

Caracterización por Ardrea de microorganismos acidófilos aislados en minas de oro de Marmato, Colombia

Ardrea characterisation of acidophilic micro-organisms isolated from gold mines in Marmato, Colombia

Victor Manuel Osorio E.^{*}, Edna Judith Márquez F.^{**}, Marco A. Márquez G.^{***}

RESUMEN

La bio-oxidación de minerales mejora la recuperación de metales valiosos y disminuye el impacto negativo causado por los subproductos de las operaciones mineras, pero las interacciones de los microorganismos involucrados son poco conocidas. Con el objeto de avanzar en el estudio de interacciones microbianas de bacterias acidófilas nativas en cultivos mixtos, en este trabajo se utilizó la siembra en medio sólido doble capa y el análisis de enzimas de restricción del ADN ribosomal amplificado (Ardrea) con las enzimas *Eco72I*, *Eco24I*, *XcmI* y *BsaAI* para caracterizar cuatro aislados tomados de minas de oro de Marmato, Colombia. Los aislados que oxidan hierro y azufre exhibieron patrones de restricción del gen ARNr 16S compatibles con los reportados para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, aunque uno de ellos mostró una morfología de colonia que no ha sido descrita para esta especie; el aislado que oxida azufre mostró un patrón que coincide con el análisis teórico realizado sobre secuencias para *Acidithiobacillus thiooxidans* incluidas en bases de datos primarias. La técnica Ardrea permitió diferenciar entre *At.ferrooxidans* y *At.thiooxidans*, y verificar si la identidad de los aislados correspondía con sus características fisiológicas y la morfología de sus colonias.

Palabras clave: Ardrea, ARNr 16S, microorganismos acidófilos, identificación molecular, polimorfismos de colonia, medio sólido doble capa.

ABSTRACT

Mineral bio-oxidation improves the extraction of valuable metals and also decreases the impact caused by mining waste; however, the interactions between the micro-organisms so involved are little known. Double-layer solid culture media techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis (Ardrea), using *Eco72I*, *Eco24I*, *XcmI* and *BsaAI* enzymes, were used for characterising four micro-organisms isolated from gold mines located in Marmato, Colombia. This work was aimed at better understanding of native acidophilic micro-organisms' microbial interactions in mixed cultures. Iron and sulphur oxidising isolates revealed similar restriction patterns to those previously reported for *Acidithiobacillus ferrooxidans*; however, one of them exhibited different colony morphology compared to previously reported morphology. The iron non-oxidising isolate presented a restriction pattern agree-

* Candidato a M. Sc. Biotecnología, Laboratorio de Microbiología Industrial, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. vmosorio@unalmed.edu.co

** M.Sc. Biología, estudiante doctorado, Laboratorio de Biología Molecular y Celular, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. ejmarque@unal.edu.co

*** Ph. D. Mineralogía, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. mmarquez@unalmed.edu.co

ing with theoretical analysis of *Acidithiobacillus thiooxidans* database sequences. ARDREA proved to be a viable technique for differentiating between *At. ferrooxidans* and *At. thiooxidans*; in turn, it enabled checking isolates' identity with their physiological traits and colony morphology.

Key words: Ardrea, rRNA 16S, acidophilic microorganisms, molecular identification, colony polymorphisms, double layer solid medium

Recibido: marzo 5 de 2007

Aceptado: junio 13 de 2007

INTRODUCCIÓN

La bio-oxidación es una técnica que se puede utilizar como un tratamiento viable antes de la cianuración para mejorar la recuperación de oro (Canales et ál., 2002) y la extracción de otros metales (Solisio et ál., 2002). Esta oxidación es catalizada principalmente por microorganismos acidófilos autótrofos que crecen bajo condiciones drásticas de pH y concentración de metales disueltos (Rossi, 1990) característicos de puntos de oxidación de sulfuros en minas, y son los principales responsables de la generación de drenajes ácidos (Johnson y Hallberg, 2003).

En estos ambientes naturales, y en sistemas de bio-oxidación de sulfuros metálicos, existe una gran diversidad de microorganismos, de los cuales algunos se utilizan en cultivos mixtos para mejorar los procesos de oxidación (Battaglia-Brunet et ál., 1998). Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la composición microbiana en operaciones de oxidación bacteriana de minerales (Okibe et ál., 2003) que permitan diseñar cultivos puros o mixtos que hagan más factible la implementación de estos procesos. Estos estudios parten de una caracterización bioquímica y morfológica basada en cultivos en medios sólidos que no limiten el crecimiento bacteriano (Johnson, 1995), y en otras técnicas que permitan una fácil diferenciación de estos microorganismos acidófilos, y se apoyan en técnicas moleculares cuando dicha caracterización no es suficiente.

La identificación basada en características fisiológicas puede requerir mucho tiempo por el crecimiento lento propio de microorganismos acidófilos quimiolitótrofos, y puede resultar complicada ya que algunas técnicas microbiológicas empleadas con este tipo de microorganismos implican medios de cultivo costosos y de difícil preparación. Además,

esta identificación puede llevar a conclusiones erróneas por varias razones; muchos de los microorganismos acidófilos que habitan en los sistemas de biolixiviación artificiales y naturales poseen comportamientos fenotípicos y morfologías similares (Johnson et ál., 2005) y, sumado a esto, dentro de una misma especie pueden existir polimorfismos en términos de sus propiedades fisiológicas y características genotípicas (Karavaiko et ál., 2003).

Por esta razón se han utilizado técnicas moleculares alternativas para la identificación de estas especies. Las herramientas moleculares utilizadas incluyen técnicas tales como hibridación in situ con sondas específicas marcadas con fluorescencia (González-Toril et ál., 2003; Peccia et ál., 2000), análisis inmunológico (García y Jerez, 1995) y técnicas basadas en PCR como secuenciación del fragmento del gen 16S que codifica para el ARN ribosomal (ADNr 16S) (Okibe et ál., 2003; De Wulf-Durand et ál., 1997; Goebel y Stackebrandt, 1995), análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (Battaglia-Brunet et ál., 2002; Demergasso et ál., 2005; González-Toril et ál., 2003; Liu et ál., 2002), amplificación y secuenciación de regiones ITS (Romero et ál., 2003; Espejo y Romero, 1997; Pizarro et ál., 1996), y análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (Ardrea) (Johnson et ál., 2005; Bond et ál., 2000; Rawlings, 1995).

Dentro de la gama de técnicas moleculares utilizadas, Ardrea es relativamente sencilla, requiere pocos pasos y no necesita de equipos y protocolos muy especializados como los que necesita una secuenciación o una electroforesis en gradiente desnaturizante. Debido a que analiza los patrones de restricción del gen ARN ribosomal 16S para realizar el estudio, se convierte en una herramienta robusta teniendo en cuenta que este gen tiene secuencias específicas cortas que se encuentran en todos los miembros de un grupo filogenético (Ro-

dicio y Mendoza, 2004), son secuencias altamente conservadas dentro de una misma especie, contienen suficiente variabilidad para diferenciar organismos muy próximos, y existen bases de datos amplias en continuo crecimiento de secuencias de estos genes. Esta técnica fue exitosamente utilizada por Johnson et ál. (2005) para la identificación de bacterias acidófilas nativas basados en patrones de restricción de una región que codifica para ARN ribosomal 16S.

Como parte de una serie de estudios encaminados a evaluar las interacciones microbianas de bacterias acidófilas nativas en cultivos mixtos, en el presente trabajo se utilizó la técnica de siembra en medio sólido en doble capa para el aislamiento de microorganismos con capacidad de oxidar hierro, y la técnica Ardrea para la identificación molecular de los aislados nativos de bacterias acidófilas, mesófilas y quimiolitótrofas con potencial para bio-lixiviar cinc a partir de esfalerita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y medios de cultivo

Los microorganismos se aislaron de drenajes ácidos (pH alrededor de 4.0), paredes y techos que presentaban puntos de oxidación de sulfuros, en minas de oro artesanales, ubicadas en la parte alta del municipio de Marmato, en el departamento de Caldas, Colombia. Para el aislamiento de microorganismos con capacidad oxidativa de hierro se utilizó el medio de cultivo 9K a pH 2.0 (Silverman y Lundgren, 1959), suplementado con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (44 g/L) como fuente de energía, y la purificación de los aislamientos se realizó mediante subcultivos sucesivos de colonias individuales desde medio sólido a medio líquido. El medio de cultivo sólido se gelificó con agarosa (5 g/L), y se sembró con la técnica de doble capa descrita en Johnson (1995). Se seleccionaron colonias con morfologías distintas que presentaron oxidación de hierro, y se incubaron en medio líquido 9K a 30 °C, con agitación constante a 180 rpm, durante cinco días.

El aislamiento y la purificación de un microorganismo heterótrofo necesario para la técnica de siembra en doble capa se realizó en el medio de cultivo sólido WAYE (Washed agarose / yeast extract) con 0,2 g/L de extracto de levadura, 0,7 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y un pH inicial de 2,5, gelificado

con 5 g/L de agarosa (Johnson, 1995). El aislado con capacidad de oxidar azufre y compuestos reducidos del azufre, y sin capacidad de oxidar hierro, se obtuvo por siembra en medio de cultivo 9K a pH 2,0 suplementado con azufre (10 g/L) como fuente de energía, a 30 °C y a 180 rpm, y su purificación se realizó mediante subcultivos sucesivos.

La evaluación de las características microscópicas de los aislamientos con capacidad de oxidar hierro se realizó por coloración Gram modificada utilizando una mezcla fuscina-safranina, y se midieron 10, 15 y 9 bacilos para el primero, segundo y tercer aislado respectivamente por microscopía electrónica de barrido (JEOL 5910 LU JSM), utilizando un recubrimiento oro-paladio de 8 nm, a una presión de 40 a 50 pascales, y un voltaje de 15 kV. Las características macroscópicas de las colonias se observaron diez días después de sembrar cada aislado por agotamiento en superficie, en medio de cultivo sólido 9K suplementado con 20 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y gelificado con 5 g/L de agarosa.

La caracterización bioquímica se hizo de acuerdo con el manual Bergey (Kreig, 1984-1989), evaluando la habilidad de los aislados para crecer en el medio WAYE a pH 2,0-2,5 (Johnson, 1995), o en el medio 9K (Silverman y Lundgren, 1959), suplementado con cinco diferentes fuentes de energía: 1) 20g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2) 10 g/L azufre S^0 , 3) 10 g/L Glucosa, 4) 50 g/L Esfalerita (ZnS) y 5) 10 g/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Los medios suplementados con las fuentes 1-4 se ajustaron a pH 1,8 a 2,0, mientras que la fuente 5 se ajustó a pH 2,5-3,0. Para corroborar que el crecimiento no se debiera a trazas del medio de inoculación, el comportamiento proliferativo se evaluó durante tres subcultivos en cada uno de los medios evaluados.

Para la caracterización molecular, los aislados quimiolitótrofos oxidadores de hierro se sembraron en el medio de cultivo líquido 9K con 20 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, a pH 2,0 y se incubaron a 30 °C y a 180 rpm durante siete días; el aislado que no oxidó hierro pero sí azufre se sembró en medio líquido 9K con 10 g/L de azufre y en iguales condiciones de incubación.

Análisis de enzimas de restricción del ADN ribosomal 16S amplificado (Ardrea)

Antes de la extracción de ADN se filtraron 20 mL de cultivo de los microorganismos en condiciones

de esterilidad y al vacío con papel filtro de 3 μm de poro; los filtrados se lavaron con ácido sulfúrico hasta alcanzar una concentración final del ácido de 10 mM, y luego se extrajo el ADN siguiendo la metodología descrita por Johnson et ál. (2005).

Para amplificar el gen 16S ribosomal por PCR se utilizaron los cebadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TAGGYTACCTTGTACGACTT-3') (Weisburg et ál., 1991). Una alícuota de 2,5 μl del ADN genómico bacteriano se combinó con 2,5 μl de buffer de reacción (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,8 a 25 °C); 1,25 μl de MgCl_2 (50mM); 0,5 μl de mezcla de desoxinucleósidos trifosfato (dNTP 10 mM cada uno); 0,125 μl de cada cebador (100 μM), y 17,75 μl de agua desionizada; a esta mezcla se le adicionó 1 U de Taq DNA Polimerasa (Fermentas®). Las reacciones de amplificación se realizaron en termociclador T3 marca Biometra® con el siguiente perfil térmico: desnaturalización inicial a 95 °C por tres minutos; 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por un minuto, alineamiento de cebadores a 52 °C por un minuto, y elongación a 72 °C por 30 segundos; incubación a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *XcmI*, *BsaAI* (New England Biolabs), *Eco24I* y *Eco72I* (MBI Fermentas) según las recomendaciones de los fabricantes. Estas enzimas se seleccionaron por su habilidad para discriminar entre bacilos gram negativos, mesófilos (*XcmI* y *Eco24I*) o moderadamente termófilos (*Eco72I* y *BsaAI*), con capacidad de oxidar hierro, presentes en ambientes de bio-oxidación (Johnson et ál., 2005). Debido a que no se contaba con los patrones de restricción de microorganismos acidófilos oxidadores de azufre, se realizó un análisis

de secuencias del gen 16S ribosomal publicadas en las bases de datos primarias GenBank, EMBL y DBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con la ayuda de los programas Bioedit (Hall, 1999) y Webcutter® (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>)

El ADN extraído, y los fragmentos obtenidos por PCR, se separaron por electroforesis sembrando 5 μl de la mezcla de reacción en gel de agarosa al 0,8% p/v en buffer TBE 0.5X, por 60 minutos a 70 voltios; se tiñeron con 0,1 $\mu\text{L/mL}$ de bromuro de etidio, y se visualizaron y fotografiaron en un equipo BioDocAnalyze marca Biometra®. Se usó un marcador de peso molecular de 1 kb que va desde 250 pb hasta 10 kb (Promega®). Un procedimiento similar se utilizó para separar los fragmentos de restricción, pero en este caso se utilizaron geles de agarosa al 2% P/V y un marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas®) que va desde 100 bp hasta 3 kb.

RESULTADOS

Morfología macroscópica y microscópica de los aislados

Del total de microorganismos aislados se seleccionaron tres: Ferro3, Ferro4 y Ferro5 para su purificación posterior porque estos mostraron una mayor actividad en medios de cultivo líquido 9K, medios de cultivo suplementados con esfalerita, y morfologías de colonia y tamaños del microorganismo diferentes. Los tres aislados son bacilos rectos gram negativos, no formadores de spora, de diferentes tamaños, con diámetros muy variables –desde 0,4 μm hasta 0,75 μm –, y longitudes entre 1,06 μm y 2,33 μm (tabla 1), algunos agrupados en pares en forma de “V”. Las características macroscópicas

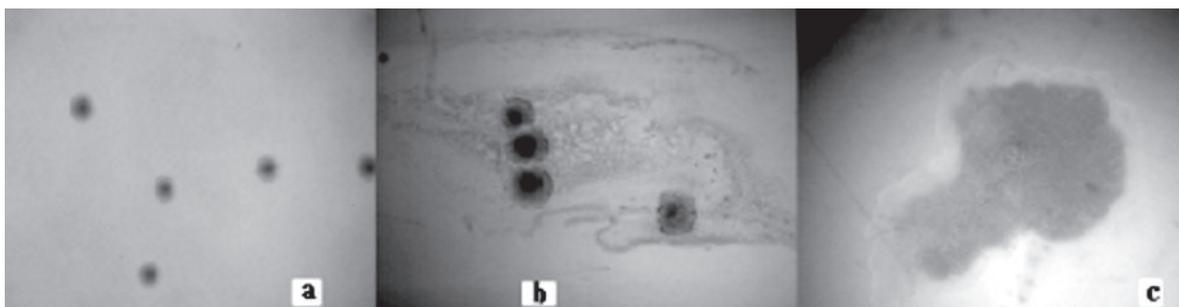


Figura 1. Morfología de colonias sembradas en medio 9K sólido gelificado con agarosa. a) Ferro3, b) Ferro4, c) Ferro5.

de las colonias se evaluaron en 42, 35 y 12 UFC para Ferro3, Ferro4 y Ferro5 respectivamente (figura 1, tabla 1). De los tres aislados oxidadores de hierro, Ferro5 mostró colonias de mayor tamaño y de diferente color y textura, y bacilos de mayor diámetro, aun cuando su longitud fue similar a Ferro3 (tabla 1).

Los aislados Ferro3, Ferro4 y Ferro5 son microorganismos acidófilos, mesófilos, quimiolitótrofos;

éstos presentaron crecimiento al segundo o quinto día en medio 9K con hierro, azufre, tiosulfato o esfalerita; no presentaron crecimiento en medio 9K con glucosa, y sólo Ferro5 presentó un crecimiento leve en el medio WAYE. El aislado Thio2, un bacilo acidófilo, mesófilo y quimiolitótrofo, sólo presentó un buen crecimiento en medio 9K con azufre y un crecimiento limitado en el medio 9K con tiosulfato o con esfalerita.

Tabla 1. Características de colonia y dimensiones celulares de los aislados quimiolitótrofos

Aislado	Morfología de colonia					Dimensiones de bacilos	
	Longitud máxima	Forma	Borde	Color	Textura	Longitud (µm)	Diámetro (µm)
Ferro5	≤ 4 mm	Irregular	Ondulado	Translúcidas	Algodonosas	1,06 - 1,83	0,71 - 0,75
Ferro4	≤ 1 mm	Irregular	Ondulado	Crema, centro naranja, borde translúcido	Cremosa	0,99 - 1,51	0,40 - 0,64
Ferro3	≤ 1 mm	Circular	Regular	Café, centro oscuro	Cremosa	1,55 - 2,33	0,47 - 0,59

Caracterización molecular por Ardrea

El análisis electroforético mostró que se obtuvo un fragmento amplificado de los genes ARNr 16S de aproximadamente 1,5 Kb; éstos fueron digeridos con las enzimas de restricción *XcmI*, *BsaAI*, *Eco24I* y *Eco72I*. Se observó que Ferro3, Ferro4 y Ferro5 tienen patrones de restricción idénticos con cuatro fragmentos de restricción de cerca de 200, 400, 300 y 600 pares de bases para la restricción con *Eco24I*, y un fragmento de 1500 pares de bases aproximadamente para *XcmI* (figura 2). Estos patrones de restricción son congruentes con las secuencias de esta región génica que han sido publicadas para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, e iguales a los obtenidos por Johnson et ál. (2005), para la cepa ATCC 22370 de la misma especie. El aislado Thio2 mostró un patrón de restricción diferente al de los tres aislados, y concuerda con el análisis teórico de secuencias reportadas para *Acidithiobacillus thiooxidans* en las bases de datos primarias Genbank, EMBL, DDBJ (www.ncbi.nlm.nih.gov), según el cual se esperaría obtener dos fragmentos de 800 y 500 pares de bases para la restricción con *Eco24I*, y un fragmento de 1500 pares de bases para *XcmI*, lo que está de acuerdo con lo obtenido experimentalmente en este trabajo (figura 3),

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, microorganismos acidófilos nativos oxidadores de hierro se cultivaron en medio sólido y se caracterizaron desde el punto de vista morfológico, fisiológico y molecular. El crecimiento de *At. ferrooxidans* en medio sólido ha sido difícil de implementar (Rossi, 1990), pero la metodología de siembra en doble capa descrita por Johnson et ál. (2005) resultó útil para los aislados nativos examinados, y permitió aumentar la eficiencia en el crecimiento de microorganismos quimiolitótrofos cultivables que fueran sensibles a los compuestos orgánicos resultantes de la hidrólisis que sufre la agarosa a bajos valores de pH.

El uso de cultivos de bacterias acidófilas en medio sólido permitió la identificación de colonias individuales lo cual facilitaría el conteo de microorganismos viables en comparación con los otros métodos de recuento microbianos en sistemas de biolixiviación, donde los valores se afectan por diversos factores tales como la presencia de una fase sólida a la cual se adhieren células, la microbiota compleja que habita estos sistemas y que puede estar conformada por microorganismos no distinguibles al microscopio, los periodos de incubación largos necesarios para asignar resultados

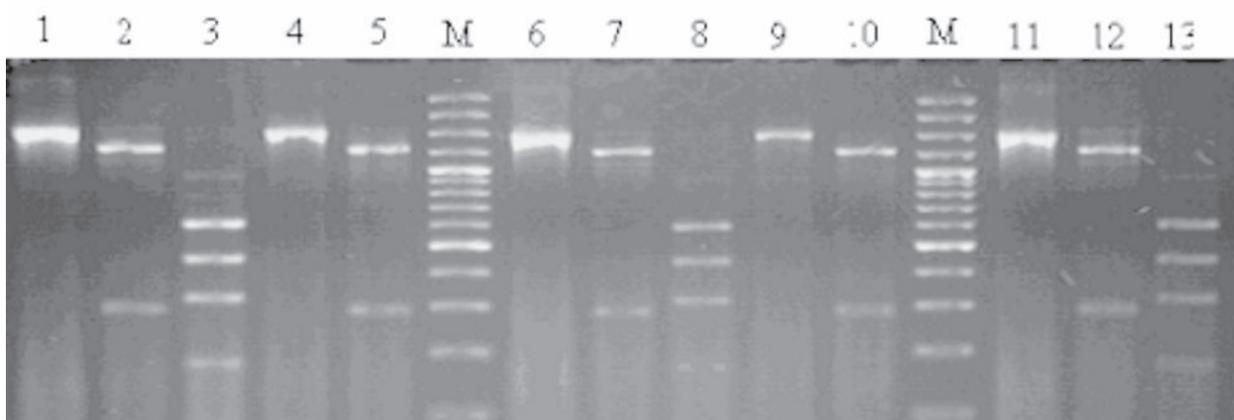


Figura 2. Análisis electroforético de genes ARNr 16S de los aislados oxidadores de hierro Ferro3 (líneas 1-5), Ferro4 (líneas 6-10) y Ferro5 (líneas 11-15) digeridos con *Eco72I* (líneas 2, 7, 12), *Eco24I* (líneas 3, 8, 13), *XcmI* (líneas 4, 9 y 14) y *BsaAI* (líneas 5, 10 y 15). Línea M: marcador de peso molecular de ADN de 100 bp; líneas 1, 6 y 11: fragmento amplificado sin digerir.

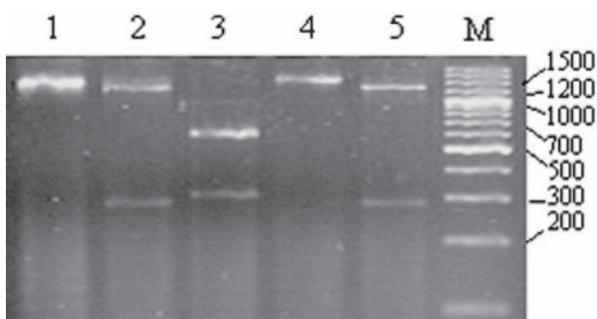


Figura 3. Análisis electroforético del gen ARNr 16S del aislado Thio2 digerido con *Eco72I* (línea 2), *Eco24I* (línea 3), *XcmI* (línea 4) y *BsaAI* (línea 5). Línea M: marcador de peso molecular de ADN de 100 bp; línea 1: fragmento amplificado sin digerir.

a una prueba basada en capacidades fisiológicas de las bacterias (NMP), y la dificultad de la siembra en medio sólido por la inhibición causada por los agentes solidificantes comunes (Rossi, 1990). No obstante, se debe tener en cuenta que el crecimiento del microorganismo en este medio es lento, y que cuando la concentración de hierro ferroso en el medio sólido es muy alta, se forman grandes cantidades de precipitados férricos que impiden la visualización de las colonias.

En relación con la técnica molecular, los aislados Ferro3, Ferro4 y Ferro5 crecieron formando una alta cantidad de material precipitado en las paredes y el fondo del erlenmeyer, lo que hizo difícil

las extracciones de ADN debido a que la cantidad de compuestos férricos precipitados impedía una amplificación adecuada; por esto, la filtración de los medios de cultivo antes de la extracción del ADN con el fin de disminuir la cantidad de sólidos precipitados constituye una etapa clave en la extracción de ADN de esta microbiota. El análisis de secuencias de ARNr 16S ha sido utilizado para la identificación molecular de una amplia variedad de especies bacterianas, incluyendo muchas que no pueden ser cultivadas. La identificación de bacterias acidófilas nativas mediante la técnica Ardrea, la cual fue previamente publicada por Johnson et ál. (2005), ha permitido la reclasificación de microorganismos con características fisiológicas y morfológicas características de *At. ferrooxidans* que exhiben diferencias en los patrones de restricción (Johnson et ál., 2005), y parece ser útil para identificar los aislados nativos examinados.

De los tres aislados con capacidad de oxidar hierro que fueron examinados en este trabajo, Ferro3 y Ferro4 presentaron una morfología de colonia característica de *At. ferrooxidans*, mientras que Ferro5 crece formando colonias grandes, algodonosas, translúcidas e irregulares, diferentes a las previamente descritas (Johnson et ál., 2005; Kreig, 1984-1989). Sin embargo, la observación de que Ferro5 sea un bacilo acidófilo, mesófilo, con habilidad para oxidar hierro y compuestos reducidos de azufre y el patrón de restricción obtenido del ADN ribosomal 16S, sugieren que este aislado es de la especie *At. ferrooxidans* (Kreig, 1984-1989).

Lo anterior también sugeriría la existencia de polimorfismo en la morfología de la colonia, lo cual podría ser producto del polimorfismo genético, aspecto previamente observado en esta especie (Karavaiko et ál., 2003), o resultado de la plasticidad fenotípica, idea que puede estar apoyada por la habilidad de Ferro5 para crecer lentamente en el medio de cultivo WAYE, lo que indica su capacidad de metabolizar o tolerar los compuestos orgánicos suplementados a este medio. Esta plasticidad podría capacitar a los aislados para responder a la presión selectiva de las características mineralógicas de los hábitat de estas especies; sin embargo, la respuesta a este interrogante requiere de estudios posteriores que permitan de manera adicional corroborar la identidad de este aislado.

Los tres aislados, Ferro3, Ferro4 y Ferro5, crecieron en medio sólido gelificado con agarosa, mostrando colonias individuales con morfologías diferentes, características oxidativas de mineral y patrones de restricción del ADN ribosomal 16S, compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En contraste, el aislado Thio2 exhibió características compatibles con *At. thiooxidans* debido a su carácter mesófilo, acidófilo, quimiolitótrofo, su patrón de restricción, su inhabilidad para reducir hierro, y su capacidad para oxidar azufre y compuestos reducidos del azufre (Kreig, 1984-1989). Los resultados sugieren que la diferencia de los patrones de restricción de los amplificadores del gen ARNr 16S generados por la digestión con la enzima de restricción *Eco24I*, permiten discriminar entre *At. ferrooxidans* (cuatro fragmentos de 200, 400, 300 y 600 pares de bases) y *At. thiooxidans* (dos fragmentos de 800 y 500 pares de bases), dos especies que coexisten en los ambientes de biolixiviación. Este aspecto no fue tratado previamente por Johnson et ál. (2005), debido a que su trabajo estaba dirigido a la microbiota acidófila oxidadora de hierro; sin embargo, esta aproximación metodológica permitiría discriminar mezclas de ambos microorganismos basados en su patrón de restricción. La utilidad de la técnica *Ardrea* en variantes morfológicas de aislados similares a *At. ferrooxidans* queda aún por explorar una vez se dilucide su identidad taxonómica, sin embargo, su sencillez y economía la convierten en una herramienta útil en estudios de interacciones microbianas en la biolixiviación de metales.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Los autores agradecen al laboratorio de Microbiología Industrial y al de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Battaglia-Brunet, F.; Clarens, M.; D'Hugues, P.; Gordon, J. J.; Foucher, S.; Morin, D. 2002. Monitoring of a pyrite-oxidising bacterial population using DNA single-strand conformation polymorphism and microscopic techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60 (1-2): 206-211.
- Bond, P. L.; Smriga, S. P.; Banfield, J. F. 2000. Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3842-3849.
- Canales, C.; Acevedo, F.; Gentina, J. C. 2002. Laboratory-scale continuous biooxidation of a gold concentrate of high pyrite and enargite content. *Process Biochemistry*. 37 (10): 1051-1055.
- De Wulf-Durand, P.; Bryant, L. J.; Sly, L. I. 1997. PCR-mediated detection of acidophilic, bioleaching associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2944-2948.
- Demergasso, C. S.; Galleguillos, P. A.; Escudero G.; L. V.; Zepeda, V. J.; Castillo, D.; Casamayor, E. O. 2005. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*. 80 (4): 241-253.
- Espejo, R. T.; Romero, J. 1997. Bacterial community in copper sulfide ores inoculated and leached with solution from a commercial-scale copper leaching plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1344-1348.
- García, A.; Jerez, C. A. 1995. Changes of the solid-adhered populations of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Lepidospirillum ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans* in leaching ores as determined by immunological analysis. *Biohydrometallurgical Processing*. University of Chile, Vol. II, p. 9.
- Goebel, B. M., Stackebrandt, E. 1995. Molecular analysis of the microbial biodiversity in a natural acidic environment. *Biohydrometallurgical Processing*. University of Chile, Vol. II, pp. 43-52.

- González-Toril, E.; Gómez, F.; Rodríguez, N.; Fernández-Remolar, D.; Zuluaga, J.; Marín, I.; Amils, R. 2003. Geomicrobiology of the Tinto River, a model of interest for biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*. 71 (1-2), 301-309.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
- Johnson, D. B. 1995. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 23 (2): 205-218.
- Johnson, D. B., Hallberg, K. B. 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology* 154, 466-473.
- Johnson, D. B.; Okibe, N.; Hallberg, K. B. 2005. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 60 (3): 299-313.
- Karavaiko, G.; Turova, T.; Kondrat'eva, T.; Lysenko, A.; Kolganova, T.; Ageeva, S.; Muntyan, L.; Pivovarova, T. 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 113-119.
- Kreig, N. 1984-1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Estados Unidos: Lippincott Williams, pp. 1834-1871.
- Liu, W.; Huang, C.; Hu, J.; Song, L.; Ong, S. L.; Jung, W. 2002. Denaturing gradient gel electrophoresis polymorphism for rapid 16S rDNA clone screening and microbial diversity study. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93 (1): 101-103.
- Okibe, M.; Gericke, M.; Hallberg, K. B.; Johnson, D. B. 2003. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1936-1943.
- Peccia, J.; Marchand, E. A.; Silverstein, J.; Hernández, M. 2000. Development and application of small-subunit rRNA probes for assessment of selected *Thiobacillus* species and members of the genus *Acidiphilium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3065-3072.
- Pizarro, J.; Jedlicki, E.; Orellana, O.; Romero, J.; Espejo, R. T. 1996. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after of cultivation. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1323-1328.
- Rawlings, D. E. 1995. Restriction enzyme analysis of 16S rRNA genes for the rapid identification of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* strains in leaching environments. *Biohydrometallurgical Processing*. University of Chile, Vol. II, p. 9-17.
- Rodicio, M. R.; Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22: 238-245.
- Romero, J.; Yáñez, C.; Vásquez, M.; Moore, E. R. B.; Espejo, R. T. 2003. Characterization and identification of an iron-oxidizing, *Leptospirillum*-like bacterium, present in the high sulfate leaching solution of a commercial bioleaching plant. *Research in Microbiology*. 154 (5): 353-359.
- Rossi, G. 1990. *Biohydrometallurgy*. Hamburg: McGraw-Hill.
- Silverman, M. P.; Lundgren, D. G. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: an improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*. 77: 642-647.
- Solisio, C.; Lodi, A.; Veglio, F. 2002. Bioleaching of zinc and aluminium from industrial waste sludges by means of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Waste Management*. 22 (6): 667-675.
- Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173: 697-703.