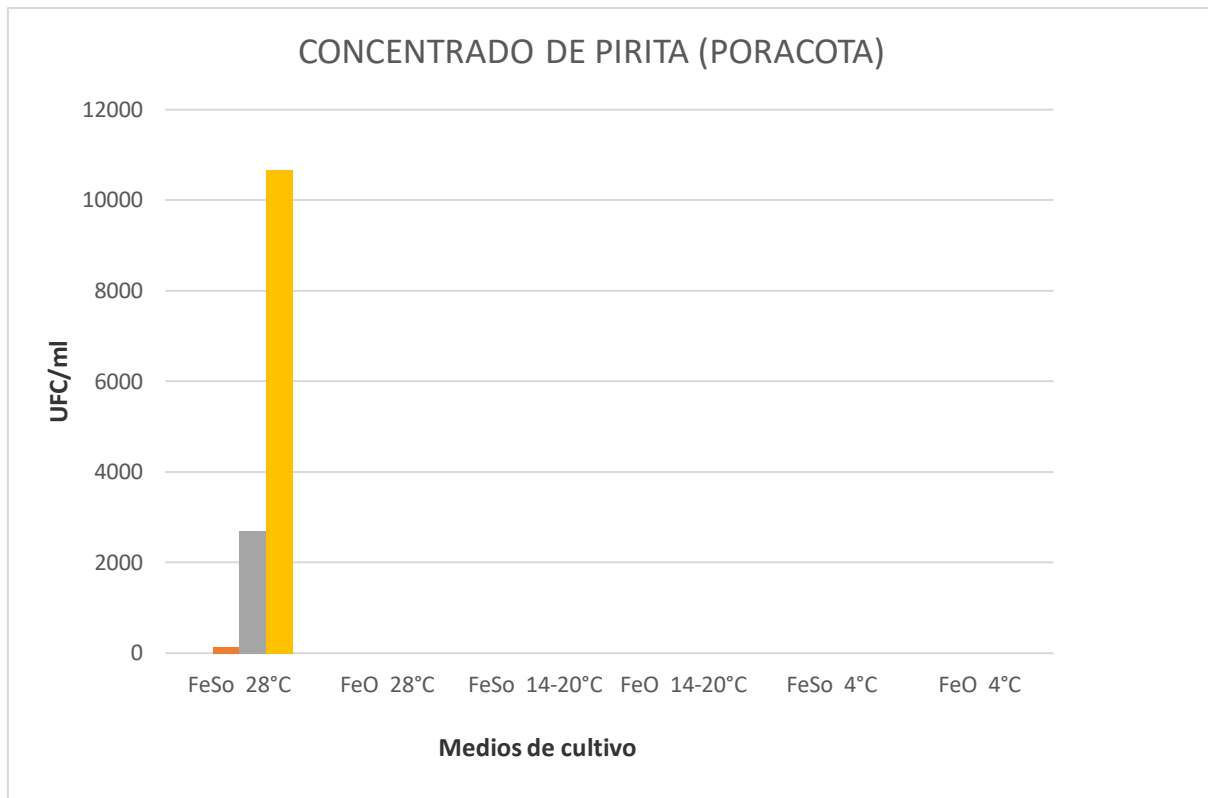


FIGURA 2: Crecimiento de colonias provenientes de la muestra de concentrado de Pirita de Poracota

5.3.3 Conteo en Agua de Mina de Quiruvilca

En la Figura 3, se observa el crecimiento de las colonias en la muestra de Agua de Mina de Quiruvilca, durante el periodo de 60 días, entre las tres temperaturas y los medios de cultivos respectivos. Aquí se observa que hubo mayor crecimiento en el medio sólido Feo a temperatura 14-20°C desde los primero 15 días. Aunque en el medio FeSo también hubo crecimiento, desde el principio y se incrementa luego de los 30 días de incubación, este no fue tan abundante como en el medio sin Tetrionato. A los 28°C de temperatura también se observa crecimiento de colonias en el medio Feo y se da después de los 15 días de incubación.

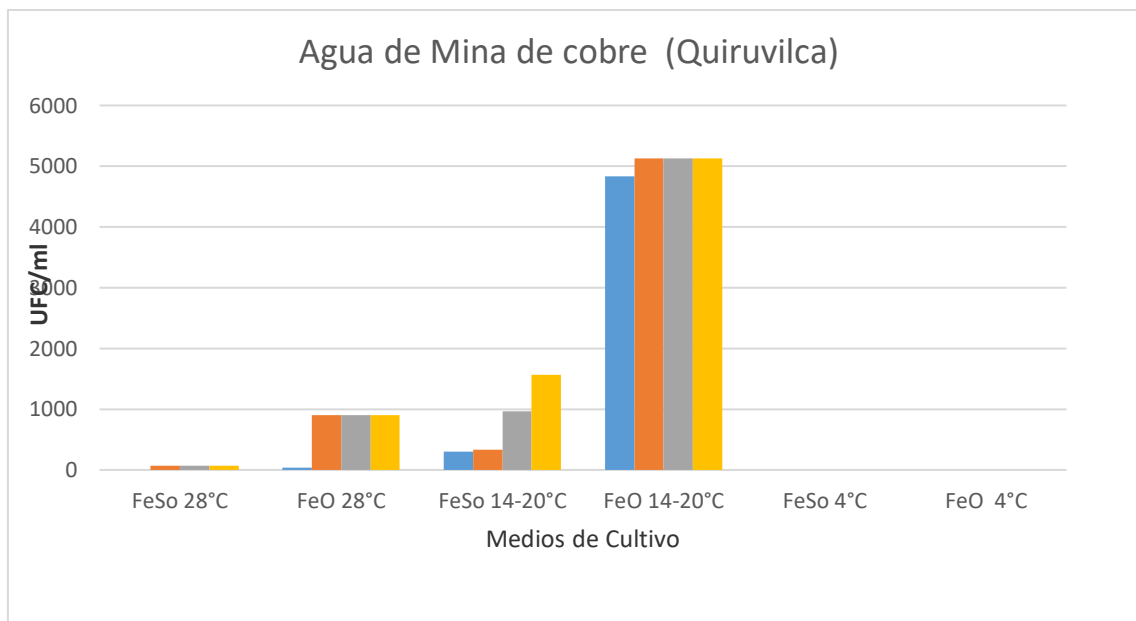


FIGURA 3: Crecimiento de colonias provenientes de la muestra Agua de mina de Quiruvilca

5.4 Descripción macroscópica y microscópica de las colonias de conteo

Como se trata de diferentes muestras, se describió a las colonias diferentes, por lo tanto se procedió a describirlas y hacer tinción Gram. Todos los medios fueron preparados con el antimicótico Itraconazol. Las imágenes y detalles más específicos de las colonias se encuentran en los anexos 5, 6, y 7.

Descripción en Magnetita de Toquepala: En esta muestra se identificaron tres colores de colonias, los cuales fueron: mostaza, amarillo y blanco. De las cuales solo las dos primeras, que crecieron a 28°C en medio FeSo, fueron bacterias. Mientras que el tercer tipo de colonia, el cual creció a 4°C, se observó filamentos de hongos.

Descripción en concentrado Pirita de Poracota: Durante el conteo de este concentrado, el mayor crecimiento se presentó en las placas FeSo a 28°C. En esta muestra se identificaron tres colores de colonias de origen bacteriano, las cuales se llamaron de color: anaranjado, translúcido y mostaza.

Descripción en Agua de Mina de Cobre de Quiruvilca: Durante el conteo de este líquido, el mayor crecimiento en número de colonias se presentó en temperatura 14-20°C (14-20°C). A esta temperatura se identificaron cuatro diferentes colores de colonias: crema, rosado, anaranjado-marrón se identificaron como bacterias y una colonias de color verde con halo amarillo que resultó ser un hongo cuando se revisó al microscopio. Mientras que a 28°C, se reconocieron tres colores marrón y anaranjado-

marrón que crecieron en medio Feo. Además las colonias de color muy blanco, que se las clasificó como “blanco puro” y crecieron en medio FeSo.

5.5 Purificación selectiva

El proceso de purificación fue casi a la par que el proceso de conteo y este tuvo varias etapas, las cuales dependen de las condiciones de cada cepa encontrada. Como ya se mencionó, hay un ejemplo del aislamiento detallado de la placa 4 A - cepa 323 del Agua de Mina de Quiruvilca donde se aprecia como esta cepa fue repicada, llevada a caldo líquido y finalmente fue purificada (Anexo 3).

5.6 Aislamiento

Durante el proceso de aislamiento, se pudo observar muchos organismos interesantes, pero no todos lograron ser purificados ya sea por contaminación o porque no volvieron a crecer en el repique. En total, se pudo obtener 26 cepas bacterianas, 9 levaduras y una actinobacteria.

5.7 Caracterización macroscópica y microscópica de las colonias purificadas

En el Anexo 4 se muestra una tabla con las fotos de las cepas aisladas y purificadas de las tres muestras. De estas cepas, 26 mostraron características oxidantes, es decir mostraron la variedad de tonos anaranjados propios de la oxidación. De esta misma tabla, 9 cepas fueron levaduras que se caracterizaron por poseer un color crema, aunque no todas eran de la misma forma. Solo se observó una posible actinobacteria (18P).

5.7.1 Caracterización en mineral Magnetita de Toquepala

A 28°C, se reconocieron dos cepas oxidantes (1M y 2M) que mostraron oxidación positiva en la prueba de Hierro, pero dio resultado negativo para las pruebas de oxidación de tiosulfato y crecimiento de heterótrofos.

A temperatura 14-20°C, se aisló a una colonia (4M) de color anaranjado con marrón, de apariencia amorfa esta cepa sí mostró oxidación para Tiosulfato y Hierro. La cepa 6M, era de color amarillo, al microscopio mostró bacilos Gram negativos. En las pruebas bioquímicas, tiosulfato y hierro fueron positivas. Lo que nos sugiere que ambas podrían ser una especie *Acidithiobacillus* hierrooxidante.

5.7.2 Caracterización en concentrado de Pirita de Poracota

En esta muestra de concentrado de pirita se identificó nueve cepas cuya coloración varió del anaranjado (16P) hasta el marrón muy oscuro (11P) (ver tabla 5, anexo 4), de las

cuales solo una (16P) se pudo aislar a temperatura 14-20°C y el resto fue a 28°C. Todas estas cepas mostraron oxidación para hierro y algunas a tiosulfato en las pruebas bioquímicas. Y de acuerdo a lo descrito anteriormente podría tratarse de bacterias del genero *Acidithiobacillus spp.* A 28°C también se aisló levaduras de color crema muy brillante y de diferentes formas y tamaños. Muchas mostraron oxidación para hierro y consumo de materia orgánica.

A temperatura 14-20°C, una cepa de color coral dio la apariencia ser una levadura, pero al microscopio resultó estas conformada de bacilos grandes y chicos. Las pruebas bioquímicas demostraron que consumía elementos orgánicos y oxidaba muy ligeramente hierro. Finalmente, este medio también mostró el crecimiento de un posible actino.

5.7.3 Caracterización en Agua de mina de cobre de Quiruvilca

En esta muestra, se pudo apreciar el crecimiento de cepas oxidantes a temperatura 14-20°C y la mayoría mostró oxidación por hierro y algunas por tiosulfato, lo cual al igual que las muestras de Pirita, sea de cepas del género *Acidithiobacillus spp.* Aunque hubo una cepa que estaba compuesta por bacterias de forma espiral 16 A que usó los tres antimicóticos, por lo que se trata de un *Leptospirillum spp.* Otra cepa interesante a temperatura 14-20°C son aquellas de color coral, pero a pesar del parecido en el color, su apariencia era diversa y al momento de revisarlas al microscopio, algunas cepas como 11 A y 12 A (Anexo 7) mostraron esporas, además de bacilos Gram negativo por tal mixtura de organismos encontrados, se les designó como colonias mixtas.

A 28°C solo se pudo purificar una cepa oxidante de hierro, pero también hay levaduras las cuales crecieron en medio Feo (H). Una colonia de color crema y otra rosada, crecieron en la misma placa FeSo, y ambas estuvieron compuestas de cocobacilos.

Además apareció una cepa anaranjada y otras translúcidas a 4°C, pero no lograron aislarse, ni hacer pruebas bioquímicas.

5.8 Pruebas bioquímicas

El resultado positivo de las pruebas bioquímicas se basó en el artículo de Johnson et al 2003. Para saber si era hierro oxidante se observaba formación de hierro férrico insoluble y viraje del medio a color amarillo-anaranjado. Para la prueba de oxidación de Tiosulfato (Tio) si se observaba viraje al color rosado del medio líquido con el indicador anaranjado de metilo y finalmente para saber si la colonia consumía compuesto orgánicos por su metabolismo heterótrofo (Het) entonces el resultado era positivo si se observaba turbiedad (74).

En la tabla 10 del Anexo 2, se muestra los resultados de las pruebas bioquímicas, para oxidación para hierro, tiosulfato y consumo de elementos orgánicos realizados a las muestras de conteo. Solo hubo resultados de la muestra de Agua de Mina de cobre de Quiruvilca. En la muestra de la placa A en medio Feo que creció a temperatura 14-20°C fue positivo para Hierro porque se observó viraje del medio a color amarillo-anaranjado. Las placas A, B, C que crecieron en medio FeSo a 28°C, no mostraron resultados positivos en las tres pruebas. En las placas A, B, C que crecieron en medio Feo a 28°C, resultaron positivas para la prueba de Hierro porque se observó viraje del medio a color amarillo-anaranjado y tiosulfato, porque se observó viraje de color rosado dado por el indicador anaranjado de metilo.

La tablas de los anexos 5, 6, 7 muestran las listas de los resultados de las cepas que se pudo aislar o purificar de tres muestras dadas. Solo se logró obtener resultado de 36 cepas.

Para la muestra de mineral magnetita de Toquepala, dos cepas a 28°C resultaron positivas por el viraje del medio a color amarillo-anaranjado. Mientras que la colonia verde 3M, dio positivo para Heterótrofos pero resultó ser un hongo. A temperatura 14-20°C, las muestras 4M y 6M dieron positivo para oxidaciones Hierro y Tiosulfato. Mientras que la muestra 5M, dio positivo para heterótrofos.

En la muestra de concentrado de Pirita de Poracota se logró realizar las pruebas bioquímicas a 17 cepas. De las cuales la gran mayoría de ellas creció 28°C. Donde las colonias 7P, 8P, 12P, 13P, 14P, 15P, mostraron resultado positivo para heterótrofos y hierro. Mientras que las colonias 1P, 4P, 5P, 6P, 9P, 10P, 11P solo mostraron viraje a color amarillo-anaranjado a la prueba de Hierro. La colonia 3P, mostró oxidación para tiosulfato y hierro; y la muestra 2P resultó ser positivo para Heterótrofos. Las colonias que crecieron a temperatura de 14-20°C, 16P y 17P, mostraron resultado positivo para hierro y heterótrofos.

Finalmente, solo a 16 colonias de Agua de Mina de cobre de Quiruvilca se les logró realizar las pruebas bioquímicas. A temperatura 14-20°C, las muestras 6 A, 9 A, 10 A y 15 A solo se les observó viraje del medio a color amarillo-anaranjado. Mientras que a las cepas 7 A, 11 A y 12 A, fueron positivas para Hierro y consumo de compuestos orgánicos (Heterótrofas). Las cepas 8 A y 14 A, fueron positivas para consumo de compuestos orgánicos (Heterótrofos) y las cepas, 13 A y 16 A, fueron las únicas que mostraron oxidación para Tiosulfato y Hierro. A 28°C, las cepas 2 A y 3 A, fueron negativas para las tres pruebas bioquímicas. Mientras que la cepa 1 A dio viraje del medio a color amarillo-anaranjado característico de Hierro y las cepas 4 A y 5 A, dieron

fueron positivas para Hierro y consumo de compuestos orgánicos (Heterótrofas). Cabe mencionar que las colonias de las placas A, B, C, del medio sólido FeSo para conteo, dieron resultados negativos a las tres pruebas realizadas, y no se pudieron repicar, por lo tanto no se pudo reconfirmar sus características.

5.9 Diversidad

Durante los eventos de conteo y purificación, se identificó siete diferentes colores en las muestras de mineral Magnetita estos fueron: anaranjado, mostaza, anaranjado marrón, marrón, amarillo, verde y blanco. Siendo los dos últimos actinobacteria y hongo respectivamente. Por la observación microscópica, el resto es de origen bacteriano. En la muestra de concentrado de pirita de Poracota se pudo identificar nueve colores de cepas que fueron: anaranjado, translúcida, mostaza, anaranjado-marrón, coral, crema, rojo, verde y blanco verdoso. Los resultados microscópicos mostraron que seis eran de forma bacteriana (bacilos), mientras que las colonias con características de color rojo era un hongo por los filamentos encontrados y las colonias verdes y blanco-verdosa son posibles actinobacterias. Mientras que las cepas de color crema, correspondía a levaduras.

En la tabla 3, se observa la distribución de los diferentes tipos de cepas aislados durante los procesos de conteo y purificación. Muestra como la muestra de mineral Magnetita de Toquepala tiene poca variedad de microorganismos. Mientras que la muestra de concentrado de Pirita de Poracota y de Agua de Mina de cobre de Quiruvilca, mostraron mayor variedad de color de cepa y tipo de microorganismo, ya que las cepas de color coral, resultaron ser levaduras.

5.9.1 Número de cepas aisladas por el efecto del medio de cultivo por purificación selectiva

Cepas que se pudieron aislar por el efecto del medio de cultivo en el aislamiento de diferentes colonias. Aunque no significa que pudieron mantenerse o realizarse pruebas bioquímicas.

| | Mineral de Magnetita de Toquepala | Concentrado de Pirita de Poracota | Agua de Mina de cobre de Quiruvilca |
|--------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Feo | 4 | 16 | 18 |
| FeSo | 3 | 0 | 5 |
| Feo(H) | 0 | 2 | 2 |

Tabla 1: Número de cepas aisladas por el efecto del medio de cultivo según el origen de las muestra.

5.9.2 Cepas aisladas por efecto de la temperatura por purificación selectiva

Se muestra el número de tipos cepas que lograron aislarse/purificarse de acuerdo a la temperatura pero no se llegaron a preservar.

| | Mineral de Magnetita de Toquepala | Concentrado de Pirita de Poracota | Agua de Mina de cobre de Quiruvilca |
|----------------|--|--|--|
| 28°C | 3 | 15 | 5 |
| 14-20°C | 3 | 3 | 12 |
| 4°C | 1 | 0 | 2 |

Tabla 2: Cantidad de cepas aisladas por el efecto de la temperatura según el origen de la muestra.

5.9.3 Distribución de las morfologías observadas

Durante la observación microscópica se logró observar las morfologías celulares de las que conformaban las cepas.

| Morfologías encontradas | Mineral de Magnetita de Toquepala | Concentrado de Pirita de Poracota | Agua de Mina de cobre de Quiruvilca |
|--------------------------------|--|--|--|
| Bacilo | 6 | 13 | 20 |
| Cocobacilos | 0 | 0 | 2 |
| Espirilo | 0 | 0 | 1 |
| Filamentos de actinobacteria | 0 | 1 | 0 |
| Levadura | 0 | 7 | 4 |
| Macroconidias de hongos | 1 | 0 | 0 |
| Hifas de hongos | 3 | 1 | 2 |

Tabla 3: Cantidad de las morfologías celulares observadas de las cepas aisladas.

5.10 Almacenamiento de las cepas

Se realizó la conservación de un total de 17 especies entre las 3 muestras estudiadas para posibles análisis del futuro y se encuentran en el medio DMSO a -70°C en los respectivos crioviales por triplicado.

VI. DISCUSIÓN

Los microorganismos han demostrado ser los seres vivos más abundantes y capaces de habitar cualquier tipo de ambiente por más extremo que sea, y la interacción entre microorganismo y mineral ha ocurrido en la naturaleza desde el comienzo de la vida (55). Las muestras provenientes de mineral Magnetita de Toquepala, concentrado de Pirita de Poracota y Agua de mina de cobre de Quiruvilca, a pesar de sus diferencias en composición y origen, han demostrado que comparten similitud en algunas cepas observadas como por ejemplo las cepas: 4M de mineral de Magnetita de Toquepala, 16P de concentrado de pirita de Poracota y 15 A de agua de Quiruvilca, todas a 14-20°C y las levaduras 14P, 15P de concentrado de pirita de Poracota con las cepas 3A, 4A y 5A de agua de mina de cobre de Quiruvilca a 28°C.

La aplicación de medios de cultivos ha permitido por décadas ser la vía más eficaz para el desarrollo de los microorganismos. Es por eso que para este proyecto se usó los medios sólidos Feo y FeSo para la obtención de bacterias acidófilas hierro y sulfato oxidantes para procesos de conteo y aislamiento en las tres diferentes muestras (56, 57). Los medios mencionados estuvieron basados en el medio realizado por Johnson 1995 (20), quien preparó los medios utilizando a la bacteria *Acidiphillum* SJH, la cual posee la capacidad de consumir materia orgánica y permite el mejor crecimiento de las bacterias acidófilas ferroxidantes que muchas veces son inhibidas por los restos orgánicos del agar. Pero en este caso no se tuvo esa bacteria y posiblemente la ausencia de esta nos dio un poco de sesgo en los resultados obtenidos.

Según Johnson et al 2003 (58) la técnica de plaqueo en superposición es muy efectiva para la enumeración y aislamiento de microorganismos que habitan ambientes extremos en acidez. Respecto al medio FeSo, permitió el crecimiento de colonias ferroxidantes y posiblemente también de cepas consumidoras de azufre pero que no se pudo mantener ni identificar. Aun así no se observó una gran diferencia entre las oxidantes que crecieron en FeSo como en Feo, tanto en conteo o durante los procesos de repique hubo la oxidación del hierro ferroso (56). Pero como no todas las colonias tenían características de oxidantes al observarlas, se procedió a hacer una modificación de la preparación de las placas Feo para así identificarlas mejor. Por lo que ya no se eliminó la materia orgánica del agar Oxoid L28 mediante lavado con alcohol. A este tipo de placa se les llamó "H(Feo)" (Anexo 1). Los medios Feo y FeSo se modificaron en versiones líquidas (es decir sin agar) en este proyecto para purificar a las colonias con la finalidad

de proveer las mismas concentraciones de nutrientes a las colonias que cuando estaban en las placas.

Las temperaturas utilizadas para este proyecto, fueron elegidas porque nos permiten seleccionar el tipo de bacterias que existe entre las poblaciones para concentrado y mineral magnetita. La temperatura de 28°C es la óptima en promedio de los microorganismos involucrados en los procesos de lixiviación (56). Así también se llevó a cabo a temperaturas de 14-20°C y 4°C, porque como se describió, las zonas donde se encuentran los asentamientos mineros son de ambientes fríos y la temperatura varía drásticamente entre el día y la noche y además porque se ha hallado evidencia de bacterias psicrotolerantes quimiolitótrofas (59).

Con la finalidad de evitar la aparición de hongos *Aspergillus* que se presencié durante las primeras etapas, se procedió a agregar al medio sólido y líquido de Feo y FeSo el antimicótico Itraconazol porque los azoles (compuesto heterocíclico aromático, algunos átomos son sustituidos por nitrógeno u otro elemento diferente al átomo de carbono) afectan la membrana celular de los hongos al bloquear la desmetilación (alfa-demetilasa) del citocromo p450 dependiente de lanosterol y esto ocasiona la inhibición de la síntesis de ergosterol, ocasionando que los metilesteroles tóxicos se acumulen en la membrana celular y se debilite el organismo, como consecuencia el hongo ya no crece, ni se multiplica (60, 61). Posteriormente nos dimos cuenta de la presencia de levaduras en algunas placas, por lo cual se usó voriconazol porque es un triazol que además de la capacidad de eliminar hongos filamentosos, posee la capacidad de eliminar levaduras. Pero, no fue efectivo en su totalidad porque aún aparecieron hongos y levaduras, posiblemente porque el medio era estos organismos adquieren mecanismos para ser resistentes, ya sea por la modificación del gen ERG11, el cual codifica el 14-lanosterol desmetilasa, hay una sobre expresión del ya mencionado gen o hay una activación de vías metabólicas, aunque se le atribuye menos eficacia. Según Alberto Fica (75) el Fluconazol el Voriconazole, logra inhibir mejor la actividad de cándidas que el Fluconazol ya que estas adquieren o ya tienen una resistencia al Fluconazol. Aunque se ha visto que las cándidas tienen mayor sensibilidad al voriconazole que al Fluconazol (Peman), existe evidencia que hay fenotipos resistentes a Itraconazol y Fluconazol que también son resistentes al Voriconazole.

Durante el proceso de identificación microscópica, se observó que no todas las bacterias se lograban teñir y se procedió a extender el tiempo de acción de la safranina hasta 10 minutos. Pero al no tener la visualización adecuada en el microscopio se procedió a utilizar otra técnica de coloración, la cual consistía en reemplazar la solución de

safranina con el colorante fucsina y esperar 10 segundos, ya que su capacidad de tinción era más rápida (62). Debido a esto, se usó Fucsina, sobre todo para las muestras que considerábamos puras ya que así nos daba una mejor visualización de la morfología de las bacterias acidófilas.

En la muestra de **mineral Magnetita de Toquepala**, el conteo de microorganismos fue mínimo en promedio. Posiblemente por tratarse de una muestra pura con un solo tipo de sulfuro que reduce la diversidad de bacterias. Asimismo fue muy difícil aislar a los microorganismos en la magnetita por la presencia de hongos. Durante el conteo de colonias el crecimiento aumentó recién a partir de los 45 días, entonces posiblemente necesitarían más tiempo de incubación. Pero se pudo observar la formación de una singular colonia de la placa en medio FeSo placa A , a 28°C (Anexo 5- figura 6- página 50) de color mostaza de 2mm de diámetro de circular, borde lobulado, elevación plana y de superficie rugosa, mate y seca; pero no pudo aislarse. Lo mismo ocurrió con las cepas obtenidas de la muestra de Magnetita que tampoco pudieron conservarse. Pero se logró identificar colonias representativas oxidantes de hierro 1M, 2M (28°C) y 4 M (14-20°C) como los posibles *Acidithiobacillus spp.* O *Acidithiobacillus ferrooxidans*. También un posible *Acidithiobacillus thiooxidans* proveniente de la colonia 6M, que creció en medio FeSo y mostró un color amarillo. A 4°C aparecieron colonias blanquesinas (7M) tardó 150 días pero al verlas al microscopio, resultó ser filamentos de hongo (Anexo 5).

Para la muestra de **concentrado Pirita de Poracota**, respecto al resultado obtenido en el conteo de colonias fue similar al obtenido al de la muestra del mineral Magnetita, ya que solo hubo crecimiento en las placas de FeSo a 28°C sobre todo después de los 45 días de incubación. Como ya se mencionó en los resultados durante el proceso de aislamiento y purificación de esta muestra el mayor número de colonias ferrooxidantes aisladas fue a 28°C, entonces posiblemente las colonias de esta muestra en su mayoría sean mesófilas sobretodo porque es la temperatura en que se da el proceso de lixiviación (56). En esta muestra se identificó la presencia de levaduras. Muchas se caracterizaron por ser de color crema brillante y por crecer solo a 28°C. Por eso se decidió sembrar en medio modificado llamado Feo (H) que se preparó sin lavar el agar oxoid con alcohol, permitiendo que los componentes se mantengan y permitan un mejor crecimiento de la levadura. Aunque existen pocos reportes de levaduras en minerales, se sabe que forman parte también del ecosistema minero (63). Además Singh et al 2013, menciona que las condiciones redox, acidez, temperatura, suplemento de oxígeno y condiciones químicas de la solución oxidante cambia grandemente y la microflora nativa se mezcla durante la actividad de lixiviación por lo que se justificaría, por qué no todas

las colonias lograron aislarse y posiblemente no todas las bacterias sean nativas del mineral original extraído, sino que pudieron ser adquiridas durante el proceso del concentrado.

La muestra de **agua de mina de cobre de Quiruvilca** durante el conteo de microorganismos (Anexo 7- figura 3-página 58) mostró crecimiento en el medio Feo a 14-20°C que es la temperatura promedio de la zona. A 28°C, se evidenció la formación de colonias a los 15 días, entonces es probable que exista una gran población nativa de formación de colonias ferroxidantes que prefieren temperaturas más bajas. Según Brett & Jillian 2016 (57) existe un incremento de los hallazgos sobre la riqueza de las comunidades que forman parte de las aguas de mina y así más microorganismos nativos están siendo identificados y formando parte de las bibliotecas de genomas.

De la muestra de agua de mina de cobre de Quiruvilca, se pudo aislar una colonia oxidante a 4°C, nos da la idea de que podría ser *Acidithiobacillus ferrooxidans* (59) o *Acidithiobacillus ferriphilus* (25) que afirman la presencia de estas especies bacterianas a temperatura similares, demostrando su gran flexibilidad al poder desarrollarse a una temperatura poco habitual.

Aun así la presencia de cultivos mixtos es esperada (58) y podría ser tomada como ventaja (económica y aplicada) para la disolución de minerales. Así mismo se ha podido aislar heterótrofos como las levaduras de las muestras de concentrado de Pirita y agua de mina de Quiruvilca y estos microorganismos podrían estar desarrollando algún rol en el ciclo de oxidación para el agua de mina o en lixiviación del concentrado de Pirita. Las aguas de mina presentan una gran variedad de protistas pero también existen eucariontes y juegan un rol importante en la biogeoquímica de la tierra (63). Según lo investigado por Orbegozo et al 2008 (64) hay poco conocimiento de las levaduras en ambientes ácidos como agua de minas, sobre todo en el Perú. A pesar de su gran distribución en ambientes extremos, esto también se debe a sus genes "heat-shock" que le atribuyen una gran capacidad de tolerancia (65). La identificación detallada de las colonias de levaduras halladas podría traer grandes beneficios ya que poseen la capacidad de acumular metales y usarse para tratamientos de ambientes contaminados pesados (66).

En todas las muestras estudiadas, la presencia de hongos filamentosos fue habitual durante los procesos y aunque son importantes microorganismos en el ecosistema minero, el aislamiento de estos microorganismos no fue el objetivo de esta tesis.

Además se observó halos transparentes alrededor (coloración anaranjada) de las colonias y el resto del medio estaba oxidado (Anexo 7: Agua de Mina - 17 A). La placa

17 A estuvo mucho tiempo almacenada y posiblemente las zonas transparentes y anaranjadas sean producto de lixiviación por agentes quelantes. Podría deberse a que las bacterias están produciendo estos agentes quelantes, que le permitan crear las condiciones adecuadas para su supervivencia. Según Klaus Bosecker (67) podría ser lixiviación heterotrófica ya que hay evidencia de que algunas bacterias y hongos disuelvan metales mediante la producción de agentes complejos o quelantes sobre todo si hay óxido de hierro. Los agentes quelantes muchas veces secuestran los metales pesados, pero también puede existir agentes quelantes producidos por una bacteria o un hongo que pueden servir para remover la impurezas.

La identificación y pureza de las colonias se hizo primeramente por microscopia (tinción Gram) pero estos no revelan la diversidad filogenética, por lo que para determinar de manera preliminar, a muchas de las colonias, se basó en la morfología de colonias presentada por Johnson et al. 2005 (68) cuyas imágenes ayudaron a relacionar las colonias puras obtenidas con el medio y temperatura. Luego se hizo pruebas bioquímicas para verificar la oxidación de Hierro, oxidación de tiosulfato o crecimiento heterótrofo de manera cualitativa. Lo que nos permitió determinar las características importantes del metabolismo de estos microorganismos. Cabe resaltar que aislar un determinado microorganismo no informa realmente la importancia ecológica que este tiene en su hábitat natural, solo demuestra que el organismo o los organismos estaban presentes en las muestras estudiadas (69).

Para complementar los resultados de identificación de las colonias aisladas sería necesario continuar con pruebas moleculares para su identificación.

Dentro de la diversidad bacteriana presente existe una gran cantidad de bacterias que todavía no han sido cultivadas en medios sólidos, por lo que sería importante realizar pruebas moleculares y la identificación de microorganismos no cultivables para poder estudiar e identificar mejor la diversidad. Se puede emplear métodos no cultivables para identificar microorganismos como las pruebas moleculares, que han permitido identificar más microorganismos en los últimos años (70, 71). Como por ejemplo, podría aplicarse la metagenómica, que permite identificar los diferentes organismos, mediante secuencias específicas, y así se podría determinar algunas capacidades y posibles funciones que desarrollarían en su ecosistema (71). Entre ellas mediante el uso de genes específicos por PCR, electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (DGGE), o mediante polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción terminales T-RFLP.

Cabe resaltar, que las técnicas de aislamiento son necesarias para poder hacer una manipulación directa y dirigida de microorganismos sobre todo para usos de aplicación

biotecnológica y microbiología industrial. Porque permite tener un monitoreo más eficiente durante estos procesos (56) y potenciar el trabajado de investigación.

Como resultado de este trabajo, las cepas aisladas pueden tener posible aplicación en el desarrollo de procesos de recuperación de metales, biorremediación u otros.

VII. CONCLUSIONES

- Se identificó 4, 7 y 15 bacterias de mineral magnetita de Toquepala, concentrado de pirita de Poracota y de agua de mina de Quiruvilca respectivamente. Mostrando una diversidad de bacterias dependiendo de las muestras de origen.
- En la muestra de mineral magnetita de Toquepala se identificó *Acidithiobacillus spp.*, mostrando capacidad de oxidar hierro ferroso y tiosulfato.
- En la muestra de concentrado de Pirita se identificó *Acidithiobacillus spp.* *Acidithiobacillus ferrooxidans* por mostrando capacidad de oxidar hierro ferroso y tiosulfato.
- En la muestra de agua de mina de cobre de Quiruvilca se identificó *Acidithiobacillus spp.* *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum spp.* *Acidiphilum spp.*, por mostrar capacidad de oxidar hierro ferroso, tiosulfato y utilizar compuesto orgánicos.
- Se preservó 17 cepas de microorganismos.
- Se aisló 9 cepas de levaduras en las muestras de concentrado de pirita de Poracota y agua de mina de Quiruvilca las cuales fueron resistentes a los antimicóticos usados.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas moleculares de identificación de las cepas preservadas.
- Realizar pruebas de aplicación en procesos de lixiviación y biorremediación con los microorganismos preservados.
- Obtener la cepa de *Acidiphilum SJH* y aplicarla en el método de doble capa en la preparación de medios sólidos Feo y FeSo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Lovera Dávila D. Historia, procesos, producción y redes metalúrgicas. Consejo Superior de Investigadores. 2005; (55):13–9.
2. Valega IM. El Virreinato del Perú. Editorial Cultura Ecléctica, Lima. 1939
3. Dammert Lira A, Molinelli Aristondo F. Panorama de la Minería del Perú. Osinergmin. 2007; (1):43-52.
4. Dold B. Evolution of Acid Mine Drainage Formation in Sulphidic Mine Tailings. Minerals. 2014; (4): 621-641
5. Imris I, Sánchez M. Pirometalurgia del cobre y comportamiento de sistemas fundidos. 2002
6. Ministerio de Energía y Minas del Gobierno de Colombia. Glosario técnico minero. 2005.
7. Mining Watch Canada. Acid Mine Drainage: Mining and Water Pollution Issues in British Columbia. 2006. Publicado por BC Wild and Environmental Mining Council of BC. (1):5
8. Baker BJ, Banfiel JF. Microbial communities in acid mine drainage. FEMS Microbiology Ecology. 2003; (44):139-152.
9. Macroconsult. Impacto Económico de la Minería Sociedad Nacional de Minería, Petróleo y energía en el Perú. 2012:4-16.
10. Ministerio Nacional de Energías y Minas del Gobierno de Perú. Reporte Anual Boletín estadístico del subsector minero. 2016
11. Aguirre R. Biolixiviación. Las bacterias y la minería del cobre. Revista Creces, 1987. Disponible en: <http://www.creces.cl/new/printart.asp?tc=1&nc=5&tit=&art=286>
12. Holmes D, Menacho J. Biolixiviación, la nueva minería. Área de Innovación y Desarrollo Estratégico Centro de Investigación Minera y Metalúrgica Santiago. 2005.
13. Lagos C, Guzmán X. Biolixiviación: Desarrollo Actual y Sus Expectativas. N° 187.464. 2009.
14. Alpaca Arena, M. Biolixiviación nueva: La opción metalúrgica. Revista del instituto de investigación de la facultad de geología, minas, metalurgia y ciencias geográficas. UNMSM. 1998(2). Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v01_n2/biolix.htm
15. Capello, R; Donovarros, C y Giono, S. La Diversidad microbiana en México. CONABIO. Biodiversitas. 2000; (32): 6–10.

16. Locey KJ; Lennon JT. Scaling laws predict global microbial diversity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2016(113):5970-5975
17. Olalde Portugal V, Aguilera Gómez L. Microorganismos y Biodiversidad. Terra Latinoamericana. 1998 (16):289–92.
18. Colmer AR, Temple KL, Hinkle ME. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. J Bacteriol. 1950; 59(3): 317–328.
19. Pradhan N, Nathsarma KC, Srinivasa Rao K, SuklaLB ,Mishra BK. Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. Minerals Engineering. 2008; (21): 355-365.
20. Johnson DB. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. Journal of Microbiological Methods. 1995; 205 – 218.
21. Johnson DB, Okibe N, Hallber KB. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. Journal of Microbiological Methods. 2005 (60): 299– 313.
22. Leathen WW, Madison KM. The oxidation of ferrous iron by bacteria found in acid mine waters. Bact. Proc. 1949 (64).
23. Hallberg K, González-Toril E, Johnson D. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp.nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. Extremophiles. 2009; 14(1):9-19.
24. Hedrich S, Johnson D. *Acidithiobacillus ferridurans* sp. nov., an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic gammaproteobacterium. International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. 2013; 63(11):4018-4025.
25. Falagán C, Johnson D. *Acidithiobacillus ferriphilus* sp. nov., a facultatively anaerobic iron- and sulfur-metabolizing extreme acidophile. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016; 66 (1):206-211.
26. Hallberg KB, Lindstrom EB. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. E. Microbiology 140(12):3451-3456- 1995-619
27. Rawlings DE; Tributsch H and Hansford GS. Reasons why 'Leptospirillum'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. Microbiology.1999; (145):5-13.
28. Clark DA y Norris PR. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with Sulfobacillus species P. Microbiology. 1996; 142(4):785-790.

29. Brock T, Brock K, Belly R, Weiss R. *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv for Mikrobiologie*. 1972; 84(1):54-68.
30. Golyshina OV, Pivovarova TA, Karavaiko GI, Kondrat'eva TF, Moore ERB, Abraham WR, Lunsdorf H, Timmis KN, Yakimov MM and Golyshin PN. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2000; 60: 997-1006.
31. Harrison Jr AP. *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., Heterotrophic Bacterium From Acidic Mineral Environments. *International Journal Of Systematic Bacteriology*. 1981; 31(3): 327-332.
32. Wichlacz PL, Unz RF, Langworthy TA. *Acidiphilium angustum* sp. nov. *Acidiphilium facilis* sp. nov. and *Acidiphilium vubrum* sp. nov. : Acidophilic Heterotrophic Bacteria Isolated from Acidic Coal Mine Drainage. *International Journal Of Systematic Bacteriology*. 1986; 36(2): 197-201.
33. Hallberg KB, Hedrich S, Johnson DB. *Acidiferrobacter thiooxydans*, gen. nov. sp. nov.; an acidophilic, thermo-tolerant, facultatively anaerobic iron- and sulfur-oxidizer of the family *Ectothiorhodospiraceae*. *Extremophiles*. 2011; 15(2):271-279.
34. Johnson DB, Bacelar-Nicolau P, Okibe N, Thomas A, Hallberg KB. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *International journal of systematic bacteriology*. 2009; 59 (Pt 5):1082-1089
35. Moreira D, Amils R. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*. 1997; 47(2):522-528.
36. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock *biología de los microorganismos*. Pearson. 12(4): Capítulo 22: 721
Waksman SA, JS Joffe. Acid production by a new sulfur oxidizing bacterium. *Science*. 1921 (53):216
37. Colmer AR, Temple KL, Hinkle ME. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J Bacteriol*. 1950; 59(3): 317–328.
38. Bryant RD, McGroarty KM, Costerton JW, Laishley EJ. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). *Canadian Journal of Microbiology*, 1983; 29(9): 1159-1170

39. Guay R, and Silver M. *Thiobacillus acidophilus* sp. nov.; isolation and some physiological characteristics. Can. J. Microbiol. 1975; (21):281-288.
40. Johnson DB, McGinness S. Ferric iron reduction by acidophilic heterotrophic bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 1991; 57(1): 207-211
41. Ossa M, Márquez M. Biooxidación de sulfuros mediante cepas nativas de acidófilos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *thiooxidans*, mina de oro el Zancudo, (Titiribí, Colombia). Revista Colombiana de biotecnología. 2005; 7 (2): 55-66.
42. Macroconsult. Impacto Económico de la Minería del Perú. Sociedad Nacional de Minería, Petróleo y energía en el Perú. 2012; (1): 4-16.
43. USGS Minerals Information: Mineral Commodity Summaries [Internet]. Minerals.usgs.gov. 2017. Disponible en:
<https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/mcs/>
44. Guerrero R, Berlanga M. Bacterias magnetotáticas, hoy y hace 3800 millones de años. Actualidad SEM. 2000; 29:14-20.
45. Yan L, Zhang S, Chen P, Wang W, Wang Y, Li H. Magnetic properties of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Materials Science and Engineering. 2013; (33)7: 4026-4031
46. Aduvire O. Drenaje Ácido de mina: Generación y Tratamiento. 2006.
47. Kovalenko TV, Karavaiko GI. Effect of temperature on the resistance of *Thiobacillus ferrooxidans* to divalent copper ions. Microbiologiya. 1981; 50:690-695.
48. Biosigma S.A. (2016). Bacteria strain wenelen DSM 16786, use of said bacteria for leaching of ores or concentrates containing metallic sulfide mineral species and leaching processes based on the use of said bacteria or mixtures that contain said bacteria. US7601530 B2.
49. Pellant C. Rocas y minerales: una guía visual. OMEGA. 1993; (1):40
50. Espinoza Soriano W. San José de Quiruvilca - Origen y vicisitudes de un asiento minero. Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2011; (15)27.
51. Mendoza SR. Monografía de la Provincia de Santiago de Chuco en el cincuentenario de su fundación, 3 de noviembre de 1900-1950. Editorial del CIMP, 1951.
52. Informe Especial Unidad Minera Orcopampa. Revista online: Tecnología minera. 2014; 44. Disponible en:
<http://www.tecnologiaminera.com/tm/biblioteca/articulo.php?id=111>
53. Tuovinen O, Kelly D. Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. Archiv für Mikrobiologie. 1973; 88(4):285-298.

54. Trudinger PA, Walter M, Ralph BJ. Biogeochemistry of ancient and modern environments. Australian Academy of Science. 1980;(4): 7–27.
55. Singh S, Panda S, Mishra S, Pradhan N, Mohanty RC, Sukla LB. Evaluation of microbial population and attachment study during bio-heap leaching at Malanjkhand copper project. International Journal of Environment and Waste Management. 2013; 11(1):75–86.
56. Baker BJ, Banfield JF. Microbial communities in acid mine drainage FEMS Microbiology Ecology. 2003; (44):139-152.
57. Okibe N, Gericke M, Hallberg KB, Johnson DB. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:1936–1943
58. Dopson M. Psychrotolerant Acidophiles. Un-published. 2006.
59. Lat A, Thompson G. Update on the optimal use of voriconazole for invasive fungal infections. Infection and Drug Resistance. 2011; 4: 43–53.
60. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. A new triazole, Voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2492-2496.
61. Rodriguez-Leiva M, Pichuanes S. A simple improved method to stain *Thiobacillus*. Canadian Journal of Microbiology. 1978; 24(6):756-757.
62. Patel MJ, Tipre DR, Dave SR. Isolation and identification of a *Candida digboiensis* strain from an extreme acid mine drainage of the Lignite Mine, Gujarat. Journal of Basic Microbiology. 2009; (49):564-571.
63. Orbegozo J, Abanto M, García R, Ramirez P. Identificación molecular de *Pichiaguillermundii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados. Revista Peruana de biología. 2008; 15(1):91-96.
64. Baker B, Lutz MA, Dawson SC. Bond PL, Banfield JF. Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. Applied and Environmental Microbiology. 2004; 70: 6264-6271.
65. Kaszycki P, Fedorovych D, Ksheminska H, Babyak L, Wójcik D, Koloczek H, Kaszycki P. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. Microbiological Research. 2004; (159):11-17.
66. Bosecker, K. Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. FEMS Microbiology Reviews. 1997; 20: 591–604.
67. Johnson DB, Okibe N, Hallberg KB. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. Journal of Microbiological Methods. 2005; 60: 299–313

68. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock biología de los microorganismos. Pearson. 12(5): Capítulo 22: 723
69. Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007; 75(5): 955–962.
70. Bonilla-Rosso G, Souza V, Eguiarte LE. Metagenómica, Genómica y Ecología Molecular: La Nueva Ecología en el bicentenario de Darwin. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2008; 11(1):41-51.
71. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock biología de los microorganismos. Pearson. 12(5): Capítulo 20: 663-665
72. Visca P, Bianchi E, Polidoro M, Buonfiglio V, Valenti P, Ors N.A new solid medium for isolating and enumerating *thiobacillus ferrooxidans*. The Journal of General and Applied microbiology. 1989, 35(2):71-81
73. Matsubara A.,Hurtado J. E.Isolation and Characterization of Actinomycetes from Acidic Cultures of Ores and Concentrates. Advanced Materials Research. 2013; 825:406-409.
74. Fica A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazole. Revista Chilena de Infectología. 2004; 21 (1): 26-38
75. Antonijević MM, Marić M. Determination of the Content of Heavy Metals in Pyrite Contaminated Soil and Plants. Sensors (Basel). 2008; 8(9): 5857–5865.

X. ANEXOS

ANEXO 1: Composición y preparación de soluciones

1. Soluciones

a. Solución de Sales Basales heterotróficas 10x (73)

0.5 g de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

4.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.5 g de KCl

5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.5 g de KH_2PO_4

0.14 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Todos estos compuestos son disueltos en un litro de agua destilada a pH 2.5 y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C.

b. Solución de Sales Basales 10x (73)

12.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Son mezcladas en un litro de agua destilada a pH 2.5 y se lleva a esterilizar por 15 minutos a 121°C.

c. Solución de Sales Basales para acidófilas 50X para 1L (B. Johnson, comunicación reservada).

7.5 g de $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$

22.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2.5 g de KCl

25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2.5 g de KH_2PO_4

0.7 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Se mezclan los compuestos en un litro de agua destilada. Luego se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 120°C. Luego se agrega 100uM de hierro ferroso de la solución stock 100X para 1L que debe ser preparado previamente con agua ácida a pH 1.8 y esterilizada con filtro de 0.2u.

d. Solución de elementos traza (20)

(Usado a 1ml/L de medio completo) (g/L en 0.01 M H₂SO₄)

10g de ZnSO₄·7H₂O

1 g de CuSO₄·5H₂O

1 g de MnSO₄·4H₂O

1 g de CoSO₄·H₂O

0.5 g de Cr₂(SO₄)₃·15H₂O

0.6g de H₃BO₃

0.5 g de Na₂MoO₄·2H₂O

1 g de Ni SO₄·6H₂O

1 g de Na₂SeO₄·10H₂O

0.1 g de Na₂WO₄·2H₂O

0.1 g de NaVO₃

Para hacer esta solución, se ajusta la acidez de 800ml de agua destilada a pH 2.0 con H₂SO₄. Luego se agregan los elementos dados en el orden dado, permitiendo que cada uno se disuelva antes de agregar el siguiente. No se debe olvidar revisar el pH y mantenerlo a 2.0 con 10N de H₂SO₄. Después de la adición de vanadato de sodio (NaVO₃), se completa hasta 100ml con agua destilada, y se ajusta al final a pH a 2.0.

e. Solución extracto de levadura 0.02% (20)

0.02 g de extracto de levadura

100ml de agua destilada

Se mezclan los compuestos y se esteriliza en la autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

f. Agua ácida (20)

Para la preparación de agua ácida se necesita agua destilada y agregar ácido sulfúrico hasta llegar al pH requerido. Se puede utilizar un agitador magnético para homogenizar más rápido la solución. Luego es esterilizado en la autoclave por 15 minutos a 121°C.

g. Indicador Anaranjado de Metilo

La preparación consiste en 10ml de 0.1 g de Anaranjado de Metilo con 90 ml de agua destilada estéril. Esta solución se debe mantener en un envase oscuro y totalmente cerrado.

h. Coloración Gram

- Cristal violeta 0.5 %

0.5 g de cristal violeta ($C_{25}H_{30}ClN_3$)

100 ml de agua destilada

Se agrega el cristal violeta y se mezcla con el agua destilada. Se recomienda el uso de esta preparación con la ayuda de un gotero y que el envase sea oscuro o ámbar para evitar el ingreso de la luz y su posible alteración.

- Lugol

1 g de yodo (I_2)

2 g de yoduro potásico (KI)

100 ml de agua destilada

Se recomienda el uso de este mordiente con la ayuda de un gotero y que el envase sea oscuro o ámbar para evitar el ingreso de la luz y su posible alteración.

- Alcohol :acetona (7:3 v/v)

70 ml de alcohol

30 ml de acetona

Esta preparación no necesita de un envase especial pero sí de un gotero.

- Safranina 0.25 %

0.25 g de safranina $C_{20}H_{19}ClN_4$

100 ml de agua destilada

Se debe mezclar bien la safranina con el agua destilada. Se recomienda el uso de esta preparación con la ayuda de un gotero y que el envase sea oscuro o ámbar para evitar el ingreso de la luz y su posible alteración.

- Fucsina básica

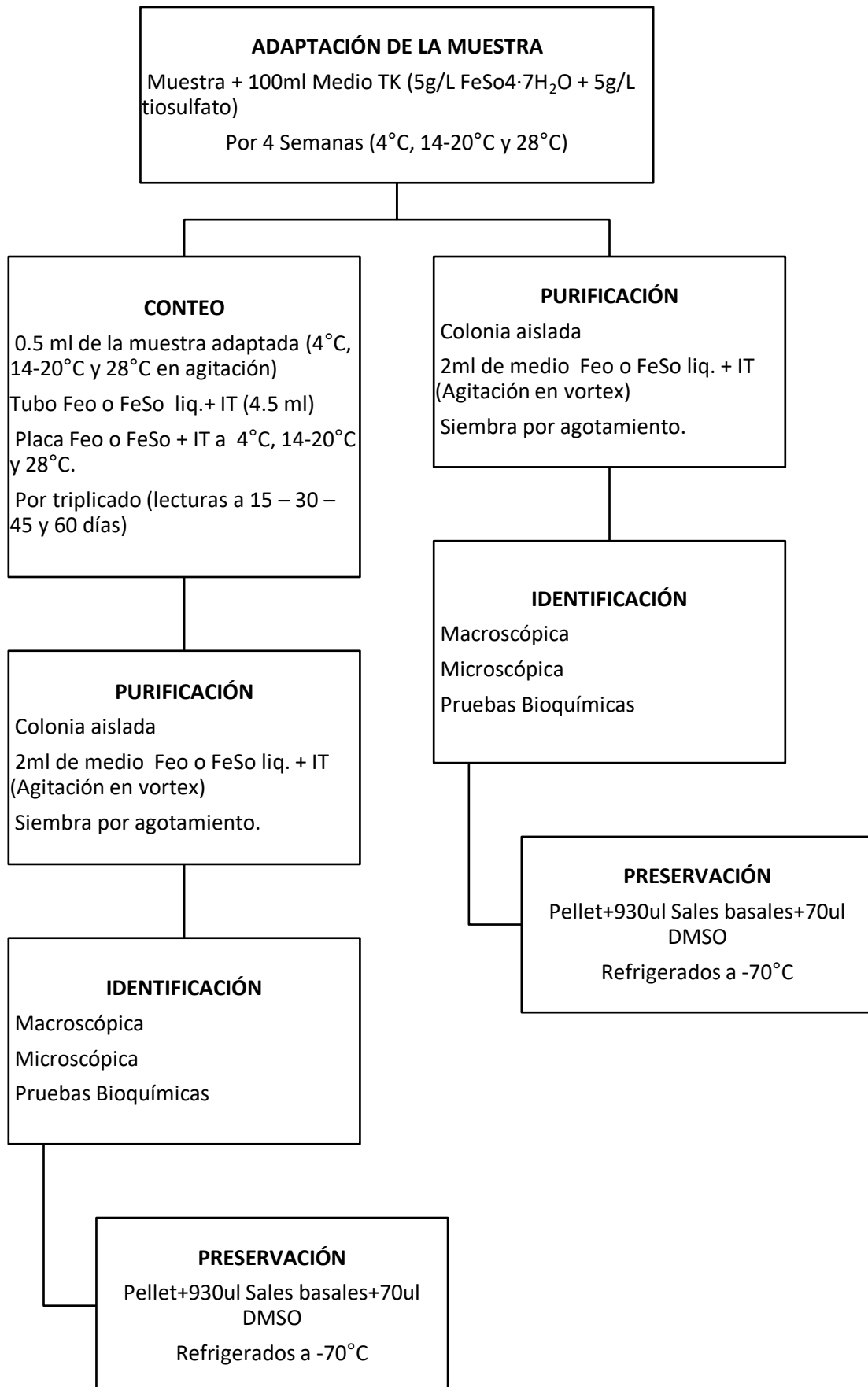
1g fucsina básica $C_{20}H_{20}ClN_3$

100ml de etanol al 96%

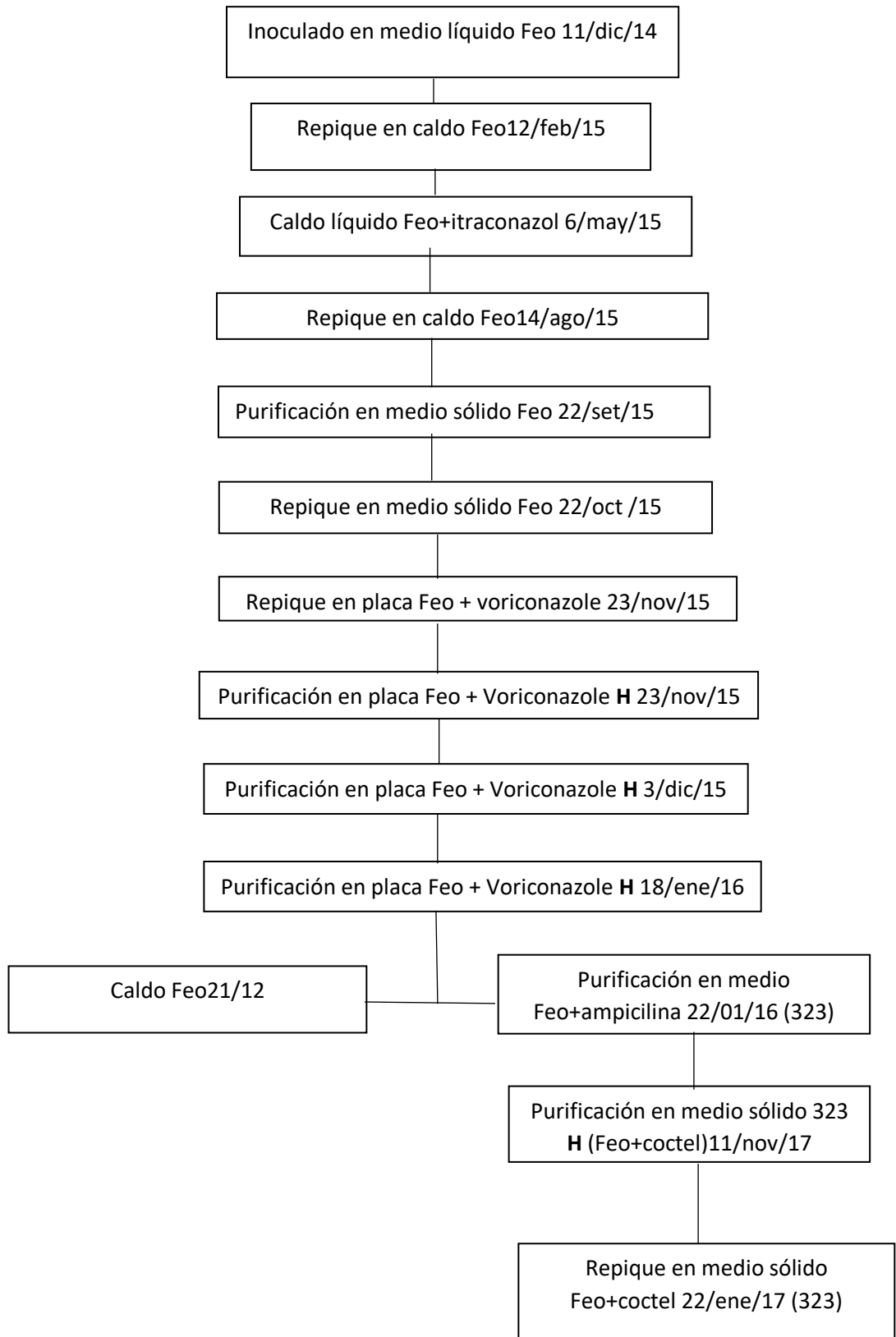
900ml de agua destilada

Primero disolver poco a poco la fucsina con el etanol y luego se agrega el agua destilada hasta completar el volumen de 1 litro. Se debe mezclar bien estos componentes y luego filtrarlo para reducir los cristales y así hacerlo más homogéneo. Así como tener mucho cuidado al momento de prepararlo ya que puede manchar la piel. Se recomienda el uso de esta preparación con la ayuda de un gotero y que el envase sea oscuro o ámbar para evitar el ingreso de la luz y su posible alteración.

ANEXO 2: Flujoograma de la metodología para conteo, purificación e identificación



**ANEXO 3: Diagrama del proceso de aislamiento y purificación de la muestra
Agua ácida 28°C (Placa 4A: Cepa323)**



ANEXO 4: Datos experimentales

TABLA 1: Número de colonias obtenidas en los medios sólido en la muestra: Mineral de Magnetita de Toquepala

| | Medio | Día 15 | Día 30 | Día 45 | Día 60 |
|---------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 28°C | FeSo | 233 | 233 | 233 | 2033 |
| | Feo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14-20°C | FeSo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Feo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4°C | FeSo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Feo | 0 | 0 | 0 | 0 |





TABLA 2: Número de colonias obtenidas en los medios sólido en la muestra: Concentrado de Pirita de Poracota



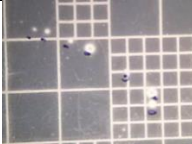
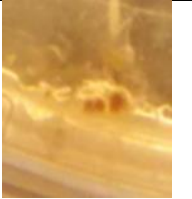
| | Medio | Día 15 | Día 30 | Día 45 | Día 60 |
|---------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 28°C | FeSo | 0 | 133 | 2700 | 10666 |
| | Feo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14-20°C | FeSo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Feo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4°C | FeSo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Feo | 0 | 0 | 0 | 0 |


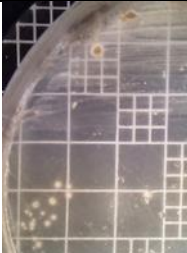
TABLA 3: Número de colonias obtenidas en los medios sólidos en la muestra: Agua de Mina de cobre de Quiruvilca

| | Medio | Día 15 | Día 30 | Día 45 | Día 60 |
|---------|-------|--------|--------|--------|--------|
| 28°C | FeSo | 0 | 66 | 66 | 66 |
| | Feo | 33 | 900 | 900 | 900 |
| 14-20°C | FeSo | 300 | 333 | 966 | 1566 |
| | Feo | 4833 | 5133 | 5133 | 5133 |
| 4°C | FeSo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Feo | 0 | 0 | 0 | 0 |


ANEXO 5: Datos y colonias obtenidas de la Muestra de mineral Magnetita de Toquepala




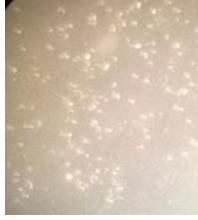
| T° C/Día | Placa | Imagen | Características | Observación Gram | Otros | Crecimiento con: | | | Identificación preliminar |
|-------------|-------|---|--|-----------------------|--|------------------|---|------------------|-------------------------------|
| | | | | | | YE | S ₄ O ₆ ²⁻ | Fe ²⁺ | |
| 4°C/41 | A Feo |  | Color: blanco Tamaño: 3mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: plana Superficie: lisa/ mate | Filamentos | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | No identificada |
| 4° C /150 | 7M |  | Color: blanco Tamaño: 1-5mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | esporas | No pudo ser repicada, ni mantenida. | | | | No identificada |
| 14-20°C /90 | 4M |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: <1mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: rugosa/brillante/seca | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (3 de veces) pero no mantenida. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 14-20°C /60 | 5M |  | Color: verde Tamaño: irregular Forma: ondulado Borde: plana Elevación: rugosa/mate/invasiva Superficie: hifas | hifas | Pudo ser repicada (2 veces) pero no mantenida. | + | - | - | hongo |


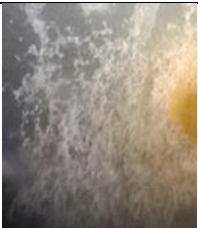


| | | | | | | | | | |
|-------------|-----------|--|--|-------------------------------------|--|---|---|---|-------------------------------|
| 14-20°C /60 | 6M |  | Color: amarilla Tamaño: 1-2mm Forma: circular Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa/mate | hifas y Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (2 veces) pero no mantenida. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 28°C/60 | A FeSo |  | Color: Mostaza Tamaño: 2mm Forma: circular Borde: lobulado Elevación: plana Superficie: rugosa/mate/seca | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias | | | | No identificada |
| 28°C /15 | C FeSo |  | Color: amarillo Tamaño: 1mm Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: plana Superficie: lisa/mate/cremosa | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | No identificada |
| 28°C /67 | 1M |  | Color: marrón Tamaño: 1-2 mm Forma: irregular Borde: entero(transparente) Elevación: elevada Superficie: lisa/brillante | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no mantenida | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |

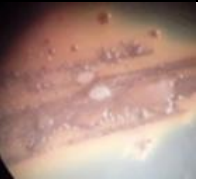
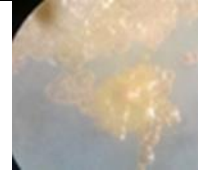
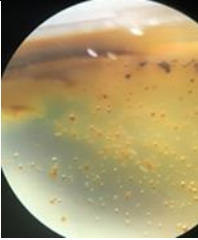
| | | | | | | | | | |
|---------|----|---|--|-----------------------|--|---|---|---|-------------------------------|
| 28°C/67 | 2M |  | Color: anaranjada Tamaño: 3 mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: crateriforme Superficie: lisa/mate/superficial | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no mantenida. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 28°C/53 | 3M |  | Color: verde Tamaño: 1mm Forma: redonda Borde: ondulado Elevación: plana Superficie: mate / seca | hifas | Pudo ser repicada (1 vez) pero no mantenida. | + | - | - | hongo |



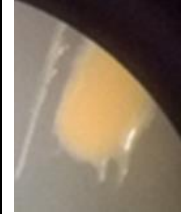
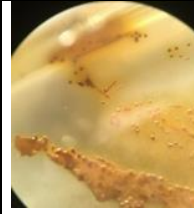
ANEXO 6: Datos y colonias obtenidas de la Muestra de concentrado de Pirita de Poracota

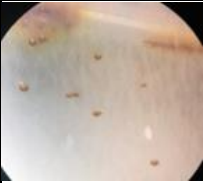


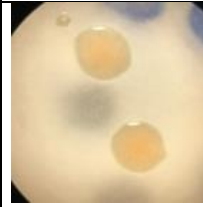
| T° /Día | Placa | Imagen | Características | Observación Gram | otros | Crecimiento con: | | | Identificación preliminar |
|------------|-------|--|--|---|--|------------------|---|------------------|------------------------------|
| | | | | | | YE | S ₄ O ₆ ²⁻ | Fe ²⁺ | |
| 14-20°C/30 | 17P |  | Color: coral Tamaño: 5mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: plana Superficie: lisa/brillante/cremosa | Bacilos (grandes y chicos), Gram negativo | Pudo ser repicado (2 veces) pero no pudo ser mantenida | + | + | + | <i>Acidithiobacillus spp</i> |


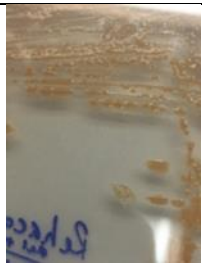
| | | | | | | | | | |
|------------|-----------|---|---|------------------------------|---|---|---|---|---|
| 14-20°C/75 | 18P |  | Color: blanco - verdoso Tamaño: 1mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: plana Superficie: seca | actinos | No pudo ser repicada, ni ser mantenida | | | | actinobacteria |
| 14-20°C/70 | 16P |  | Color: anaranjado Tamaño: 5-10mm Forma: circular Borde: entero Elevación: plana Superficie: lisa, brillante | Bacilos, Gram negativo | Pudo ser repicado (1 vez) pero no pudo ser mantenida | + | + | + | <i>Acidithiobacillus</i> <i>spp.</i> |
| 28°C/60 | B FeSo |  | Color: anaranjado Tamaño: Forma: Irregular Borde: entero/ondulado Elevación: Plana Superficie: rugosa/mate/seca | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | No identificada |
| 28°C/60 | B FeSo |  | Color: Incoloro Tamaño: <1mm. Forma: Puntiforme Borde: Entero Elevación: Convexa Superficie: lisa/brillante/cremosa | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | No identificada |

| | | | | | | | | | |
|----------|-----------|---|--|--|---|---|---|---|-----------------|
| 28°C/60 | C FeSo |  | Color: Mostaza Tamaño: 3mm Forma: irregular Borde: Ondulado Elevación: Plana Superficie: rugosa/mate/ seca | Bacilo, Gram negativo | Pudo ser repicada (3 veces) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | No identificada |
| 28°C/60 | C FeSo |  | Color: Verde Tamaño: Forma: filamentosa Borde: ondulado Elevación: - Superficie: - | hongos | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | hongo |
| 28°C/60 | 1P |  | Color: anaranjado Tamaño: 10mm Forma: circular Borde: entero Elevación: plana Superficie: lisa/brillante/seca/inv asiva al agar | Bacilos Gram negativo | Pudo ser repicada (2 veces) pero no pudo ser mantenida. | - | - | + | No identificada |
| 28°C/244 | 2P |  | Color: rojo Tamaño: 10-1mm Forma: lineal Borde: entero Elevación: plana Superficie: lisa / brillante | filamentos, esporas y pocos bacilos Gram negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | + | - | - | Hongo |

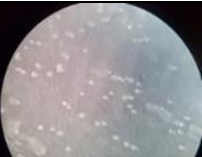
| | | | | | | | | | |
|---------|----|--|--|-------------------------------|---|---|---|---|-------------------------------|
| 28°C/18 | 3P |  | Color: Anaranjado marrón Tamaño: 1-5mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: crateriforme Superficie: rugosa / brillante/seca | Bacilos, Gram negativo | Pudo ser repicada (6 veces) pero no pudo ser mantenida | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 28°C/45 | 4P |  | Color: Anaranjado marrón Tamaño: >1mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: rugosa/brillante | bacilos largos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (15 veces) y mantenida como: 315, 307, 320, 306. 309.302. 316. 322. 313, 312, 319, 308, 300. 301. | - | - | + | No identificada |
| 28°C/11 | 5P |  | Color: Anaranjado marrón Tamaño: 1mm Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | Bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada 1 vez) y pudo ser mantenida como cepa 307. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |

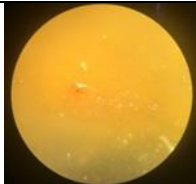
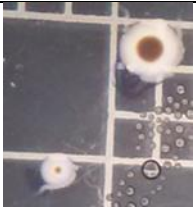

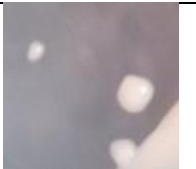
| | | | | | | | | | |
|----------|----|---|---|------------------------------|---|---|---|---|-------------------------------|
| 28°C/11 | 6P |  | Color: marrón Tamaño: 1mm Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | Bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez y pudo ser mantenida como cepa 315. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus</i> spp. |
| 28°C/10 | 7P |  | Color: Crema Tamaño: 1-5 mm Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | levaduras | Pudo ser repicada (3 veces) y pudo ser mantenida como cepa 321. | + | - | + | Levadura |
| 28°C /10 | 8P |  | Color: Crema Tamaño: 1-5 mm Forma: circular Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa/brillante | levadura | Pudo ser repicada (3 veces) y pudo ser mantenida como cepa 321. | + | - | + | Levadura |
| 28°C /60 | 9P |  | Color: Anaranjado marrón Tamaño: 1mm Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: plana Superficie: rugosa / brillante | Bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) y pudo ser mantenida como cepa 302. | - | - | + | Levadura |




| | | | | | | | | | |
|----------|-----|---|--|--|--|---|---|---|-------------------------------|
| 28°C /11 | 10P |  | Color: marrón Tamaño: 1mm Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | Bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) y pudo ser mantenida como cepa 309. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 28°C /27 | 11P |  | Color: marrón Tamaño: 5mm Forma: irregular Borde: irregular Elevación: crateriforme Superficie: rugosa/brillante/seca | Bacilos cortos, largos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (3 vez veces) y ser mantenida como cepa 300 y el repique como 308. | - | + | + | <i>At. ferrooxidans</i> |
| 28°C /4 | 12P |  | Color: crema Tamaño: 1mm Forma: circular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | levaduras | Pudo ser repicada (1 vez) y ser mantenida como cepa 316. | + | - | + | levaduras |
| 28°C /11 | 13P |  | Color: crema Tamaño: 5mm Forma: circular Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa/brillante | levaduras | Pudo ser repicada (1 vez) y ser mantenida como cepa 322. | + | - | + | levaduras |



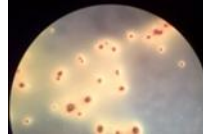

| | | | | | | | | | |
|----------|-----|---|--|-----------|--|---|---|---|-----------|
| 28°C /20 | 14P |  | Color: crema Tamaño: 1mm Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | levaduras | Pudo ser repicada (1 vez) y ser mantenida como cepa 316. | + | - | + | levaduras |
| 28°C /25 | 15P |  | Color: crema Tamaño: 5mm Forma: circular Borde: entero Elevación: elevada Superficie: lisa/brillante | levaduras | Pudo ser repicada (1 vez) y ser mantenida como cepa 313. | + | - | + | levaduras |





ANEXO 7: Datos y colonias obtenidas de la Muestra de Agua de mina de cobre de Quiruvilca


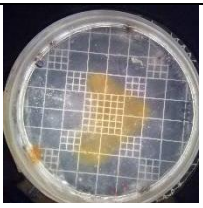

| T° /Día | Placa | Imagen | Características | Observación Gram | Otros | Crecimiento con: | | | Identificación preliminar |
|---------|-------|--|---|------------------|-------------------------------------|------------------|---|------------------|---------------------------|
| | | | | | | YE | S ₄ O ₆ ²⁻ | Fe ²⁺ | |
| 4°C/75 | 18A |  | Color: incoloro Tamaño: <1mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | bacilos | No pudo ser repicada, ni mantenida. | | | | No identificada |


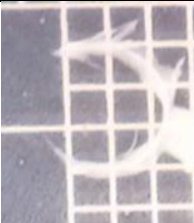


| | | | | | | | | | |
|-------------|--------|---|--|-----------|--|--|--|--|-----------------|
| 4°C/150 | 19A |  | Color: anaranjado Tamaño: <1mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | bacilos | No pudo ser repicada, mantenida. | | | | No identificada |
| 14-20°C/15 | A FeSo |  | Color: centro verde, halo amarillo Tamaño: 1mm Forma: circular Borde: ondulado Elevación: plana Superficie: Lisa mate | hifas | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias | | | | No identificada |
| 14-20°C/15 | A FeSo |  | Color: rosado Tamaño: 5mm Forma: irregular Borde: irregular Elevación: plana Superficie: lisa brillante cremosa | levaduras | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | No identificada |
| 14-20°C /15 | A Feo |  | Color: crema Tamaño: <5mm Forma: irregular Borde: irregular Elevación: elevada Superficie: lisa brillante cremosa | levaduras | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | | | | No identificada |




| | | | | | | | | | |
|-------------|-------|--|---|------------------------|---|-----------------|---|---|---|
| 14-20°C /15 | A Feo |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: 1mm Forma: entero Borde: circular Elevación: convexa crateriforme Superficie: lisa mate | bacilo | Repicada (3 veces) y mantenida como Cepa 310 | - (Autotrófico) | + | + | Cepa 310 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> |
| 14-20°C/25 | 6A |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: 1-15mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: plana Superficie: rugosa/mate | bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 14-20°C/19 | 7A |  | Color: coral Tamaño: <1-10mm Forma: puntiforme Borde: entero Elevación: plana Superficie: lisa / brillante/ cremosa | bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (2 veces) pero no pudo ser mantenida. | + | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |


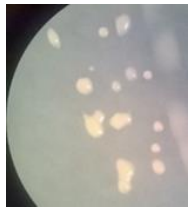

| | | | | | | | | | |
|------------|-----|---|--|-----------------------------------|---|---|---|---|-------------------------------|
| 14-20°C/19 | 8A |  | Color: rojo Tamaño: 3 mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: lisa / brillante / cremosa | esporas | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | + | - | - | hongo |
| 14-20°C/20 | 9A |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: 5mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: lisa / brillante/ seca | bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus</i> spp. |
| 14-20°C/20 | 10A |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: 1-2mm Forma: circular Borde: entero Elevación: elevada Superficie: rugosa / mate / seca | Leptospirilo, Gram Negativo | Pudo ser repicada (3 veces) pero no pudo ser mantenida. | - | - | + | <i>Leptospirillum</i> spp. |
| 14-20°C/60 | 11A |  | Color: coral Tamaño: 3mm Forma: irregular y puntiforme Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: brillante | esporas y bacilos largos y cortos | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | + | - | + | Mixto |

| | | | | | | | | | |
|-------------|-----|---|--|--|---|---|---|---|-------------------------------|
| 14-20°C /60 | 12A |  | Color: coral Tamaño: 3mm Forma: irregular y puntiforme Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: brillante | esporas y bacilos largos y cortos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | + | - | + | Mixto |
| 14-20°C /60 | 13A |  | Color: anaranjado Tamaño: >5mm Forma: irregular Borde: Elevación: Superficie: | bacilos largos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 14-20°C/ 20 | 14A |  | Color: coral Tamaño: 2mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: lisa / brillante / cremosa | bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | + | - | + | <i>Acidiphilium spp</i> |
| 14-20°C /21 | 15A |  | Color: Anaranjado marrón Tamaño: <1mm Forma: puntiforme Borde: ondulado Elevación: elevada Superficie: lisa/ mate | bacilos, Gram Negativo | Mantenida como cepa 314. | - | - | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |

| | | | | | | | | | |
|-------------|-----------|--|--|--|--|--------------------|---|---|-------------------------------|
| 14-20°C /27 | 16A |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: 5mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: plana-crateriforme Superficie: rugosa / mate | cocobacilos y bacilos grandes y pequeños | Mantenida como cepa 311. | - | + | + | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 14-20°C /30 | 17A |  | Oxidación de ciertas zonas del agar | levaduras y bacilos | No pude ser repicada, ni mantenida. | | | | No identificada |
| 28°C/15 | A FeSo |  | Color: blanco puro Tamaño: <1mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: plana Superficie: lisa mate | Bacilo, Gram Negativo | Pudo ser repicada (4 veces) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | - (Autotrófico) | - | - | No identificada |

| | | | | | | | | | |
|----------|-----------|---|--|-----------------------------|--|-----------------|---|---|---------------------------------------|
| 28°C /15 | B FeSo |  | Color: blanco puro Tamaño: 1mm Forma: circular Borde: ondulado Elevación: elevada Superficie: lisa mate | Bacilo Chico, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | - (Autotrófico) | - | - | No identificada |
| 28°C /15 | C FeSo |  | Color: blanco puro Tamaño: 1mm Forma: circular Borde: ondulado Elevación: plana Superficie: lisa / mate | Bacilo Chico, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | - (Autotrófico) | - | - | No identificada |
| 28°C /15 | A Feo |  | Color: marrón borde amarillo Tamaño: <1mm Forma: circular Borde: entero Elevación: plana Superficie: seca | Bacilo, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | - (Autotrófico) | + | + | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> |
| 28°C /15 | B Feo |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: 5mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: plana Superficie: rugosa/ seca | Bacilo, Gram Negativo | Pudo ser repicada (3 veces) pero no se pudo mantener puras a las colonias. | - (Autotrófico) | + | + | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> |

| | | | | | | | | | |
|----------|-------|--|--|-------------------------------|--|--------------------|---|---|---------------------------------------|
| | | | | | | | | | |
| 28°C /15 | C Feo |  | Color: marrón Tamaño: 1mm Forma: circular Borde: entero Elevación: plana Superficie: seca | Bacilo, Gram Negativo | Pudo ser repicada (3 veces) pero no se pudo mantener puras a las colonias | - (Autotrófico) | + | + | <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> |
| 28°C /60 | 1A |  | Color: anaranjado marrón Tamaño: 1 - 50mm Forma: Entero Borde Irregular: Elevación: plana Superficie: rugosa/mate/seca | bacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (8 veces) pero no pudo ser mantenida. | + | + | - | <i>Acidithiobacillus spp.</i> |
| 28°C/30 | 2 A |  | Color: crema Tamaño: >5mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: lisa / brillante | cocobacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | + | - | + | <i>Acidiphilium spp.</i> |

| | | | | | | | | | |
|---------|----|---|--|-------------------------------|---|---|---|---|--------------------------|
| 28°C/30 | 3A |  | Color: rosado Tamaño: >5mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: lisa / brillante | cocobacilos, Gram Negativo | Pudo ser repicada (1 vez) pero no pudo ser mantenida. | + | - | + | <i>Acidiphilium spp.</i> |
| 28°C/7 | 4A |  | Color: crema Tamaño: 1-2mm Forma: irregular Borde: entero Elevación: convexa Superficie: brillante | levaduras | Mantenida como cepa 323 | + | - | + | levadura |
| 28°C/6 | 5A |  | Color: crema Tamaño: 1-3mm Forma: irregular Borde: ondulado Elevación: convexa Superficie: lisa/brillante | levaduras | Mantenida como cepa 324. | + | - | + | levadura |

ANEXO 8: Número de colonias diferentes en los procesos de conteo y purificación.

| Muestra | Tipo de Procedimiento | Temperatura de incubación | Número de cepas diferentes | Color de las colonias |
|----------------------------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Magnetita de Toquepala | Conteo | 28°C | 2 | - Mostaza - Amarillo |
| Magnetita de Toquepala | Conteo | 4°C | 1 | - Blanco |
| Magnetita de Toquepala | Purificación | 28°C | 3 | - Verde - Marrón - Anaranjado |
| Magnetita de Toquepala | Purificación | 14-20°C | 3 | - Verde - Amarilla - Anaranjado marrón |
| Magnetita de Toquepala | Purificación | 4°C | 1 | - Blanco |
| Concentrado de Pirita | Conteo | 28°C | 4 | - Mostaza - Translúcido - Anaranjado - verde |
| Concentrado de Pirita | purificación | 28°C | 5 | - Anaranjado marrón - Marrón - Rojo - Crema - Anaranjado |
| Concentrado de Pirita | Purificación | 14-20°C | 3 | - Anaranjado - Blanco verdoso - Coral |
| Agua de Mina de Quiruvilca | Conteo | 28°C | 3 | - Blanco puro - Marrón - Anaranjado marrón |
| Agua de Mina de Quiruvilca | Conteo | 14-20°C | 4 | - Verde con halo amarillo - Rosado - Crema - Anaranjado marrón |
| Agua de Mina de Quiruvilca | Purificación | 28°C | 3 | - Rosado - Anaranjado marrón - Crema |
| Agua de Mina de Quiruvilca | Purificación | 14-20°C | 4 | - Anaranjado marrón - Coral - Rojo - Anaranjado |
| Agua de Mina de Quiruvilca | Purificación | 4°C | 2 | - Anaranjado - Translúcido |