



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología

**Diversidad molecular de consorcios microbianos
lixiviantes psicrotolerantes aislados de zonas mineras
de la provincia de Cerro de Pasco**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Jordan Euler BERNALDO AGÜERO

ASESOR

Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Bernaldo, J. (2016). *Diversidad molecular de consorcios microbianos lixiviantes psicrotolerantes aislados de zonas mineras de la provincia de Cerro de Pasco*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO PARASITÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 14:40 horas del 26 de mayo de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo de JORDAN EULER BERNALDO AGÜERO.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 003-EAPMP-2016, el titulado expuso su tesis: "DIVERSIDAD MOLECULAR DE CONSORCIOS MICROBIANOS LIXIVIANTES PSICROTOLERANTES AISLADOS DE ZONAS MINERAS DE LA PROVINCIA DE CERRO DE PASCO", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19....., calificativo: S.O.B. RESALIENTE CON MENCIÓN.....

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo a JORDAN EULER BERNALDO AGÜERO y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 16:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de mayo de 2016.

Dr. ABAD FLORES PAUCARIMA
(PRESIDENTE)

Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(ASESOR)

Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO
(MIEMBRO)

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(MIEMBRO)

A mi madre, quien con su inquebrantable fuerza, supo demostrarme que nunca se está muy débil o demasiado herido para continuar luchando.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo para la Innovación, Ciencia y Tecnología (FINCyT), por el financiamiento de esta tesis con el contrato 188-IB-FINCyT-2013.

Al Ph.D. Pablo Ramirez Roca, mi asesor, por la confianza depositada en mi persona y sus valiosos consejos para el desarrollo de la investigación.

A la M.Sc. Ruth García de la Guarda y al Blgo. Fernando De la Cruz por sus consejos y la ayuda prestada en la extracción del material genético.

Al Ph.D. Michel Abanto por su apoyo en la parte técnica del análisis bioinformático.

A mis compañeros de laboratorio, por las críticas constructivas y los debates enriquecedores.

A mi familia, por quienes aún sigo de pie.

RESUMEN

En el proceso de biolixiviación existen factores biológicos, físicos y químicos, que afectan el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, y por ende su rendimiento. Tal es así que la poca disponibilidad de O₂ y las bajas temperaturas en muchas unidades de producción minera ubicadas en regiones altoandinas limitan las operaciones de lixiviación bacteriana, ya que disminuyen la tasa de oxidación de hierro por microorganismos mesófilos. El presente estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes (CMLP) que puedan ser usados en procesos industriales de recuperación de metales en unidades de operación minera a gran altitud. Se colectaron en total 11 muestras de aguas ácidas procedentes de la Compañía minera Volcan (4 261 m.s.n.m.) localizada en la ciudad de Cerro de Pasco, de la minera Huarón (4 534 m.s.n.m.) ubicada en el distrito de Huayllay, y de la Laguna Yanamate (4 358 m.s.n.m.) localizada al sureste de la ciudad de Cerro de Pasco. Se aislaron y estudiaron 6 CMLP que oxidaron sulfuro de cobre 0.5% (p/v) y sulfuro de zinc 0.5% (p/v) a 5°C. Se evaluaron las cinéticas de crecimiento de los CMLP y se obtuvieron consorcios con tiempos de duplicación de hasta 49.5 horas en CuS y 60.8 horas en ZnS. Se evaluaron las cinéticas de liberación de cobre del mejor consorcio en CuS y un mineral azufrado, obteniendo mejores resultados en el sulfuro sintético (CuS), donde se liberó hasta 1.51 mg/L de cobre (II) por cada 10⁵ células/mL. Se extrajo DNA metagenómico de los seis consorcios y se secuenciaron las librerías de amplicones construidas usando los *primers* 27F y 518R. Los consorcios estuvieron compuestos en su mayoría por el género *Acidithiobacillus* sp. y solo en uno de ellos estuvo presente *Leptospirillum ferroxidans*. Se predijeron los metagenomas virtuales para cada CMLP, los cuales evidenciaron la presencia de genes para la resistencia a arsénico en el género *Acidithiobacillus* sp en todos los consorcios y genes para la resistencia a cobre solo en *Leptospirillum ferroxidans*; los genes codificantes de proteínas anticongelantes estuvieron presentes en

ambos géneros. Nuestros resultados representan el primer estudio sobre la caracterización de consorcios microbianos lixiviantes psicrotolerantes aislados de zonas mineras a gran altitud en el Perú.

ABSTRACT

The bioleaching processes are limited by the availability of O₂ and the low temperatures (from -3°C to 15°C) in Andean mining zones. These parameters limit bacterial leaching operations because decrease the rate of iron oxidation by mesophilic microorganisms. This study aimed to isolate and characterize microbial psychrotolerant consortia leaching (MPCL) that can be used in industrial processes for metal recovery units at high altitude mining operation. We collected and cultured 11 samples of acidic water from the Volcan mining company (4261 m.a.s.l) located in the city of Cerro de Pasco, the Huarón mine (4534 m.a.s.l) located in the district of Huayllay, and Yanamate Lake (4358 m.a.s.l) located at the southeast of the city of Cerro de Pasco. We obtained 6 MPCL that oxidized copper sulfide 0.5%(w/v) and zinc sulfide 0.5% at 5°C. Growth kinetics of the 6 MPCL were evaluated and doubling times of 49.5 hours for CuS and 60.8 hours for ZnS were obtained. The release of copper kinetics on CuS and synthetic sulphide were evaluated, obtaining better results in synthetic sulfide (CuS), where copper (II) was released to 1.51 mg/L for every 10⁵ cells/mL. Metagenomic DNA of the 6 consortia were extracted and sequenced. The amplicons libraries were built using 27F and 518R primers. The consortia were mostly composed for the genus *Acidithiobacillus* sp. and only in one of them *Leptospirillum ferroxidans* was present. Virtual metagenome for each consortia was predicted, and revealed the presence of genes for arsenic resistance in *Acidithiobacillus* sp. in all the consortias. Genes for copper resistance were only present in *Leptospirillum ferroxidans* and the antifreeze proteins ones were present in both species. In conclusion, the results represent the first study of molecular diversity and physiological characterization of microbial psychrotolerant consortia leaching isolated from mining areas at high altitude in Peru.

Keywords: leaching consortia, psychrotolerant, sulfides, diversity, virtual metagenome.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Mina Cerro de Pasco	3
2.2. Mina Huarón	3
2.3. Disolución de minerales sulfurados	4
2.4. Lixiviación de sulfuros de cobre	5
2.5. Lixiviación de sulfuros de zinc	7
2.6. Pirosecuenciamiento	10
2.6.1. Preparación de librería de amplicones	13
2.7. Análisis metagenómico	15
2.7.1. Análisis metagenómico basado en marcadores moleculares	15
2.7.2. Análisis basado en el gen ribosomal 16S	16
2.8. Predicción del contenido genómico	17
2.8.1. Predicción de metagenomas	18
2.8.1.1. <i>Hidden State Prediction</i>	19
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo General	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. Hipótesis	20
5. Materiales y métodos	21
5.1. Toma de muestras y análisis fisicoquímico	21
5.2. Obtención de consorcios microbianos acidófilos	23
5.2.1. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos en medio modificado 9K	23
5.2.2. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos en medio mínimo con azufre elemental 1% (p/v)	23
5.3. Análisis químico de las muestras	24
5.4. Cultivo de consorcios microbianos lixiviantes	25
5.4.1. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos en medio mínimo suplementado con sulfuro de cobre.	25
5.4.2. Cultivo de consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes en medio mínimo suplementado con sulfuro de zinc.	26
5.4.3. Cultivo de un consorcio microbiano lixiviante psicotolerante en medio mínimo con un mineral azufrado.	26
5.5. Cinética de crecimiento	27
5.5.1. Cinética de crecimiento de consorcios oxidadores de ion ferroso	27
5.5.2. Cinética de crecimiento de consorcios oxidadores de azufre	27
5.6. Caracterización de los consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes.	28
5.6.1. Cinéticas de crecimiento de los CMLP en medio mínimo con CuS	28
5.6.2. Cinéticas de crecimiento de los CMLP en medio mínimo con ZnS	28
5.6.3. Cinética de liberación de Cobre (II) de CuS	28

5.6.4.	Cinética de liberación de cobre (II) del mineral azufrado	29
5.7.	Extracción de DNA metagenómico	29
5.7.1.	Cuantificación de DNA	31
5.7.2.	Validación del DNA extraído mediante amplificación por PCR	32
5.8.	Pirosecuenciamiento	33
5.8.1.	Construcción de librerías de amplicones	33
5.9.	Análisis metagenómico de los consorcios microbianos lixiviantes	33
5.9.1.	Análisis de diversidad usando el <i>Ribosomal Data Project</i> (RDP) Pipeline	34
5.9.2.	Análisis de la distribución de <i>reads</i> usando MEGAN	35
5.9.3.	Análisis de diversidad usando la plataforma en línea MG-RAST	36
5.9.4.	Análisis de diversidad por OTUs usando Mothur	38
5.9.5.	Predicción y análisis del contenido genómico	39
5.9.5.1.	Predicción de metagenomas de los CMLP	39
5.9.5.2.	Análisis del contenido genómico en cada CMLP	40
6.	Resultados	41
6.1.	Muestreo y análisis de aguas ácidas de mina	41
6.1.1.	Obtención de las muestras y análisis fisicoquímicos	41
6.1.2.	Análisis químico de las muestras de agua ácida	43
6.2.	Cultivo de consorcios microbianos acidófilos	43
6.2.1.	Selección de consorcios ferro-oxidantes y tio-oxidantes	43
6.3.	Obtención de consorcios microbianos lixiviantes	46
6.3.1.	Obtención de consorcios lixiviantes de CuS y adaptación al frío	46
6.3.2.	Obtención de consorcios lixiviantes de ZnS y adaptación al frío	48
6.4.	Cinéticas de crecimiento para la selección del mejor CMLP	49
6.4.1.	Cinéticas de crecimiento de consorcios ferro-oxidantes a 5°C	49
6.4.2.	Cinéticas de crecimiento de consorcios tio-oxidantes a 5°C	51
6.4.3.	Cinéticas de crecimiento de consorcios lixiviantes de CuS a 5°C	53
6.4.4.	Cinéticas de crecimiento de los CMLP en ZnS a 5°C	55
6.5.	Cinéticas de liberación de cobre (II)	57
6.5.1.	Cinética de liberación de cobre en CuS	57
6.5.2.	Cinética de liberación de cobre en un mineral azufrado.	59
6.6.	Análisis metagenómico	61
6.6.1.	Extracción y cuantificación de DNA de los consorcios lixiviantes de CuS	61
6.6.2.	Amplificación de la región hipervariable V4 de los genes de rRNA 16S	61
6.6.3.	Análisis bioinformáticos	62
6.6.3.1.	Agrupamiento de reads con datos del muestreo usando RDP Pipeline	62
6.6.3.2.	Análisis de diversidad por especies usando MEGAN	66
6.6.3.3.	Análisis de diversidad por especies usando MG-RAST	70
6.6.3.4.	Análisis de diversidad por OTUs (<i>Operational Taxonomic Units</i>) usando Mothur	74
6.6.3.5.	Análisis del contenido metagenómico de los CMLP	77
7.	Discusión de resultados	85
8.	Conclusiones	91
9.	Referencias bibliográficas	92
10.	Anexos	103

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ejemplos de bacterias acidófilas y sus principales características.	9
Tabla 2. Análisis Mineralógico correspondiente al mineral azufrado empleado.	27
Tabla 3. Especificaciones para la filtración de secuencias crudas usando el RDP <i>Pipeline</i> .	34
Tabla 4. Especificaciones para el algoritmo LCA usados para el análisis de los seis consorcios.	35
Tabla 5. Especificaciones usadas en el análisis de la opción <i>Best Hit Classification</i> en la plataforma en línea MG-RAST.	37
Tabla 6. Coordenadas geográficas y parámetros fisicoquímicos de las muestras de aguas ácidas obtenidas en la provincia de Cerro de Pasco.	42
Tabla 7. Concentraciones de metales pesados en seis muestras de aguas ácidas provenientes de la provincia de Cerro de Pasco.	43
Tabla 8. Crecimiento de los consorcios microbianos ferro-oxidantes y tio-oxidantes en medio modificado 9K y medio mínimo con perlas de azufre respectivamente.	44
Tabla 9. Tiempo de adaptación para el crecimiento de los consorcios microbianos lixiviantes en medio mínimo con sulfuro de cobre 0.5% (p/v).	47
Tabla 10. Crecimiento de los consorcios microbianos lixiviantes en medio mínimo con sulfuro de zinc 0.5% (p/v).	48
Tabla 11. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales de los consorcios cultivados en medio modificado 9K.	49
Tabla 12. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales de los consorcios cultivados en medio mínimo más azufre elemental 1% (p/v) a 5°C.	51
Tabla 13. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales de los CMLP cultivados en medio mínimo más CuS 0.5% (p/v) y ZnS 0.5% (p/v) a 5°C.	55
Tabla 14. Valores de absorbancia y concentración obtenidos luego de cuantificar el DNA de los consorcios en un espectrofotómetro NanoDrop Lite.	61
Tabla 15. Resumen de los alineamientos efectuados por la plataforma de análisis metagenómico MG-RAST usando como base de datos: RDP, SSU y Greengenes.	71
Tabla 16. Valores de diversidad alfa calculados para cada consorcio en la plataforma MG-RAST.	74
Tabla 17. Índices de diversidad alfa calculados para cada consorcio lixiviante en el software Mothur v 1.35,	76
Tabla 18. Identificación taxonómica de cada OTU, comparados a la base de datos RDP.	76
Tabla 19. Valores del <i>Nearest Sequenced Taxon Index</i> (NSTI) para cada consorcio lixiviante.	77

Tabla 20. Cantidades de genes por genoma y porcentajes de contribución de los genes evaluados para cada consorcio lixivante.	78
Tabla 21. Genes ausentes en el análisis de los metagenomas virtuales de los CMLP.	84
Tabla 22. Reporte de la calidad de las librerías de amplicones construidas por MACROGEN.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Transporte de electrones en la biolixiviación de sulfuros en presencia de iones Fe^{+2} , Fe^{+3} .	6
Figura 2. Pirosecuenciamiento usando la plataforma Titanium Roche/454, complejos perlas-fragmentos estan dispuestos en cada posillo y junto a ellos perlas conteniendo sulfurilasa y luciferasa.	11
Figura 3. La luz generada por la cascada de reacciones enzimáticas es guardada como una serie de picos llamados <i>flowgrams</i> .	12
Figura 4. Representación esquemática de la amplificación de los productos generados en la preparación de la librería de amplicones, los cebadores A o B servirán para una subsecuente amplificación clonal y el secuenciamiento propiamente dicho.	13
Figura 5. Formación de secuencias quimera durante la PCR. Un producto de extensión abortado puede servir de cebador a una reacción de PCR posterior.	14
Figura 6. Mapa de pasivos ambientales en la provincia de Cerro de Pasco, indicando los once puntos muestreados.	22
Figura 7. Flujoograma desarrollado por la plataforma en linea MG-RAST.	37
Figura 8. A: Aguas ácidas en la Localidad de Quiulacocha; B: Laguna Yanamate, aguas ácidas producto de la actividad minera en los alrededores; C: Aguas ácidas en la Unidad de Producción Minera Huarón.	41
Figura 9. A: Consorcio ferro-oxidante QuF5 crecido a 5°C. B: Consorcio tio-oxidante YanS2 crecido a 10°C, nótese la turbidez.	45
Figura 10. Consorcio microbiano lixivante QuF5 en medio mínimo con sulfuro de cobre, nótese el color azul del sobrenadante.	46
Figura 11. Cinética de crecimiento en medio 9K modificado, pH 1.85 a 5 °C de los once consorcios oxidadores de ion ferroso QuF1(-▲-), QuF2(-X-), QuF3(-◆-), QuF4(-■-), QuF5(-*-), SBF1(-●-), SBF2(-◇-), HuF1(-□-), HuF2(-△-), YanF1(-○-), YanF2(-+-).	50
Figura 12. Cinética de crecimiento en medio mínimo más azufre elemental 1% (p/v), pH 2.5 a 5°C de los once consorcios oxidadores de azufre QuS1(-▲-), QuS2(-X-), QuS3(-◆-), QuS4(-■-), QuS5(-*-), SBS1(-●-), SBS2(-◇-), HuS1(-□-), HuS2(-△-), YanS1(-○-), YanS2(-+-).	52
Figura 13. Cinética de crecimiento en medio mínimo más CuS 0.5% (p/v), pH 2.5 a 5°C de los seis consorcios microbianos lixiviantes psicrotolerantes elegidos, QuF1(A), QuF3(B), QuF4(C), QuF5(D), SBF1(E) y QuS3(F).	54
Figura 14. Cultivos de CMLP en medio mínimo suplementado con sulfuro de Zinc a 5°C en reposo (izquierda) y agitación (derecha).	55

Figura 15. Cinética de crecimiento en medio mínimo más ZnS 0.5% (p/v), pH 2.5 a 5°C de los seis CMLP elegidos, QuF1(A), QuF3(B), QuF4(C), QuF5(D), SBF1(E) y QuS3(F).	56
Figura 16. Cinética de liberación de cobre (II) del consorcio QuF1 en medio mínimo suplementado con CuS donde se muestra la curva de liberación de cobre y la curva de crecimiento del consorcio QuF1.	58
Figura 17. Cultivos por triplicado del consorcio QuF1 y un cultivo blanco en medio mínimo suplementado con un mineral azufrado que contenía calcopirita.	59
Figura 18. Cinética de liberación de cobre (II) del consorcio QuF1 en medio mínimo suplementado con un mineral azufrado compuesto por CuFeS ₂ donde se muestra la curva de liberación de cobre y la curva de crecimiento del consorcio QuF1.	60
Figura 19. Abundancia de <i>reads</i> agrupados por género versus las concentraciones de cobre total en las muestras (A) y zinc total en las muestras (B).	63
Figura 20. Abundancia de <i>reads</i> agrupados por género versus el pH de las muestras.	64
Figura 21. Mapas de calor mostrando la abundancia relativa de los <i>reads</i> analizados respecto al género y la concentración de cobre total (A), concentración de zinc (B) y el pH de las muestras (C) respectivamente.	65
Figura 22. Análisis comparativo de la abundancia de <i>reads</i> presentes por cada especie en los seis consorcios lixiviantes, las cantidades presentadas por cada especie siguen el orden: QuF1/QuF3/QuF4/QuF5/QuS3/SBF1.	67
Figura 23. Árbol agrupando los consorcios lixiviantes analizados.	69
Figura 24. Curva de rarefacción de los <i>reads</i> correspondientes al consorcio QuF01 construida en la plataforma MG-RAST.	73
Figura 25. Mapa de calor obtenido por Mothur representando los OTUs hallados versus los consorcios lixiviantes analizados.	74
Figura 26. Diagrama de Venn comparando la composición de OTUs entre los consorcios QuF1, QuF3, QuF4 y QuS3.	75
Figura 27. Criterios de calidad de las librerías de amplicones admitidas por MACROGEN para su posterior secuenciamiento por el sistema GS FLX Plus 454 Pyrosequencing, el presente proyecto se encuentra incluido en el criterio remarcado por el recuadro rojo.	103
Figura 28. Procesamiento inicial llevado a cabo por la plataforma en línea del RDP <i>Pipeline</i> . A: Histogramas denotando la longitud promedio de los <i>reads</i> analizados, B: calidad promedio de los nucleótidos de acuerdo a su posición en los <i>reads</i> .	104

ABREVIATURAS

AMD	Drenaje ácido de mina
rDNA	Gen codificante para el ácido ribonucleico ribosomal.
UTM	<i>Universal Transverse Mercator</i>
rpm	Revoluciones por minuto.
CMLP	Consortio Microbiano Lixivante Psicrotolerante
DT	Desviación Estandar
emPCR	Reacción en cadena de la Polimerasa en Emulsión
ng	Nanogramos
μL	Microlitros
μm	Micrómetro
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
OTU	Unidad Taxonómica Operacional
RDP	<i>Ribosomal Data Project</i>
LCA	<i>Lowest Common Ancestor</i>
ASR	<i>Ancestral State Reconstruction</i>
HSP	<i>Hidden State Prediction</i>
NSTI	<i>Nearest Sequenced Taxonon Index</i>

1. INTRODUCCIÓN

La lixiviación bacteriana o biolixiviación, constituye un método eficiente y de bajo costo para la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley; pero su principal desventaja es que demora mucho tiempo en la recuperación de los metales. La demora se vuelve mas notoria en condiciones desfavorables para el proceso, como por ejemplo la poca disponibilidad de oxígeno o las bajas temperaturas (Pradhan *et al.*, 2008), características de varias provincias alto andinas en el Perú, donde operan importantes unidades de extracción de minerales en las que las condiciones atmosféricas son limitantes para la vida microbiana (Abanto *etal.*, 2013).

En el proceso de biolixiviación existen factores ambientales, biológicos, físicos y químicos, que afectan el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, y por ende su rendimiento; tales como pH, O₂, CO₂, nutrientes, temperatura, fuente de energía, luz, presencia de inhibidores, potencial redox y tamaño de las partículas (Pradhan *et al.*, 2008). Estos factores son difíciles de controlar, especialmente en aplicaciones de mayor envergadura; como ejemplo, a bajas temperaturas la acción de las bacterias disminuye y con ello la recuperación del mineral, lo mismo sucede con la poca disponibilidad de oxígeno (COCHILCO, 2009).

Muchas unidades de producción minera en nuestro país, se encuentran ubicadas en regiones donde la altitud sobrepasa los 3 000 m.s.n.m., ubicándose la Unidad Minera San Rafael incluso a 5 200 m.s.n.m. en el departamento de Puno (Ministerio de Energía y Minas, 2012). A mayores altitudes, la presión atmosférica disminuye y con ello la disponibilidad de oxígeno ambiental, esto repercute en los sistemas de lixiviación bacteriana a gran altura. Por otra parte, las temperaturas bajas en las provincias a gran altitud son normales, teniendo medias de 12°C para las temperaturas máximas y 5°C para

las temperaturas mínimas respectivamente en las zonas de operación minera a gran altitud (SENAMHI, 2004).

Además, algunos procesos de biolixiviación son realizados con un número limitado de microorganismos porque se desconoce la identidad y las características de la mayoría de ellos, que forman parte de consorcios lixiviantes con interacciones microbianas complejas y distintos patrones de nutrición (Erlich, 1999; Johnson, 1998; Edwards *et al.*, 2000).

La eficiencia en la recuperación de minerales, no es la única razón para llevar a cabo investigaciones en la ecología de los consorcios microbianos lixiviantes, pues la preservación del ambiente es otra razón importante para la explotación de estos minerales refractarios; de no usarse, la exposición a la intemperie de las relaveras o montones de minerales de baja ley generados en los procesos mineros, podrían poner en peligro el ambiente y la salud humana por la liberación de metales pesados junto con drenajes ácidos de mina, a fuentes de agua superficial, subterránea o de otro tipo (Pradhan *et al.*, 2008).

Para la investigación de nuevos microorganismos con potencial lixiviante, se han venido utilizando herramientas moleculares, logrando resultados prometedores. Entre las herramientas moleculares de mayor eficiencia, encontramos el análisis del material genético total, conocido como metagenómica. Entre las múltiples aplicaciones de la metagenómica, encontramos que este tipo de análisis tiene elevado potencial para determinar la estructura de la comunidad microbiana de las operaciones de biolixiviación, también puede generar conocimientos de cómo se ejecutan las relaciones de cooperación en un consorcio microbiano y el modo en que se pueden formular nuevas alternativas de cultivo de microorganismos que previamente no podían ser cultivados (Holmes y Bonnefoy, 2006).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Mina Cerro de Pasco (Cobbing *etal.* , 1996)

Depósito polimetálico que se encuentra entre los distritos de Chaupimarca y Yanacancha en la provincia y departamento de Pasco a una altitud de 4 330 m.s.n.m. Las coordenadas UTM (*Universal Transverse Mercator*) de su ubicación son: 8 819 500 – N y 362 400 – E, localizada en las estribaciones occidentales de la Cordillera Central de los Andes Peruanos.

Los minerales de importancia económica son: esfalerita, marmatita, galena y matildita y los de ganga son; pirita, marcasita, pirrotita, siderita, bismutinita, magnetita, con elementos trazas en ppm de Mn – Cu – Sn – W.

2.2. Mina Huarón (Cobbing *etal.* , 1996)

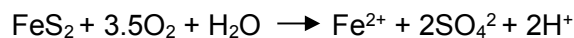
Se ubica a 40 Km al S 30° O de la ciudad de Cerro de Pasco, entre las coordenadas (UTM) 8 783 305 – N y 345 659 – E; a una altitud de 4 540 m.s.n.m.

El yacimiento es de origen hidrotermal – filoneano, está formado por estructuras mineralizadas de 3 tipos: vetas (dentro de fallas), mantos (en forma estratiforme) y bolsonadas.

El mineral de mena está constituido por enargita, tetraedrita, galena y marmatita y los de ganga son: pirita, cuarzo y rodocrosita. Las alteraciones que presenta son silicificación, piritización y epidotización.

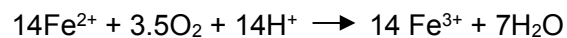
2.3. Disolución de minerales sulfurados

Muchos factores impactan la generación de drenajes ácidos de mina (AMD). En parte, las tasas de disolución se determinan por la química de los fluidos, los minerales, el tipo de roca, y la temperatura. La tasa de suministro de reactivos oxidantes a la superficie del mineral influye en la velocidad a la que se disuelve la pirita. Los oxidantes típicos son el oxígeno y el hierro férrico. La concentración de oxígeno en el agua subterránea es muy pequeña comparada con el gran requerimiento de O₂ en la reacción global (Lufin, 2007):

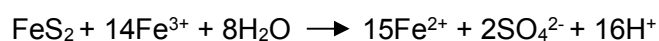


Por lo tanto, la fuente predominante de oxígeno en los sistemas de oxidación rápida es el aire. De hecho, en la creación de AMD, las soluciones deben ser re-oxigenadas a cientos de miles de veces a lo largo de su trayectoria (Baker y Banfield, 2003).

Los estudios geoquímicos han establecido que el oxígeno es un oxidante menos efectivo que el hierro férrico. Por lo tanto, la vía dominante para la disolución de pirita implica la oxidación por hierro ferroso:



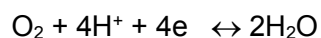
Seguido por la reducción de hierro férrico por un sulfuro:



2.4. Lixiviación de sulfuros de cobre

En operaciones de lixiviación la remoción de electrones desde los sulfuros es llevada a cabo por introducción de un agente oxidante en la solución de lixiviación. En términos termodinámicos, este agente oxidante puede ser cualquier par redox con un potencial termodinámico más positivo que el asociado a la disolución anódica del respectivo sulfuro de cobre (Lufin, 2007).

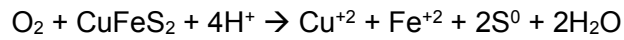
La lixiviación bacteriana de minerales de sulfuro se basa en el uso combinado de dos oxidantes, ión férrico y oxígeno. La semi-reacción asociada a la reducción del oxígeno es:



Sin embargo, la velocidad de oxidación de ión ferroso en condiciones abióticas es muy lenta para ser considerada una alternativa tecnológica atractiva. Por otro lado, la oxidación de ión ferroso con oxígeno es fuertemente catalizada en presencia de microorganismos lixiviantes (Menadier, 2009).

En 1970 se informó que *Acidithiobacillus ferrooxidans* incrementó la velocidad de oxidación de ión ferroso en un millón de veces comparado con la oxidación química abiótica del ión ferroso con oxígeno disuelto. Hay una variedad de microorganismos los cuales catalizan la oxidación de ión ferroso y/o catalizan la oxidación de compuestos de sulfuros reducidos (Lufin, 2007).

Reacción para la lixiviación de la calcopirita:



Por ello, el oxígeno es el único oxidante consumido en el proceso de lixiviación, y este es obtenido desde el aire el cual es proporcionado por una aireación forzada. Hay sólo consumo neto de ácido el cual está relacionado con el ácido requerido para la oxidación del ión ferroso. En los procesos industriales hay consumo adicional ligado a la neutralización de las especies presentes en la ganga.

En procesos industriales el ácido es suministrado como ácido sulfúrico, sin embargo, el ácido requerido puede ser parcialmente generado.

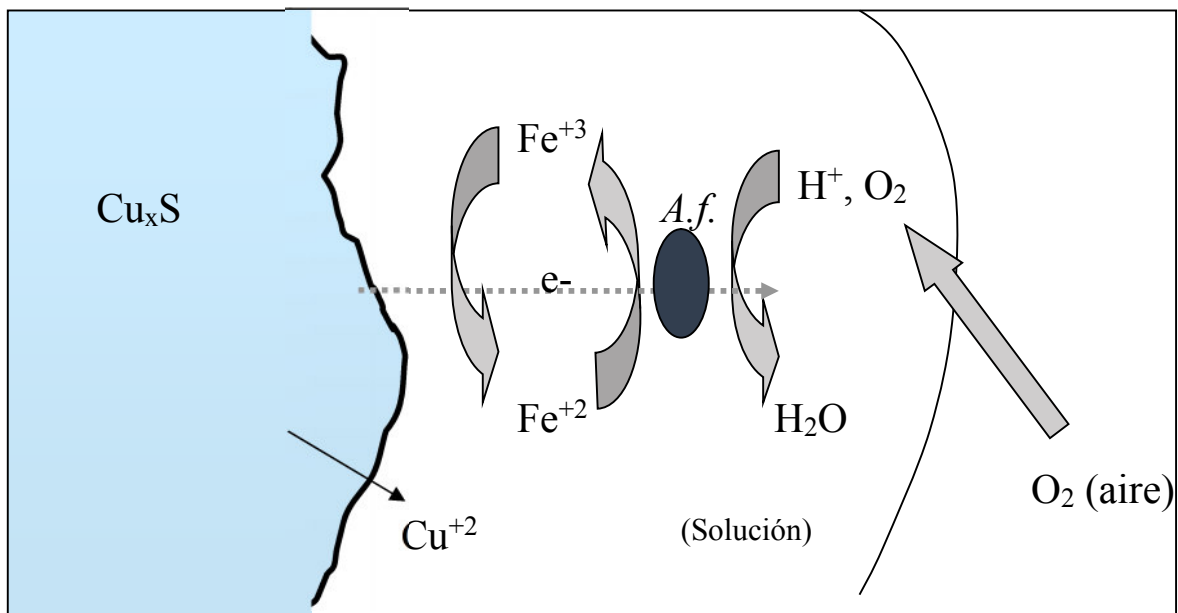


Figura 1. – Transporte de electrones en la biolixiviación de sulfuros en presencia de iones Fe^{+2} , Fe^{+3} (Lufin, 2007).

2.5. Lixiviación de sulfuros de zinc

Los potenciales beneficios de la biolixiviación comercial de los minerales de zinc son significativos en la explotación de minerales de baja ley y en el tratamiento de concentrados de zinc, que son difíciles de procesar utilizando tecnologías convencionales. Adicionalmente, la biolixiviación de concentrados de zinc, en comparación con la ruta tradicional: tostado/lixiviación/extracción electrolítica, tiene la ventaja de no requerir el tostado y lavados con ácido sulfúrico y efluentes gaseosos (Jerez, 2011).

La biolixiviación de concentrados de zinc utilizando microorganismos autótrofos acidófilos ha sido ampliamente estudiada. Se encontró que la velocidad de oxidación de ZnS y otros sulfuros estaba relacionada con su solubilidad (Torma y Sakaguchi, 1978); se determinó que cuanto mayor es la solubilidad del mineral sulfurado, más alta era la velocidad de disolución. Esta última observación también fue establecida después de cultivar *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un medio de cultivo libre de hierro, con esfalerita sintética, como única fuente de energía (Tributsch y Bennett, 1981a, b).

Son conocidos los mecanismos directos (contacto) e indirectos, por ser responsables del ataque bacteriano en minerales sulfurados. El mecanismo indirecto funciona por la acción del sulfato férrico ácido producido por el metabolismo bacteriano. El mecanismo directo implica el ataque de las bacterias, para lo cual se requiere un contacto íntimo. El mecanismo de acción directo sigue siendo objeto de debate. El conocimiento actual del mecanismo de solubilización de metales se suponía principalmente un proceso químico, aunque la unión de los microorganismos al mineral puede mejorar la disolución (Boon, 2001). El ataque químico es llevado a cabo por una combinación de hierro férrico y ácido (protones), mientras que el

papel de los microorganismos es generar el hierro férrico y el ácido a través de las vías de tiosulfato o polisulfuro dependiendo del tipo de mineral (Schipper y Sand, 1999). Además, sugieren que el mecanismo indirecto determinado bio-oxidación de ZnS con *Thiobacillus ferrooxidans* (actualmente *Acidithiobacillus ferrooxidans*), en el que el ZnS reacciona químicamente con Fe^{3+} , Fe^{2+} y S^0 que fueron oxidados por las bacterias (Fowler y Crundwell, 1998).

Tabla 1. Ejemplos de bacterias acidófilas y sus principales características (Liljeqvist, 2012)

	Especies	S ₀	Fe ²⁺	Fuente de Carbono	Temperatura
Proteobacteria	<i>Acidithiobacillus</i>	X	-	Hetero	mT
	<i>Acidiphilium acidiphilum</i>	X	-	Hetero	M
	<i>Acidiphilium angustum</i>	-	-	Hetero	?
	<i>Acidiphilium cryptum</i>	X	-	Hetero	M
	<i>Acidiphilium multum</i>	-	-	Hetero	M
	<i>Acidiphilium ganium</i>	-	-	Hetero	M, Tt
	<i>Acidiphilium butanum</i>	X	-	Hetero	?
	<i>Acidithiobacillus bifaciens</i>	-	-	Hetero	M
	<i>Acidithiobacillus caldenensis</i>	X	-	Auto	M
	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	X	-	Mixo	mT
	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	X	X	Auto	M, Pt
	<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>	X	X	Auto	M
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	X	-	Auto	M
	<i>Acidoella aminobuta</i>	-	-	Hetero	M
	<i>Acidoella facilis</i>	-	-	Hetero	M
	<i>Acidoella mahanbica</i>	-	-	Hetero	M
	<i>Thiobacillus thiophilus</i>	X	-	Auto	M
	<i>Thiobacillus</i>	X	X	Auto	M
<i>Thiomargarita</i>	X	-	Mixo	M	
Nitrospira	<i>Leptospira ferrodans</i>	-	X	Auto	M
	<i>Leptospira ferripila</i>	-	X	Auto	M, Tt
	<i>Leptospira ferrihalophilum</i>	?	X	Auto	M
	<i>Leptospira hemiferridans</i>	-	X	Auto	mT
	<i>Acidobacterium capatum</i>	-	-	Hetero	M
	<i>Acidimicrobium ferrodans</i>	-	X	Mixo	mT
	<i>Ferromicrobium acidiphilum</i>	-	X	Hetero	M
Firmicutes	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	?	-	Hetero	mT
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	-	-	Hetero	T
	<i>Alicyclobacillus acidobutylicus</i>	-	-	Hetero	mT
	<i>Alicyclobacillus aceticus</i>	-	-	Hetero	mT
	<i>Alicyclobacillus acididurans</i>	X	X	Mixo	M, Pt
	<i>Alicyclobacillus thebais</i>	?	-	Hetero	T
	<i>Alicyclobacillus thepripidum</i>	?	-	Hetero	mT
	<i>Alicyclobacillus sp.</i>	?	-	Hetero	mT
	<i>Alicyclobacillus sandaierensis</i>	?	-	Hetero	mT
	<i>Alicyclobacillus durans</i>	X	X	Mixo	M
	<i>Alicyclobacillus duranalis</i>	-	-	Hetero	mT
	<i>Caldibacillus ferri</i>	X	X	Mixo	mT
	<i>Strobacillus acidophilus</i>	X	X	Mixo	mT
	<i>Strobacillus nobilis</i>	X	X	Mixo	M
	<i>Strobacillus</i>	X	X	Mixo	mT
	<i>Strobacillus hemidurans</i>	X	X	Mixo	mT
	<i>Strobacillus hemidurans</i>	X	X	Mixo	M, Tt

Abreviaciones: Auto=autótrofo; Hetero=heterótrofo; Mixo=mixótrofo o autótrofo facultativo; M=Mesófilo; mT=Termófilo moderado; Pt=Psicrotolerante; Tt=Termotolerante; T=Termófilo; X=positivo; - =negativo; ?= Sin datos disponibles; S₀= Azufre elemental; Fe²⁺= Ion Ferroso.

2.6. Pirosecuenciamiento

La pirosecuenciación es un método de secuenciamiento bioluminiscente, que mide la liberación de pirofosfato inorgánico convirtiéndolo en una señal de luz visible mediante una serie de reacciones catalizadas por la enzima luciferasa; la cantidad de luz producida será proporcional al número de nucleótidos incorporados. El orden y la intensidad de los picos de luz, son guardados como *files*, revelando el orden subyacente de la secuencia de DNA (Metzker, 2010).

En la plataforma Roche/454 la librería es mezclada con perlas de agarosa de aproximadamente 28 μm , las cuales contienen en su superficie oligonucleótidos complementarios a los adaptadores - 454 (oligonucleótidos) unidos a las secuencias en la librería preparada, por ello cada perla de agarosa esta asociada a un determinado tipo de secuencia proveniente de la librería. Luego, cada uno de los complejos perla-fragmento es aislado en micelas de agua y aceite que contienen los reactantes propios de una PCR, resultando como producto aproximadamente un millón de copias de cada fragmento de DNA en la superficie de la perla. Posteriormente, todas las moléculas amplificadas serán secuenciadas en masa.

Previo al secuenciamiento, los complejos perla-fragmentos, son dispuestos en placas PTP (*PicoTiterPlate*, una estructura capilar de silica), que captura solo un complejo en cada uno de los cientos de miles de pocillos que posee proveyendo una localización fija sobre la cual puede ser monitorizado cada uno de los procesos de secuenciamiento. Las enzimas y demas reactantes para el secuenciamiento son agregados posteriormente y centrifugados para ayudar a rodear las perlas fijas en los pocillos (Figura 2).

Roche/454 — Pirosecuenciación

1-2 millones de arreglos de perlas cargadas en pocillos PTP

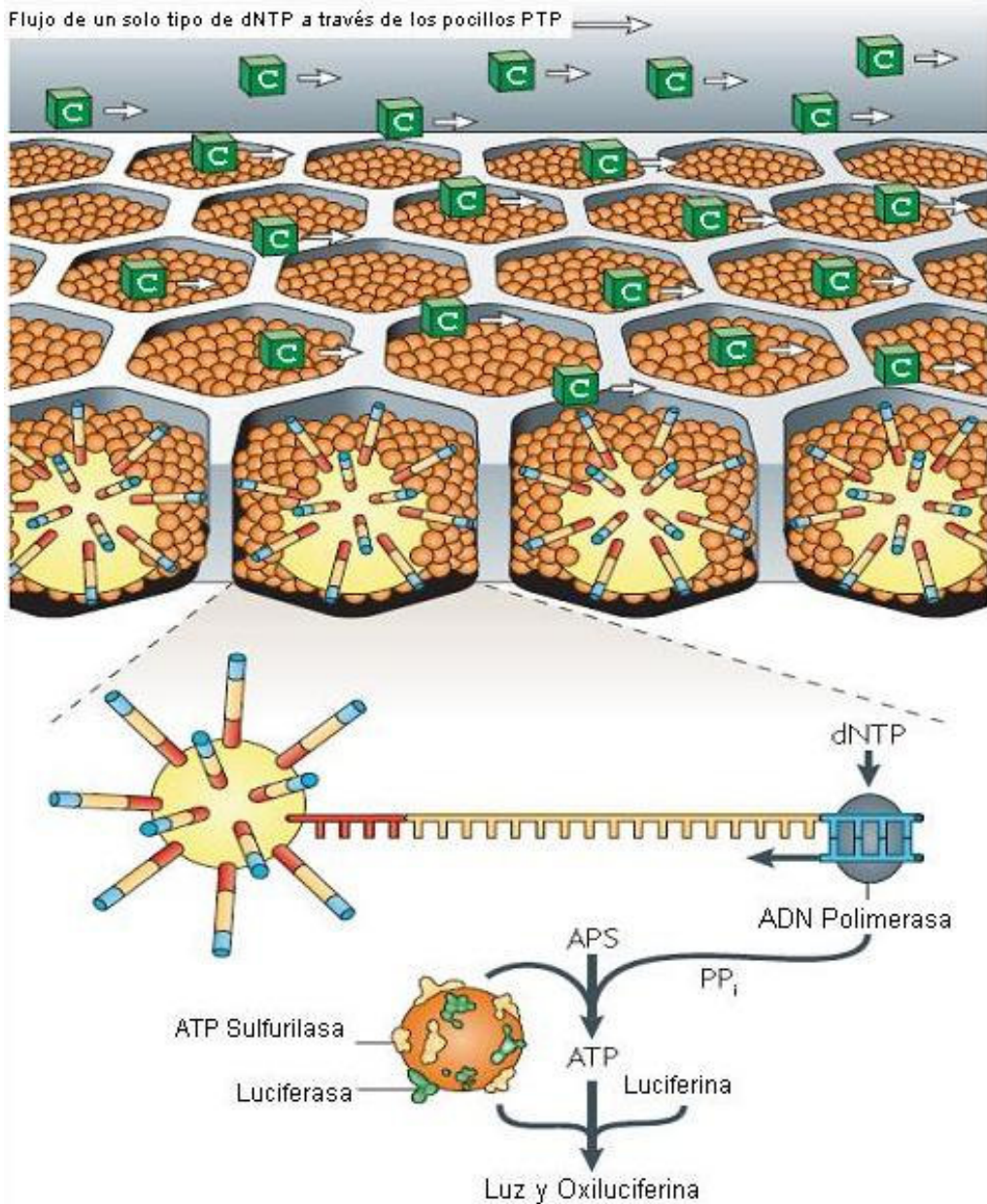


Figura 2. Pirosecuenciamiento usando la plataforma Titanium Roche/454, los complejos perlas-fragmentos están dispuestos en cada pocillo y junto a ellos perlas conteniendo la ATP sulfurilasa y luciferasa (Metzker, 2010).

Ya en cada pocillo, el flujo de nucleótidos es independiente con un proceso de toma de imagen posterior a cada adición de un nucleótido en cada una de las perlas, gracias a una cámara CCD (*Charged-coupled device*) que esta situada opuesta a la placa PTP. Primero se toman imágenes correspondientes a una secuencia TCGA provenientes del adaptador adyacente a los *primeros*, esto sirve para calibrar el *flujo* del secuenciador que leerá los *flujos* correspondientes a cada pocillo, sin embargo, este proceso de calibración no alcanza a dilucidar homopolímeros mayores a 6 nucleótidos. En contraste, los errores de sustitución son raros en los *reads* obtenidos mediante el secuenciamiento con esta tecnología (Figura 3).

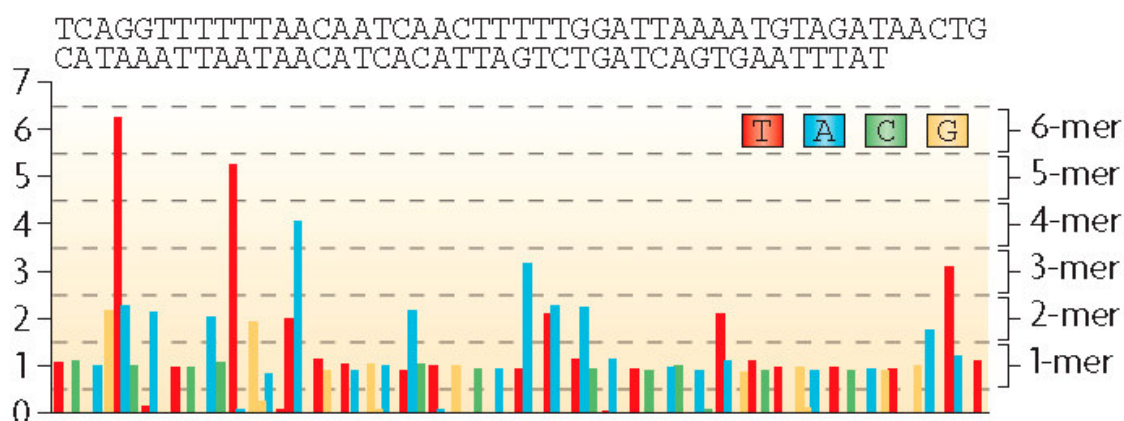


Figura 3. La luz generada por la cascada de reacciones enzimáticas es guardada como una serie de picos llamados *flujos* (Metzker, 2010).

La tecnología FLX ofrecida por la plataforma Roche/454 proporciona 100 *flujos* de cada nucleótido durante unas 8 horas de corrida, lo cual produce una longitud media de 250 nucleótidos (incorporadas en una media de 2.5 bases por flujo) para cada *read*, luego, estas secuencias crudas son procesadas por el *software* de análisis de la aplicación 454, filtrando secuencias de baja calidad, secuencias mezcladas (más de un fragmento inicial por perla) y secuencias sin el fragmento inicial TCGA (Mardis, 2008).

2.6.1. Preparación de librería de amplicones (Jarvie, 2007).

La tecnología *Genome Sequencer* ofrecida por la plataforma Roche/454 proporciona una “clonación instantánea” de cientos de miles de moléculas a través de una etapa de PCR en emulsión.

La preparación de DNA de la muestra para una secuenciación de amplicones primero consiste en una reacción de amplificación por PCR con cebadores especialmente fusionados (Figura 4). Los cebadores fusionados constan de un fragmento específico al DNA problema de 20-25 pb (extremo 3') y una secuencia fija de 19 pb (cebador A o B en el extremo 5'). La secuencia de 19 pb que existe en las formas “A” o “B” sirve para solapar con otros componentes en los posteriores procesos del secuenciamiento.

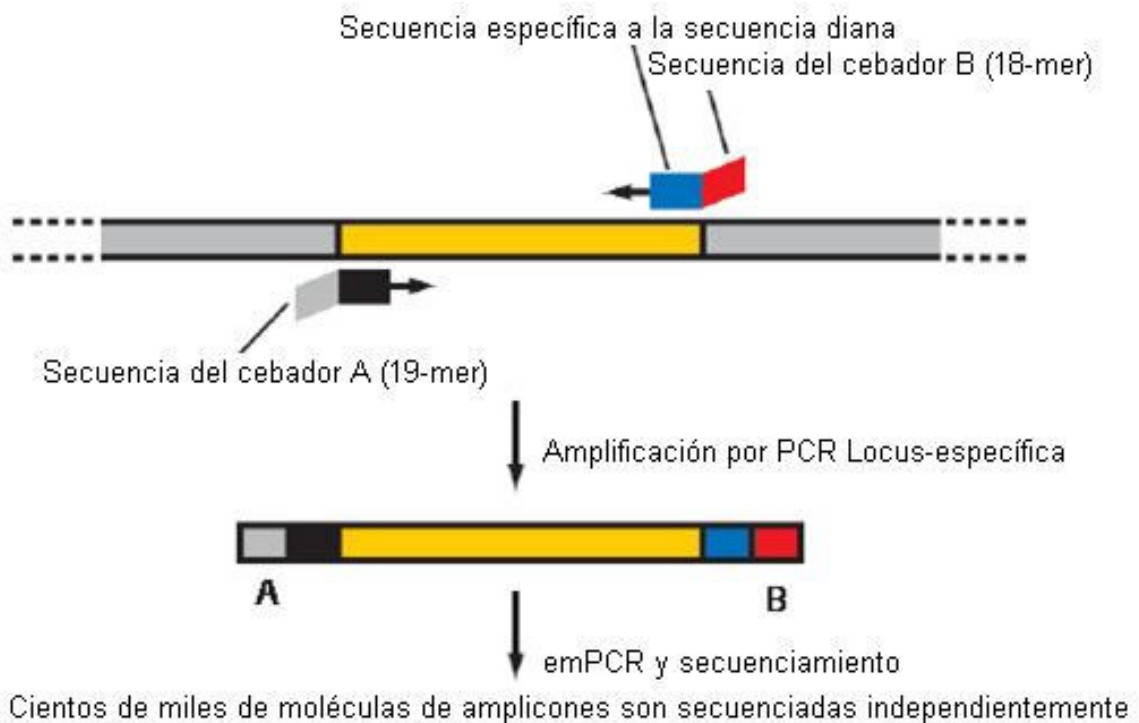


Figura 4. Representación esquemática de la amplificación de los productos generados en la preparación de la librería de amplicones, los cebadores A o B servirán para una subsecuente amplificación clonal y el secuenciamiento propiamente dicho (Jarvie, 2007).

Los amplicones a ser secuenciados con el sistema *Genome sequencer* no deben pasar los 500 pb, pues de lo contrario no amplificarán bien en la posterior reacción emPCR.

Durante la preparación de amplicones, pueden generarse secuencias quimeras, las cuales son artefactos generados durante la PCR y corresponden a secuencias de DNA compuestas de secuencias de DNA de dos o más secuencias parentales cuya formación se detalla en la figura 5. Estas secuencias quimeras pueden dar la impresión de que se trata de una secuencia recién descubierta, por lo cual antes de cualquier análisis se deberán descartar estos artefactos de la PCR (Schloss *etal.* , 2011).

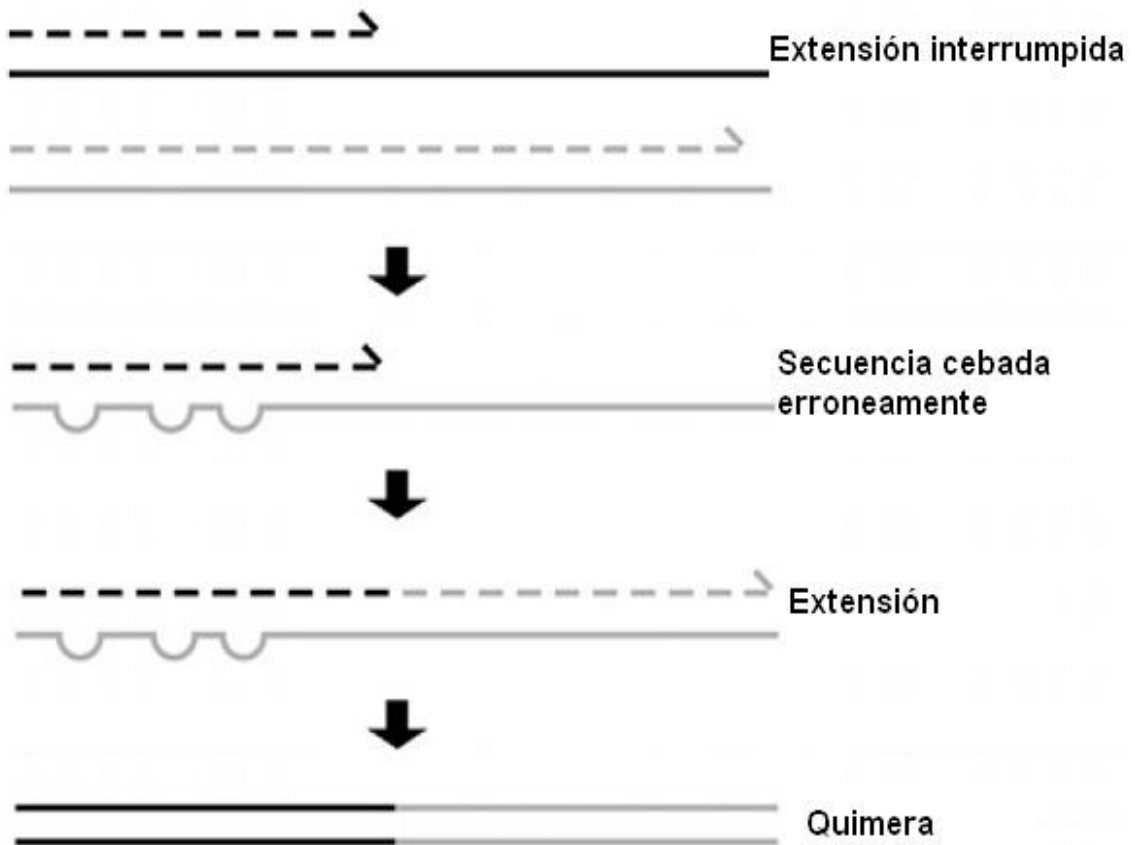


Figura 5. Formación de secuencias quimera durante la PCR. Un producto de extensión abortado puede servir de cebador a una reacción de PCR posterior (Haas *etal.* , 2011).

2.7. Análisis metagenómico

Definido como el análisis de la información genética de los genomas colectivos de los microorganismos (metagenoma) dentro de un entorno determinado, independiente del proceso de cultivo y basándose en su muestreo (Gurgui y Piel, 2010). Se centra en la recopilación de información genética a través de una secuencia diana que puede ser ADN, ARN, o ambos.

2.7.1. Análisis metagenómico basado en marcadores moleculares

Los análisis pueden centrarse exclusivamente en una secuencia conservada, un marcador filogenético, genes funcionales, o la representación de la diversidad genética incluyendo genes sin anotación.

Con la finalidad de determinar los perfiles taxonómicos, gran parte de la información genómica disponible en los genomas de referencia (por ejemplo, secuencias conservadas a través de múltiples taxones) es útil, pero en ocasiones puede ser engañosa (por ejemplo, los genes transferidos horizontalmente). Los enfoques con marcadores moleculares ayudan a pre-procesar los genomas de referencia para eliminar secuencias redundantes y no discriminatorias y centrarse en los marcadores taxonómicamente informativos. Como consecuencia, esto reduce el tamaño de la base de datos de genomas de referencia y por lo tanto disminuyen los requisitos computacionales necesarios para comparar secuencias de los metagenomas contra sólo una fracción de cada genoma. Para obtener perfiles taxonómicos, dos clases de marcadores han sido aprovechados hasta ahora: los marcadores universales y los marcadores clado-específico (Izard y Rivera, 2015).

Los marcadores universales son aquellas secuencias que: (i) están presentes en todos los microorganismos y (ii) poseen regiones variables que pueden ser explotadas como etiquetas taxonómicas o filogenéticas. El gen ribosomal 16S es el ejemplo más

notable de marcador universal que se ha utilizado durante décadas para la investigación taxonómica y filogenética, y varios enfoques de secuenciación *highghp* rentables se centran ahora en la diversidad de un subconjunto de sus nueve regiones hipervariables (Hamady y Knight, 2009).

Las regiones no ubicuas de genomas microbianos pueden ser aprovechadas centrándose en los genes marcadores clado-específicos que están únicamente presentes en cada clado taxonómico, por ejemplo, en cada especie (Segata y Huttenhower, 2011). Estos genes se definen como genes fundamentales dentro de un clado específico, sin similitud de secuencia con ningún otro gen fuera de este. Son, pues, las huellas dactilares únicas de cada clado microbiano y pueden discriminar organismos estrechamente relacionados con alta precisión con sólo la comprobación de su presencia o ausencia en el metagenoma (Huang *etal* ., 2014).

2.7.2. Análisis basado en el gen ribosomal 16S

Los métodos que se basan en el mapeo de *eads* en genomas previamente secuenciados, no logran caracterizar grandes fracciones de las poblaciones microbianas, como muchos microorganismos que aún no se han aislado ni secuenciado. Los algoritmos de alineamiento existentes pueden determinar relaciones muy estrechas y sólo pueden ser usados para analizar microorganismos ambientales que están más estrechamente relacionados a los genomas en las bases de datos públicas.

Se pueden inferir un mayor número de relaciones distantes a través del uso de técnicas *machine-learning* en un proceso denominado *binning* taxonómico o clasificación taxonómica. Estas herramientas tratan de asignar cada *ead* a un "*bin*" taxonómico generalmente aproximándose a un amplio grupo taxonómico como un género o una familia. Una de las primeras herramientas en este campo se basó en simples búsquedas *blast* para identificar coincidencias en una base de datos de secuencias con origen

taxonómico conocido. Otros enfoques se centran en los perfiles *k-mer* (patrones cortos de ADN, por lo general de tres a cuatro pares de bases de longitud) de secuencia, usando técnicas *machine-learning* frente a las bases de datos pre-calculadas y construidas a partir de genomas conocidos (Izard y Rivera, 2015).

La composición del ADN es ampliamente consistente a través de los grupos taxonómicos (Karlín *et al.* , 1997) proporcionando así una clasificación útil incluso cuando la similitud de secuencias no puede ser detectada a través del alineamiento.

Un desarrollo reciente es la determinación de la abundancia microbiana a través de múltiples secuencias, específicamente en el contexto de la agrupación de secuencias de genes 16S rRNA en unidades taxonómicas operacionales (OTUs), lo que permite una delimitación más precisa de grupos taxonómicos sobre la base de datos de secuencias (Preheim *et al.* , 2013).

2.8. Predicción del contenido genómico

La predicción de rasgos de organismos aun no estudiados se basa, entre otros métodos, en la aplicación de procedimientos clasificados como *ancestral state reconstruction* (ASR), para la estimación de propiedades de organismos ancestrales a partir de organismos emparentados vivos (Langille *et al.* , 2013).

Nuevos métodos predictivos filogenéticos pueden utilizar la gran cantidad de datos acumulados en diversos organismos modelo para hacer inferencias sobre las propiedades de las especies aun no estudiadas y las familias de genes poco estudiadas (Zaneveld y Thurber, 2014), haciendo posible estimar el contenido genómico en microorganismos para los que no están disponibles las secuencias de sus respectivos genomas, mediante el uso de especies emparentadas secuenciadas como referencia.

A pesar de la existencia de varias formas importantes de plasticidad del genoma microbiano (pérdida de genes, duplicación o transferencia de genes), los genes presentes en los genomas microbianos son mucho más similares entre bacterias o arqueas relacionadas que entre parientes lejanos. Por lo tanto, cuando se disponen de suficientes secuencias del genoma, es posible predecir qué familias de genes están presentes en una *Operational Taxonomic Unit* (OTU) microbiana con solo el análisis filogenético. Debido a la capacidad de los genomas microbianos para cambiar rápidamente respecto al tiempo evolutivo, siempre habrá incertidumbre en estas predicciones (Langille *et al.*, 2013).

2.8.1. Predicción de metagenomas

La predicción de metagenomas a partir de secuencias del gen 16S rRNA, implica conocer el número de copias de éste en los organismos a estudiarse, es por ello que la predicción del número de copias del gen 16S rRNA se ejecuta de dos formas: de la misma manera que otros genes y por separado. Debido a que los genes 16S rRNA pueden variar de 1 a 15 copias en bacterias, las abundancias relativas observadas en estudios de secuenciación del gen 16S rRNA pueden variar de las verdaderas abundancias en el organismo, por lo que es imprescindible aplicar un procedimiento de normalización del número de copias genómicas del gen 16S rRNA a la abundancia de organismos en la muestra (Kembel *et al.*, 2012). Luego de la normalización del número de copias del gen 16S rRNA y contando con la estimación del número de copias para cada familia de genes por organismo, se puede obtener una predicción metagenómica multiplicando el vector de recuento de genes para cada OTU por la abundancia de ese OTU en cada muestra, y sumando cada uno de los resultados de los OTUs presentes (Langille *et al.*, 2013).

Es importante contar con genes especie-específicos en los genomas de referencia a usarse para la construcción de los metagenomas. La mezcla de genomas construidos a

partir de genomas de referencia, puede considerarse como un metagenoma virtual (Okuda *et al.*, 2012).

2.8.1.1. *Hidden State Prediction*

Los algoritmos HSP son métodos filogenéticos para predecir estados de caracteres desconocidos o valores de caracteres (es decir, rasgos), basado en una colección de estados de caracteres conocidos y un árbol filogenético. Por lo que, los algoritmos HSP son similares a los algoritmos de la técnica ASR, a diferencia de que las propiedades de los organismos modernos, en lugar de ancestrales, se predicen. Estos algoritmos pueden predecir estados de caracteres para las extremidades de un árbol filogenético más que para sus nodos internos. El método HSP comienza con un conjunto de anotaciones de referencia (los números de copias de genes) y un árbol filogenético que relaciona las entidades que fueron anotadas (los organismos portadores de los genes). Estas anotaciones de referencia se asignan a los extremos correspondientes del árbol (Zaneveld y Thurber, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Determinar la biodiversidad molecular de los consorcios microbianos lixiviantes psicrotolerantes aislados de aguas ácidas provenientes de zonas mineras ubicadas en la provincia de Cerro de Pasco, capaces de oxidar sulfuros metálicos.

3.2. Objetivos específicos

1. Aislar consorcios microbianos lixiviantes a partir de muestras de aguas ácidas provenientes de zonas mineras de Pasco.
2. Evaluar la capacidad de lixiviación de sulfuros metálicos de los consorcios aislados.
3. Aislar y purificar DNA metagenómico de los consorcios microbianos lixiviantes obtenidos de las muestras de aguas ácidas.
4. Determinar la composición metagenómica de los consorcios microbianos lixiviantes más eficientes.

4. HIPÓTESIS

Las unidades de producción minera ubicadas en Pasco, se encuentran a una altitud mayor a los 4000 m.s.n.m. y a una temperatura mínima promedio de 5°C, determinando condiciones de vida extremas y resultando en una presión selectiva sobre los microorganismos que viven en las aguas ácidas de éstas. Por ello, se propone la existencia de especies de microorganismos acidófilos psicrotolerantes en muestras de aguas ácidas de las Unidades de producción de Cerro de Pasco, capaces de lixiviar sulfuros metálicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Toma de muestras y análisis fisicoquímico

Para garantizar la óptima recuperación de microorganismos, se realizó un muestreo adecuado compatible con las características del ambiente a muestrear. Para ello, se tomaron 200 mL de muestra de aguas ácidas de 0-20 cm de profundidad en distintos puntos de relaves/drenajes ácidos de mina, usando para ello frascos de vidrio estériles. Solo se tomaron muestras con un valor de pH menor a 4.0 para asegurar el aislamiento de microorganismos acidófilos quimiolitótrofos. El muestreo fue realizado hasta en dos días a partir de las 9 horas hasta las 18 horas, ya que las zonas de muestreo estuvieron distantes unas de otras y fueron de difícil acceso.

En total se colectaron once muestras de aguas ácidas procedentes de dos zonas mineras con diferente mineralogía y una laguna natural (Figura 2). Los lugares muestreados fueron georeferenciados por el sistema de posicionamiento global (GPS). Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio y guardadas a 4°C por un periodo máximo de 24h, hasta la realización de los posteriores análisis (Tan *et al.*, 2008).

El análisis de las características fisicoquímicas de las muestras se realizó *in situ*, se midieron valores de pH, conductividad, temperatura y turbidez, usando para ello un Multímetro YSI 556 (Kimura *et al.*, 2011).

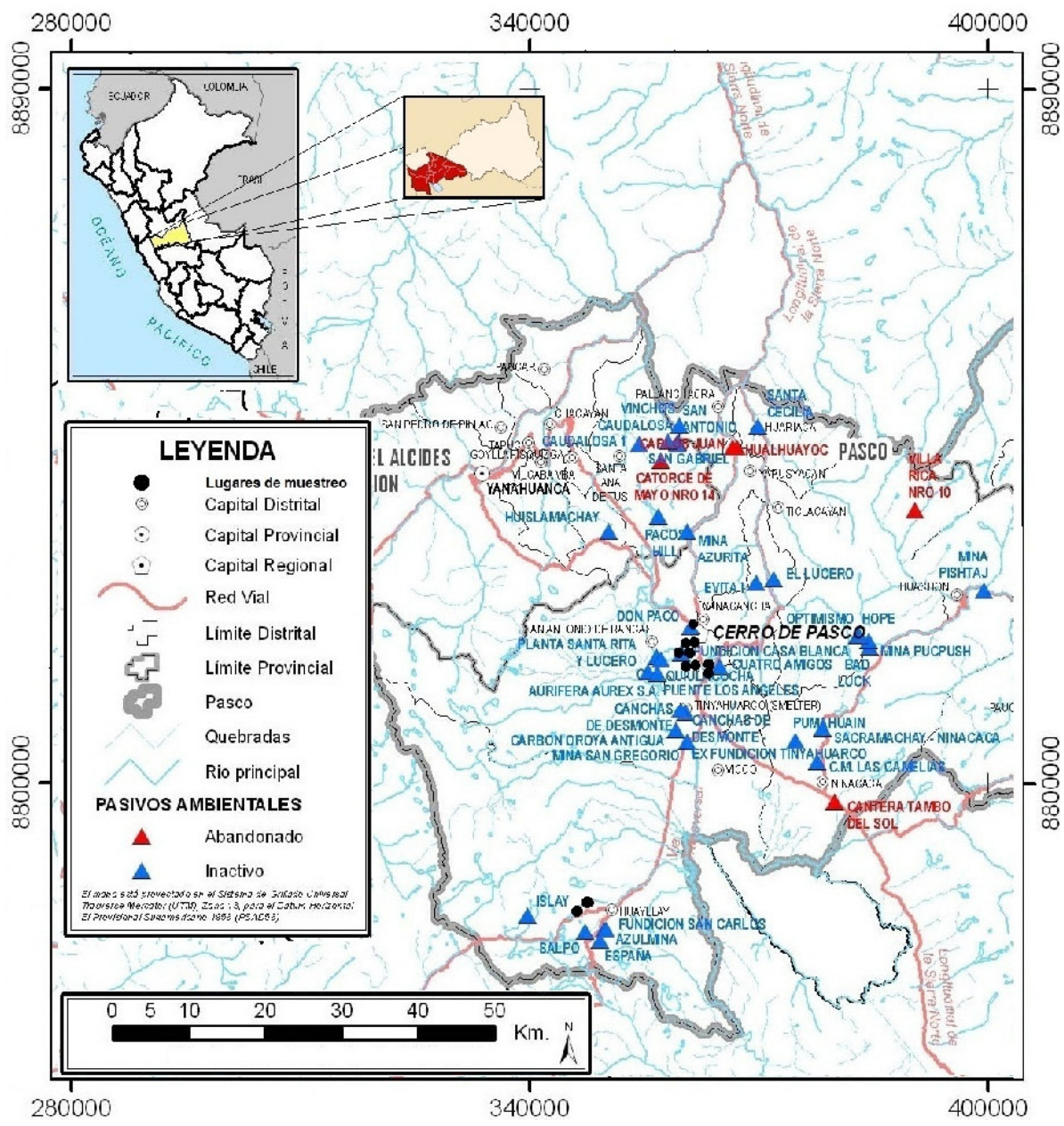


Figura 6. Mapa de pasivos ambientales en la provincia de Cerro de Pasco, indicando los once puntos muestreados. (Adaptado de Ministerio de Energía y Minas, 2006).

5.2. Obtención de consorcios microbianos acidófilos

5.2.1. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos en medio modificado 9K

Inmediatamente después de llegar a la ciudad de Lima, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.N.M.S.M.

Las muestras obtenidas fueron cultivadas en medio modificado 9K a pH 1.85 a razón de 20% v/v (Jaramillo *etal* ., 2012). Cada una de las muestras fue cultivada por duplicado a diferente temperatura, incubando una serie a temperatura ambiente (~25°C) y la otra serie en frío (15°C), para la posterior adaptación hacia temperaturas mas frías. Ambas series fueron incubadas en un agitador orbital a 180 rpm por espacio de 14 días como máximo, hasta evidenciar la oxidación de hierro ferroso.

Posteriormente, los cultivos crecidos a 15°C fueron replicados y adaptados a la temperatura de 10°C por 14 días en un agitador orbital refrigerado a 180 rpm. Una vez obtenidos los cultivos a 10°C, estos fueron replicados y adaptados a la temperatura de 7°C por 14 días bajo las anteriores condiciones. Finalmente, luego de obtener los consorcios acidófilos a 7°C, estos fueron adaptados a la temperatura de 5°C a 180 rpm por 14 días como máximo.

5.2.2. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos en medio mínimo con azufre elemental 1% (p/v)

Para el cultivo de las muestras obtenidas en medio mínimo con azufre elemental 1%, primero se prepararon perlas de azufre fundiendo el azufre elemental y solidificándolo en formas esféricas (Menadier, 2009). Para la preparación de perlas de azufre se emplearon una pistola de aire caliente Takema ZD-509 y un agitador magnético, llevando

el azufre a su punto de fusión cercano a los 115°C y solidificándolo vertiendo lentamente el azufre líquido en agua destilada en agitación media.

Para la preparación de medio mínimo suplementado con perlas de azufre 1% (p/v) solamente se seleccionaron las esferas cuyo diámetro estuvo comprendido entre 3 – 5 mm.

Una vez preparado el medio de cultivo con perlas de azufre, se inocularon las muestras por duplicado a razón de 20% (v/v) para luego incubar una serie a temperatura ambiente (~25°C) y la otra serie en frío (15°C), para la posterior adaptación hacia temperaturas mas frías. Ambas series fueron incubadas en un agitador orbital a 180 rpm por espacio de 14 días como máximo, hasta evidenciar la turbidez del medio de cultivo, indicador de crecimiento microbiano. El crecimiento microbiano también fue monitoreado por lecturas inter-diarias de células planctónicas en una cámara *Petfi -Hauser* .

Al igual que con los consorcios en medio modificado 9K, los cultivos crecidos a 15°C en medio mínimo con perlas de azufre 1%, fueron replicados y adaptados a las temperaturas de 10, 7 y 5°C sucesivamente por 14 días en un agitador orbital refrigerado a 180 rpm.

5.3. Análisis químico de las muestras

Inmediatamente luego de inocular las muestras de aguas ácidas en los medios de cultivo, estas fueron inoculadas con ácido nítrico (HNO₃) 1:1 a razón de 20 gotas/Litro para su conservación y posterior análisis. Las muestras conservadas fueron filtradas a través de unidades de filtración Millex-GV de 0.22 µm (Edwards *et al* ., 2006) en tubos centrífuga de 50 mL.

Un total de 100 mL por muestra, fueron enviados a la Unidad de Servicios de Análisis Químicos (USAQ) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para la cuantificación de cobre, plomo, zinc y níquel de seis muestras de aguas ácidas por absorción atómica. El método empleado por la USAQ fue denominado “Determinación de Metales por Absorción Atómica Metales FAAS USAQ-ME-04”.

5.4. Cultivo de consorcios microbianos lixiviantes

5.4.1. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos en medio mínimo suplementado con sulfuro de cobre

Se evaluó el crecimiento microbiano de los consorcios en medio mínimo suplementado con 0,5% (p/v) de sulfuro de cobre (CuS). Los inóculos fueron obtenidos a partir de los consorcios en Fase Log en medio 9K modificado crecidos a 5°C y un consorcio crecido en medio mínimo suplementado con perlas de azufre crecido a 5°C, siguiendo para ello el protocolo de centrifugación de 100 mL de cultivo a 6 500 rpm en una centrífuga refrigerada, un posterior lavado en agua ácida y una suspensión en agua ácida para obtener el inóculo final.

Posteriormente, los cultivos en CuS 0,5% fueron incubados en un agitador orbital refrigerado a 15°C por 14 - 30 días a 180 rpm, para luego adaptarlos al frío haciendo repiques a 10, 7 y 5°C finalmente.

El crecimiento microbiano fue monitoreado por la aparición de sulfato de cobre (coloración azul del sobrenadante) y el conteo inter-diario de células planctónicas en una cámara *Peñ-Hasser*.

5.4.2. Cultivo de consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes en medio mínimo suplementado con sulfuro de zinc

Los consorcios microbianos lixiviantes que presentaron mejores patrones de crecimiento y lixiviación de sulfuro de cobre, fueron inoculados en medio mínimo con sulfuro de zinc al 0.5% (p/v), para evaluar el crecimiento microbiano en este sustrato y la eficiencia en la lixiviación de zinc.

Previa a la inoculación, 100 mL de los consorcios en Fase Log en medio mínimo con CuS 0.5% crecidos a 5°C, fueron lavados siguiendo para ello el protocolo de centrifugación del cultivo a 6 500 rpm en una centrífuga refrigerada, tres lavados en agua ácida pH 2.5 y una suspensión en agua ácida pH 2.5 para obtener el inóculo final.

Al igual que los cultivos anteriores, el crecimiento microbiano fue monitoreado por el conteo inter-diario de células planctónicas en una cámara *Peff* -*Hauser* .

5.4.3. Cultivo de un consorcio microbiano lixiviente psicotolerante en medio mínimo con un mineral azufrado

El CMLP (Consortio Microbiano Lixivante Psicotolerante) que presento mejor patrón de lixiviación de CuS, fue seleccionado para ser cultivado y adaptado en medio mínimo suplementado con un mineral azufrado (Calcopirita) proporcionado por el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, a continuación, en la tabla 2, se detalla la mineralogía del concentrado azufrado empleado en esta parte del experimento.

Tabla 2. Análisis mineralógico correspondiente al concentrado azufrado empleado

MINERALES	VOLUMEN PORCENTUAL (%)
Calcopirita	33.66
Pirrotita	31
Esfalerita	4.43
Arsenopirita	0.65
Goetita	1.21
Pirita	1.28
Covelita	0.12
Galena	0.36
Gangas	27.29
Total %	100

5.5. Cinética de crecimiento

5.5.1. Cinética de crecimiento de consorcios oxidadores de ión ferroso

Se realizaron cinéticas de crecimiento paralelas de los once consorcios oxidadores de hierro ferroso a 5°C, para lo cual se usaron inóculos en Fase Log. Las cinéticas se iniciaron con una concentración celular aproximada de 5×10^6 células mL⁻¹, los cultivos fueron incubados a 5°C en un agitador orbital refrigerado a 180 rpm por dos semanas y las lecturas fueron realizadas por triplicado en una cámara *Peff -Haesser* en un microscopio Leica DM 750 con contraste de fases.

5.5.2. Cinética de crecimiento de consorcios oxidadores de azufre

Se evaluó el crecimiento microbiano de los consorcios oxidadores de azufre elemental realizando cinéticas de crecimiento paralelas de once consorcios crecidos a 5°C, para lo cual se usaron inóculos en Fase Log. Las cinéticas se iniciaron con una concentración celular aproximada de 5×10^5 células mL⁻¹, los cultivos fueron incubados a 5°C en un agitador orbital refrigerado a 180 rpm por siete días, se realizó el conteo de

células planctónicas por triplicado en una cámara *Peñ-Hauser* en un microscopio Leica DM 750 con contraste de fases.

5.6. Caracterización de los consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes.

5.6.1. Cinéticas de crecimiento de los CMLP en medio mínimo con CuS

Fueron seleccionados 6 consorcios microbianos acidófilos (5 consorcios oxidadores de hierro ferroso y 1 consorcio oxidador de azufre), a los cuales se les evaluó su cinética de crecimiento en sulfuro de cobre a bajas temperaturas, para lo cual se usaron cultivos en Fase Log. Las cinéticas fueron iniciadas con una concentración aproximada a 3×10^5 células mL⁻¹ en medio mínimo suplementado con CuS 0.5% (p/v) a 5°C en un agitador orbital refrigerado a 180 rpm por 14 días, se realizó el recuento de células planctónicas por triplicado en una cámara *Peñ-Hauser* en un microscopio Leica DM 750 con contraste de fases.

5.6.2. Cinéticas de crecimiento de los CMLP en medio mínimo con ZnS

Una vez adaptados al frío, se evaluó el crecimiento de los consorcios lixiviantes de ZnS en medio mínimo suplementado con ZnS 0.5% (p/v), para lo cual fue empleado el mismo método usado para las cinéticas de crecimiento en CuS 0.5%.

5.6.3. Cinética de liberación de Cobre (II) de CuS

Una vez obtenidas las cinéticas de crecimiento, se seleccionó al mejor consorcio lixiviante de CuS para la realización de su cinética de liberación de cobre (II) por triplicado. Se tomaron muestras del sobrenadante de cada cinética a los 0, 5, 15, 22 y 30 días; filtrándolas oportunamente cada una a través de unidades de filtración Millex-GV de 0.22 µm en tubos centrífuga de 50 mL. Luego de cada filtración, las muestras fueron enviadas

a la USAQ para la cuantificación de cobre (II) por Absorción Atómica. El análisis de los datos obtenidos y la construcción de la gráfica fue llevada a cabo con el software estadístico SPSS v 20.0.

5.6.4. Cinética de liberación de cobre (II) del mineral azufrado

Se realizó la cinética de liberación de cobre por triplicado al mismo CMLP evaluado anteriormente con CuS, usando un inóculo en Fase logarítmica. Se tomaron muestras del sobrenadante de cada matraz a los 0, 7, 14, 21 y 35 días, las cuales fueron filtradas siguiendo el mismo procedimiento usado en el apartado 5.6.3.

5.7. Extracción de DNA metagenómico (Abanto *et al.* , 2013)

La fase de extracción del DNA metagenómico de los mejores consorcios lixiviantes, se realizó en dos pasos:

Primero se lavaron los *pellets* celulares provenientes de 200 mL de cada uno de los matraces con cultivo en medio mínimo suplementado con CuS o medio modificado 9K, en tubos de 50 mL, siguiendo el presente protocolo: centrifugación de los cultivos a 7 000 rpm por 10 minutos a 5°C, recuperación del *pellet* celular, lavados sucesivos en agua ácida pH 2.5 vortexeando a la máxima velocidad y finalmente lavados y resuspensión con una solución de citrato de sodio 10 mM pH 7.0 para estabilizar el pH.

Posteriormente se realizó la extracción de DNA propiamente dicho, siguiendo las instrucciones del fabricante del *Kit* empleado (*Wizard Genomic DNA Purification Kit* Promega) para la purificación de DNA a partir de Bacterias Gram Positivas.

El protocolo usado fue el siguiente:

1. Centrifugar la solución bacteriana en citrato de sodio en un tubo de 1.5 mL a 13 000 – 14 000 x g por dos minutos para obtener el *pellet* celular.
2. Resuspender las células en 480 µL de EDTA 50 mM.
3. Adicionar 120 µL de lisozima 10 mg/mL.
4. Incubar la muestra a 37°C durante 30 - 60 minutos. Centrifugar durante dos minutos a 13 000-16 000 × g y descartar el sobrenadante.
5. Añadir 600 µL de *Nalei Lysis Sto*. Pipetear suavemente hasta que se vuelvan a suspender las células.
6. Incubar a 80°C durante cinco minutos para lisar las células; a continuación, enfriar a temperatura ambiente.
7. Adicionar 3 µL de la solución de RNasa al lisado celular. Invertir el tubo 2 - 5 veces para mezclar.
8. Incubar a 37°C durante 15 - 60 minutos. Enfriar la muestra a temperatura ambiente.
9. Añadir 200 µL de *Poin Precipito Sto* al lisado celular tratado con RNasa. Vortexear vigorosamente a alta velocidad durante 20 segundos para mezclar la solución de precipitación de proteína con el lisado celular.
10. Incubar la muestra en hielo durante cinco minutos.
11. Centrifugar a 13 000-16 000 × g durante tres minutos.
12. Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio que contenga 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente.

13. Mezclar suavemente por inversión hasta la formación de una masa visible con parecido a las hebras de DNA.
14. Centrifugar a 13 000-16 000 × g durante dos minutos.
15. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y añadir 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente y suavemente invertir el tubo varias veces para lavar el *pellet* de DNA.
16. Centrifugar a 13 000-16 000 × g durante dos minutos. Aspirar con cuidado el etanol.
17. Vaciar el tubo sobre papel absorbente limpio y dejar que el *pellet* se seque al aire durante 10 - 15 minutos.
18. Añadir 100 µL de *DNA Rehydrate Solution* al tubo y rehidratar el DNA mediante incubación a 65°C durante una hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo.
19. Almacenar el DNA a -20°C.

Finalmente, para confirmar la obtención de DNA al final de la extracción, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8%.

5.7.1. Cuantificación del DNA

El DNA total extraído de los consorcios microbianos lixiviantes fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop Lite para cumplir con las especificaciones técnicas requeridas por MACROGEN para el pirosecuenciamiento del metagenoma de los consorcios lixiviantes. Se usaron en total 6 µL de DNA de cada consorcio, para tres lecturas de 2 µL cada una, obteniéndose medidas de concentración (ng/µL) y absorbancia a 260 y 280 nm.

5.7.2. Validación del DNA extraído mediante amplificación por PCR (Marshall *et al.*, 2008)

El DNA extraído fue enviado a la empresa encargada del secuenciamiento para la preparación de librerías de amplicones para su posterior secuenciamiento en masa; este proceso de creación de librerías de amplicones es llevado a cabo mediante reacciones de PCR, el cual puede ser afectado por la presencia de trazas de metales como el cobre.

Una forma directa de validar el DNA extraído es precisamente realizar reacciones de PCR y amplificar una gran porción del gen 16S rRNA, por ello se amplificó la región hipervariable V4. Se llevaron a cabo reacciones de 20 μ L siguiendo las especificaciones del fabricante del *kit* usado (Platinum PCR Supermix Invitrogen). Se usaron *primers* universales 27F y 907R para bacterias (Lane, 1991) y *primers* Arch 21F y Arch 958F para arqueas (DeLong, 1992). Cada reacción incluyó los siguiente reactivos: 18 μ L de Supermix, 0.7 μ L de agua para PCR, 0.4 μ L de cada uno de los *primers* 10 mM y 0.5 μ L de DNA.

Se usó un termociclador *Mastercycler ep* (Eppendorf) programable para ejecutar las siguientes condiciones para la amplificación de DNA bacteriano: Desnaturalización inicial por 2 minutos a 94°C, 35 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 94°C, 1 minuto de hibridación a 53°C, y 2 minutos de extensión a 72°C; finalmente una extensión de 8 minutos a 72°C. Para la amplificación de DNA de arqueas las condiciones fueron: Desnaturalización inicial por 2 minutos a 94°C; 35 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 94°C, 1 minuto de hibridación a 55°C, y 2 minutos de extensión a 72°C; finalmente una extensión de 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.8. Pirosecuenciamiento (Kuang *et al.*, 2013)

Más de 0.2 µg de DNA por cada consorcio fueron enviados a la empresa MACROGEN (Seoul, Corea) para la construcción de las librerías de amplicones y el posterior pirosecuenciamiento de las regiones hipervariables V1, V2 y V3 del gen de 16S rRNA. El pirosecuenciamiento del metagenoma de los consorcios lixiviantes fue realizado en el sistema GS FLX Plus 454 Pyrosequencing (Roche 454 Life Sciences).

5.8.1. Construcción de Librerías de Amplicones.

La librería de amplicones fue construida por MAGROGEN usando los *primers* bacterianos 27F 'GAGTTTGATCMTGGCTCAG' y 518R 'WTTACCGCGGCTGCTGG' para el gen 16S rRNA.

5.9. Análisis metagenómico de los consorcios microbianos lixiviantes

El análisis bioinformático fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología usando una computadora dotada con el sistema operativo Ubuntu 14.04 LTS, 8 GB de memoria RAM y 1 TB de memoria interna.

Los *reads* obtenidos en el pirosecuenciamiento fueron usados para determinar la abundancia y composición de los consorcios analizados (Mande *et al.*, 2012), en ese sentido, se analizó la calidad de los *reads* obtenidos previo a los análisis de asignación taxonómica y agrupamiento en OTUs, diversidad alfa y demás estimaciones propias de metagenomas detallados en los programas y algoritmos usados que se ven a continuación:

5.9.1. Análisis de diversidad usando el *Ribosomal Data Project* (RDP) *Pipeline*

Las secuencias en crudo (archivo .sff), los *barcodes*, y las secuencias de los *genes* fueron subidas a la plataforma en línea del *RDP (Ribosomal Data Project) Pipeline*, usando el “*16S Stripped Workflow*” según las especificaciones que se indican en la tabla 3.

Tabla 3. Especificaciones para la filtración de secuencias crudas usando el *RDP Pipeline*

<i>Forward maximum distance</i>	1
<i>Reverse primer maximum distance</i>	1
<i>Maximum N's</i>	0
<i>Minimum Read Q Score</i>	20
<i>Min sequence length</i>	300
<i>Max sequence length</i>	600

Después de obtener secuencias separadas por consorcio y eliminados los *reads* no concordantes con las especificaciones, se procedió a la detección de quimeras usando el *software* UCHIME v.4.2. (Edgar *et al.*, 2011) bajo la modalidad de comparación con una base de datos, que en este caso fue *RDP Global* disponible en la interfaz de UCHIME (<http://drive5.com/uchime>). Una vez halladas las secuencias quimeras, estas fueron filtradas de las demás secuencias utilizando la herramienta *Sequence Selector* del *RDP Pipeline*, luego, las secuencias filtradas fueron clasificadas usando la herramienta *RDP Pipeline Classifier* con un *cut off* de 97%.

Los análisis finales fueron realizados utilizando los paquetes *RDP Tools* (Cole *et al.*, 2013) y *Phyloseq* (McMurdie, P. J., y S. Holmes, 2012) dentro del *software* R v.3.2.2.

5.9.2. Análisis de la distribución de *eads* usando MEGAN

Los *eads* libres de quimeras del gen 16S rRNA fueron comparados localmente a la base de datos “*Microbial 16S*” del Genbank usando la herramienta BLASTN. Posteriormente se usó el ~~file~~ MEGAN v 5.10.3. para procesar los resultados de las comparaciones y coleccionar todos los *hits* de los *eads* analizados frente a secuencias conocidas y finalmente asignar un ~~tax~~ ID a cada secuencia basándonos en el NCBI ~~taxon~~ contenido en el mismo ~~file~~ (Huson *et al.* , 2007).

Una vez que todos los *eads* fueron asignados a distintos taxones, se procedió a ejecutar el algoritmo ~~Los~~ *Contra Ancestro* (LCA) para analizar cada consorcio y examinar la asignación taxonómica de los *eads* basados en sus *hits* , trabajando con valores fijos del algoritmo especificados en la tabla 4 para el análisis de los seis consorcios estudiados.

Tabla 4. Especificaciones para el algoritmo LCA usados para el análisis de los seis consorcios

<i>Min Score</i>	50.0
<i>MaxExpected</i>	0.001
<i>Topcent</i>	5.0
<i>Min Spcent</i>	0.0 (5)
<i>Min Sp</i>	1
<i>Min Cont</i>	0.0
<i>LCA percent</i>	100

Efectuados los análisis para cada consorcio, se procedió a realizar comparaciones entre éstos, construyendo un gráfico de barras que detalla la cantidad de *eads* asignados por especie, un árbol general agrupando los consorcios de acuerdo a la composición microbiana y un árbol mas detallado comparando todas las especies halladas en los consorcios y su respectiva abundancia en cada uno de éstos (Huson *et al.* , 2011).

5.9.3. Análisis de diversidad usando la plataforma en línea MG-RAST

Los servidores en línea para análisis metagenómico facilitan el análisis de muestras ambientales complejas cuando no se cuenta con suficientes recursos informáticos (Rosen *et al.* , 2011). Una de las plataformas mas conocidas es MG-RAST y para el análisis en ésta, se usaron las secuencias libres de quimeras como en los casos anteriores, ingresando a la dirección web: <http://metagenomics.anl.gov/> donde durante el proceso de presentación de las secuencias, se consideraron los parámetros predeterminados como el *base quality score* (15) que indica la calidad de cada base nucleotídica y por otro lado, el número máximo de bases con la calidad por debajo de lo especificado para que una secuencia no sea eliminada (5).

Luego, los procedimientos subsiguientes fueron llevados a cabo por MG-RAST de forma automática, para lo cual este siguió el flujograma que se detalla en la figura 7.

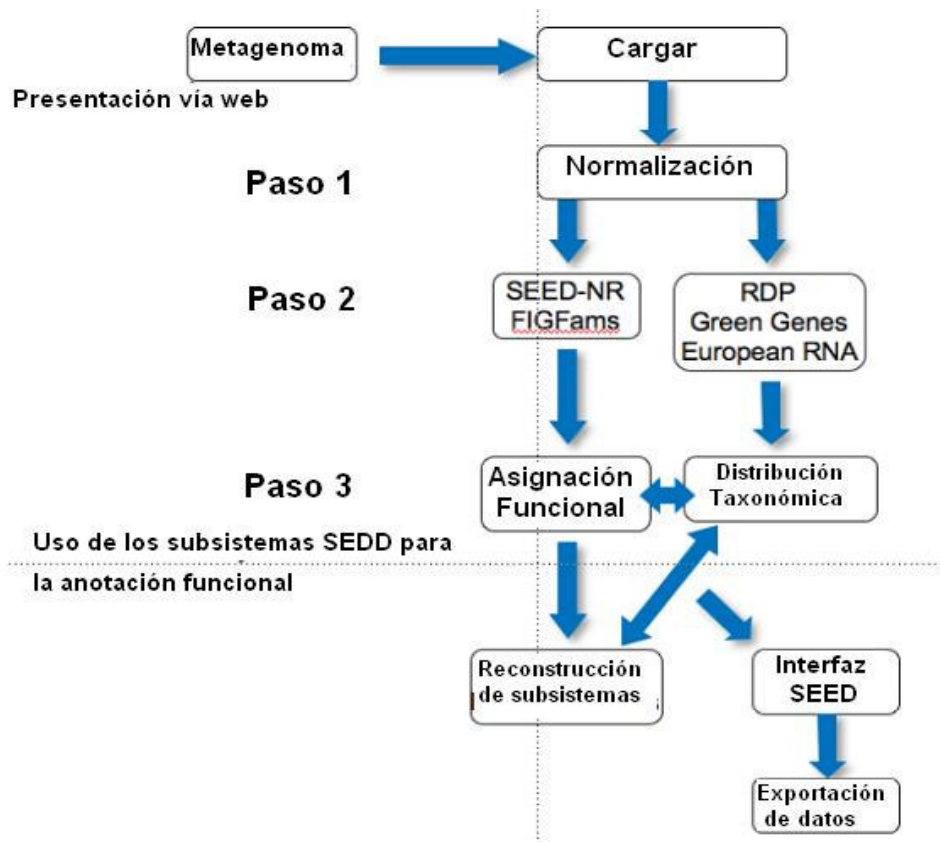


Figura 7. Flujograma desarrollado por la plataforma en línea MG-RAST (Meyer *et al.* , 2008).

Posterior a los análisis *o line* efectuados por MG-RAST, se llevaron a cabo análisis bajo la opción “*BetHitClasificato*” y los parámetros que se tuvieron en cuenta fueron los detallados en la tabla 5.

Tabla 5. Especificaciones usadas en el análisis de la opción *BetHitClasificato* en la plataforma en línea MG-RAST

Annotation sources	RDP, SSU, Greengenes
Max. e-Value Cutoff	1e-5
Min. % Identity Cutoff	97 %
Min. Alignment Length Cutoff	100

Se realizó el análisis de la distribución de las secuencias de los consorcios, mostrado en una tabla detallada, además se obtuvieron las curvas de rarefacción para las secuencias de cada consorcio y se calcularon los índices de diversidad alfa de cada uno de ellos.

5.9.4. Análisis de diversidad por OTUs usando Mothur

El análisis de los datos de pirosecuenciamiento se realizó con la versión 1.35 del paquete de *bioinformatics* Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta la sobrestimación de la biodiversidad de las secuencias procedentes de *454 sequencing* (Kunin *et al.*, 2010), las secuencias fueron “limpiadas de ruido” (*denoised*) utilizando los comandos “*shhh.flor*” (traducción del algoritmo *PNase*; Quince *et al.*, 2009) y “*p.clbr*” (Huse *et al.*, 2010). Además, se identificaron las secuencias quiméricas que fueron eliminadas mediante *Chimeric Uchime* (Edgar *et al.*, 2011). Posteriormente, se filtraron las secuencias con una longitud <200 pb y aquellas que tuvieron mas de diez homopolímeros.

Se determinó la composición de OTUs (Unidad taxonómica operacional) por cada consorcio lixivante mediante un mapa de calor y se determinó la relación existente entre los 4 consorcios mas diversos mediante un diagrama de Venn.

Los OTUs fueron identificados usando el comando “cluster” con un nivel de 97% de identidad de secuencia (Huse *et al.*, 2010). Posteriormente, fue seleccionada una secuencia representativa de cada OTU y se logró la asignación taxonómica utilizando el *Ribosomal Database Project* (RDP) (Wang *et al.*, 2007) con un mínimo de confianza de 97%.

Se estimó la diversidad alfa de los consorcios lixivantes mediante los índices basados en abundancia de Chao1 y la inversa de Simpson.

5.9.5. Predicción y análisis del contenido metagenómico

Para efectuar la predicción metagenómica de los consorcios estudiados, se utilizó el ~~bio~~ picrust v.1.0.0, que necesita como archivo de entrada una tabla con los OTUs y sus abundancias en formato *.biom (McDonald *et al.* , 2012). Los OTUs fueron obtenidos a partir de la referencia taxonómica versión 13_8 de la base de datos Green Genes, utilizando el comando *make_biom* del ~~bio~~ mothur versión 1.35, y un *cutoff* del 97 %.

El contenido genómico de los OTUs fue predicho automáticamente por el ~~bio~~ a partir de archivos pre-calculados, gracias a que se contaba con la cantidad suficiente de genomas secuenciados relacionados a los OTUs. La suficiencia de la cantidad de genomas de referencia disponibles fue estimada calculando el ~~Nearest~~ *Nearest Sequenced Taxonomic Index* (NSTI) que resume el grado en que los microorganismos presentes en una muestra dada se relacionan con genomas secuenciados (Langille *et al.* , 2013).

5.9.5.1. Predicción de metagenomas de los CMLP

Como primer paso, antes de la predicción de metagenomas, se procedió a normalizar el número de copias del gen 16S rRNA usando el comando *normalize_by_copy_number* que divide cada OTU por la abundancia del número de copias conocido/predecido del gen 16S rRNA.

Después de la normalización, es posible hacer las predicciones funcionales del metagenoma final, multiplicando las abundancias normalizadas de cada OTU por las abundancias de los rasgos funcionales calculados, usando el comando *predict_metagenomes* del ~~bio~~ .

5.9.5.2. Análisis del contenido genómico en cada CLMP

Se agruparon los genes predichos en categorías funcionales del KEGG (*KEGG Encyclopedia of genes and genomes*) <http://www.genome.jp/kegg/> para facilitar los análisis de ausencia/presencia de genes específicos, usando para ello el comando `catg@_by_functio.p` del `bio`.

Después del agrupamiento anterior, se evaluó la presencia de genes relacionados a la psicrotolerancia, oxidación de sustratos, obtención de energía, formación de biofilm y resistencia a metales pesados, los cuales fueron contrastados con la presencia de genes relacionados a la replicación de DNA (control positivo) y con genes relacionados a la fotosíntesis (control negativo). Se utilizó el comando `metgenome_cont@.p` del `bio`.

6. RESULTADOS

6.1. Muestreo y análisis de aguas ácidas de mina

6.1.1. Obtención de las muestras y análisis fisicoquímicos

Las primeras cinco muestras fueron tomadas de la localidad de Quiulacocho, de las cuales la 1, 2 y 3 fueron parte de un cuerpo de agua similar a una laguna (Figura 8A) y las muestras 4 y 5 fueron tomadas de pequeños cuerpos de agua cercanos; de estas cinco muestras la muestra 5 tenía una coloración amarillenta y las otras cuatro fueron de color rojizo. A continuación, se tomaron las muestras 6 y 7 en el distrito de Simón Bolívar, las cuales tuvieron coloración rojiza.

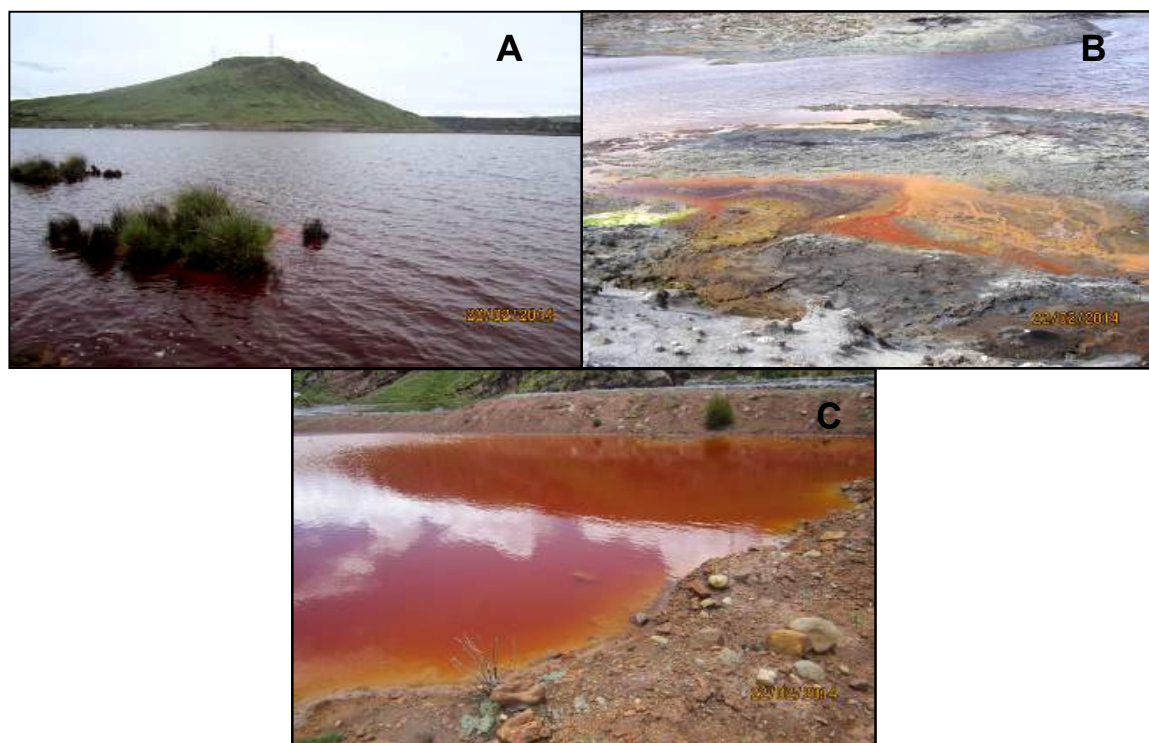


Figura 8. A: Aguas ácidas en la localidad de Quiulacocho; B: Laguna Yanamate, aguas ácidas producto de la actividad minera en los alrededores; C: Aguas ácidas en la Unidad de Producción Minera Huarón.

Al siguiente día, se tomaron las muestras 8 y 9 de la Laguna Yanamate, escogida por su bajo pH y coloración rojiza tal como se aprecia en la figura 8B. Finalmente, en la Unidad de Producción Minera de Huarón se tomaron las muestras 10 y 11, de las cuales la 10 presentó una coloración amarillenta y plomiza, mientras que la 11 fue rojiza (Figura 8C). A continuación se muestra en la tabla 6 el consolidado de los datos fisicoquímicos y de georeferenciamiento tomados en el muestreo:

Tabla 6. Coordenadas geográficas y parámetros fisicoquímicos de las muestras de aguas ácidas obtenidas en la provincia de Cerro de Pasco

Localidad	Muestra	Coordenadas (Decimales)	Altitud (m.s.n.m.)	Temperatura (°C)	Turbidez (ppm)	Conductividad	pH
QUIULACOCHA	1	18L 0359205 UTM 8816929	4261	16	2000	3999	2.4
	2	18L 0359815 UTM 8816527	4261	15	2000	3999	2.54
	3	18L 0359944 UTM 8816571	4261	18	2000	3999	2.65
	4	18L 0361015 UTM 8817512	4261	22	1924	3999	2.41
	5	18L 0360819 UTM 8817645	4261	20	2000	3999	2.08
SIMON BOLIVAR	6	18L 0361504 UTM 8819121	4300	-	-	1960	2.64
	7	18L 0361544 UTM 8819181	4300	-	-	3999	1.89
LAGUNA YANAMATE	8	18L 0363532 UTM 8814944	4345	-	-	1870	2.54
	9	18L 0363259 UTM 8814693	4345	-	-	-	2.92
HUARÓN	10	18L 0346556 UTM 8782858	4465	15	1200	2380	3.65
	11	18L 0347474 UTM 8783164	4420	18	-	-	2.82

6.1.2. Análisis químico de las muestras de agua ácida

Se analizaron 6 muestras representativas de cada cuerpo de agua muestreado, obteniéndose concentraciones altas de algunos metales, mientras que otros no fueron detectados por su baja concentración. Se analizó la presencia de cobre, plomo, zinc y níquel teniendo como límites de detección para plomo y níquel, 0.5 ppm y 1 ppm, respectivamente. Los resultados del análisis químico de metales de las muestras de agua ácida se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones de metales pesados en seis muestras de aguas ácidas provenientes de la provincia de Cerro de Pasco

Muestra	Cobre	Plomo*	Zinc	Níquel*
3	37.24 ppm	ND	801.25 ppm	ND
4	20.03 ppm	ND	817 ppm	ND
5	78.50 ppm	ND	4580.25 ppm	ND
7	77.38 ppm	ND	417.58 ppm	ND
9	11.20 ppm	ND	166.20 ppm	ND
10	9.15 ppm	ND	60.88 ppm	ND

*ND: No Determinado

6.2. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos

6.2.1. Selección de consorcios ferro-oxidantes y tio-oxidantes

Se obtuvieron 11 consorcios microbianos ferro-oxidantes y 11 consorcios microbianos tio-oxidantes, los cuales fueron adaptados al crecimiento a bajas temperaturas.

En la tabla 8 se muestran la cantidad de días empleados para la adaptación del crecimiento de los consorcios a distintas temperaturas en medio modificado 9K, pH 1.85 y en medio mínimo suplementado con perlas de azufre 1% (p/v), respectivamente.

Tabla 8. Crecimiento de los consorcios microbianos ferro-oxidantes y tio-oxidantes en medio modificado 9K y medio mínimo con perlas de azufre respectivamente

Conorcios*	T° Ambiente (~ 25°C)		T° 15 °C		T° 10 °C		T° 7 °C		T° 5 °C		
	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	
FERRO-OXIDANTES	QuF1	+	7	+	7	+	8	+	8	+	8
	QuF2	+	7	+	7	+	8	+	8	+	10
	QuF3	+	7	+	7	+	8	+	9	+	8
	QuF4	+	6	+	7	+	8	+	9	+	8
	QuF5	+	6	+	6	+	8	+	8	+	8
	SBF1	+	7	+	7	+	8	+	9	+	9
	SBF2	+	6	+	6	+	8	+	8	+	9
	HuF1	+	7	+	6	+	8	+	8	+	9
	HuF2	+	7	+	7	+	8	+	8	+	8
	YanF1	+	7	+	7	+	8	+	9	+	9
	YanF2	+	7	+	12	+	>12	+	>12	+	>12
TIO-OXIDANTES	QuS1	+	11	+	10	+	9	+	10	+	11
	QuS2	+	9	+	8	+	8	+	9	+	10
	QuS3	+	8	+	7	+	8	+	9	+	10
	QuS4	+	8	+	7	+	8	+	9	+	10
	QuS5	+	8	+	7	+	8	+	9	+	10
	SBS1	+	8	+	7	+	8	+	9	+	10
	SBS2	+	8	+	7	+	8	+	9	+	10
	HuS1	+	8	+	7	+	8	+	9	+	10
	HuS2	+	8	+	9	+	11	+	12	+	14
	YanS1	+	8	+	7	+	11	+	12	+	12
	YanS2	+	7	+	6	+	7	+	9	+	13
CONTROL NEGATIVO	-	14	-	14	-	14	-	14	-	14	

*Qu: Consorcios aislados de la localidad de Quiulacocha, SB: Consorcios aislados del distrito de Simon Bolívar, Hu: Consorcios aislados de la Unidad de Producción Minera de Huarón, Yan: Consorcios aislados de la laguna Yanamate, F: Capacidad ferro-oxidante y S: Capacidad Tio-oxidante.

Los cultivos en medio modificado 9K fueron monitoreados cualitativamente por el cambio de color de transparente a rojizo como evidencia de la oxidación de sulfato ferroso presente como uno de los componentes del medio de cultivo; y en los cultivos en medio mínimo suplementado con azufre elemental, se evaluó la turbidez del medio como evidencia de crecimiento microbiano.

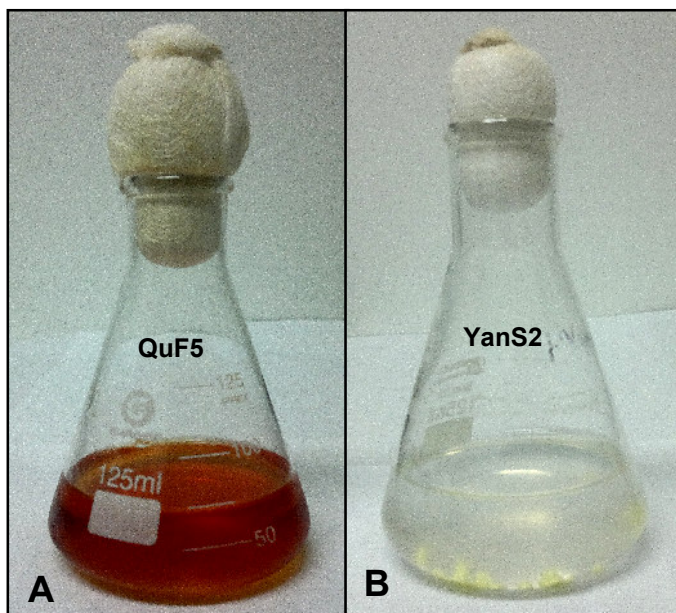


Figura 9. A: Consorcio ferro-oxidante QuF5 crecido a 5°C. B: Consorcio tio-oxidante YanS2 crecido a 10°C, nótese la turbidez.

6.3. Obtención de consorcios microbianos lixiviantes

6.3.1. Obtención de consorcios lixiviantes de CuS y adaptación al frío

Luego de obtener los consorcios ferro-oxidantes y tio-oxidantes, estos fueron cultivados en medio mínimo con sulfuro de cobre 0.5% (p/v), posteriormente fueron adaptados a bajas temperaturas, de donde finalmente se recuperaron 6 consorcios lixiviantes con los mejores patrones de crecimiento: QuF1, QuF3, QuS3, QuF4, QuF5 y SBF1.

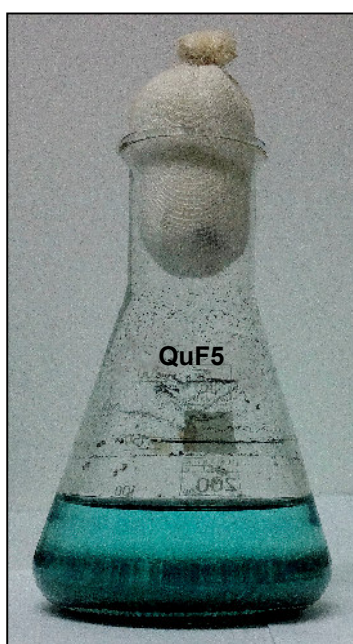


Figura 10. Consorcio microbiano lixiviante QuF5 en medio mínimo con sulfuro de cobre, nótese el color azul del sobrenadante.

A continuación se muestra la tabla 9 donde se detallan los días necesarios para la adaptación de los consorcios a las distintas temperaturas en medio suplementado con CuS 0.5% (p/v), como única fuente de energía; se muestra también que los consorcios QuF1, QuF3, QuF4, QuF5 y SBF1 se adaptaron en el menor tiempo (18 días).

Tabla 9. Tiempo de adaptación para el crecimiento de los consorcios microbianos lixiviantes en medio mínimo con sulfuro de cobre 0.5% (p/v)

Consortios	T° Ambiente		T° 15 °C		T° 10 °C		T° 7 °C		T° 5 °C	
	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)
QuF1	+	20	+	21	+	18	+	18	+	18
QuF2	+	28	+	28	+	28	-	>30	-	>30
QuF3	+	20	+	21	+	18	+	18	+	18
QuF4	+	20	+	21	+	18	+	18	+	18
QuF5	+	20	+	21	+	18	+	18	+	18
SBF1	+	20	+	21	+	18	+	18	+	18
SBF2	+	28	+	28	-	30	-	30	-	30
HuF1	+	28	+	28	+	28	-	>30	-	>30
HuF2	+	28	+	28	-	30	-	30	-	30
YanF1	+	28	+	28	-	30	-	30	-	30
YanF2	+	28	+	28	-	30	-	30	-	30
QuS1	+	28	+	28	-	30	-	30	-	30
QuS2	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
QuS3	+	28	+	28	+	25	+	25	+	25
QuS4	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
QuS5	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
SBS1	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
SBS2	+	28	+	28	-	30	-	30	-	30
HuS1	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
HuS2	+	28	+	28	-	30	-	30	-	30
YanS1	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
YanS2	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30
CONTROL NEGATIVO	-	30	-	30	-	30	-	30	-	30

6.3.2. Obtención de consorcios lixiviantes de ZnS y adaptación al frío

Luego de que los CMLP en medio mínimo suplementado con sulfuro de cobre fueron obtenidos, estos fueron cultivados en medio mínimo con sulfuro de zinc 0.5% (p/v) donde también fueron adaptados a bajas temperaturas como se muestra en la tabla 10, donde el consorcio QuF5 se adaptó en el menor tiempo (13 días) a 5°C.

Tabla 10. Crecimiento de los consorcios microbianos lixiviantes en medio mínimo con sulfuro de zinc 0.5% (p/v)

Consortios	T° 15 °C		T° 10 °C		T° 7 °C		T° 5 °C	
	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)	Crecimiento	Tiempo (Días)
QuF1	+	21	+	15	+	15	+	15
QuF3	+	21	+	18	+	15	+	15
QuF4	+	21	+	18	+	18	+	18
QuF5	+	21	+	15	+	13	+	13
SBF1	+	21	+	15	+	15	+	15
QuS3	+	28	+	15	+	15	+	15
CONTROL NEGATIVO	-	30	-	30	-	30	-	30

6.4. Cinéticas de crecimiento para la selección del mejor CMLP

6.4.1. Cinéticas de crecimiento de consorcios ferro-oxidantes a 5°C

Se evaluó el crecimiento microbiano de los 11 consorcios ferro-oxidantes, lográndose determinar las cinéticas de crecimiento (Figura 11) de todos ellos, de los cuales destacaron los consorcios QuF5, QuF3, QuF1, SBF1 y QuF4 para los posteriores estudios en sulfuros metálicos.

Además, se construyeron curvas logarítmicas (datos no mostrados) para determinar las velocidades de crecimiento y los tiempos generacionales promedios de cada uno de los consorcios (Tabla 11).

Tabla 11. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales de los consorcios cultivados en medio modificado 9K

Consortio	Medio 9K modificado	
	Velocidad de Crecimiento $\mu \times 10^{-3} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Tiempo Generacional (horas)
QuF1	9.4	73.7
QuF2	5.6	123.7
QuF3	15	46.2
QuF4	8.2	84.5
QuF5	20	34.7
SBF1	8.6	80.6
SBF2	7.3	93.5
HuF1	7.2	96.3
HuF2	6.8	101.9
YanF1	7.8	88.9
YanF2	6.1	113.6

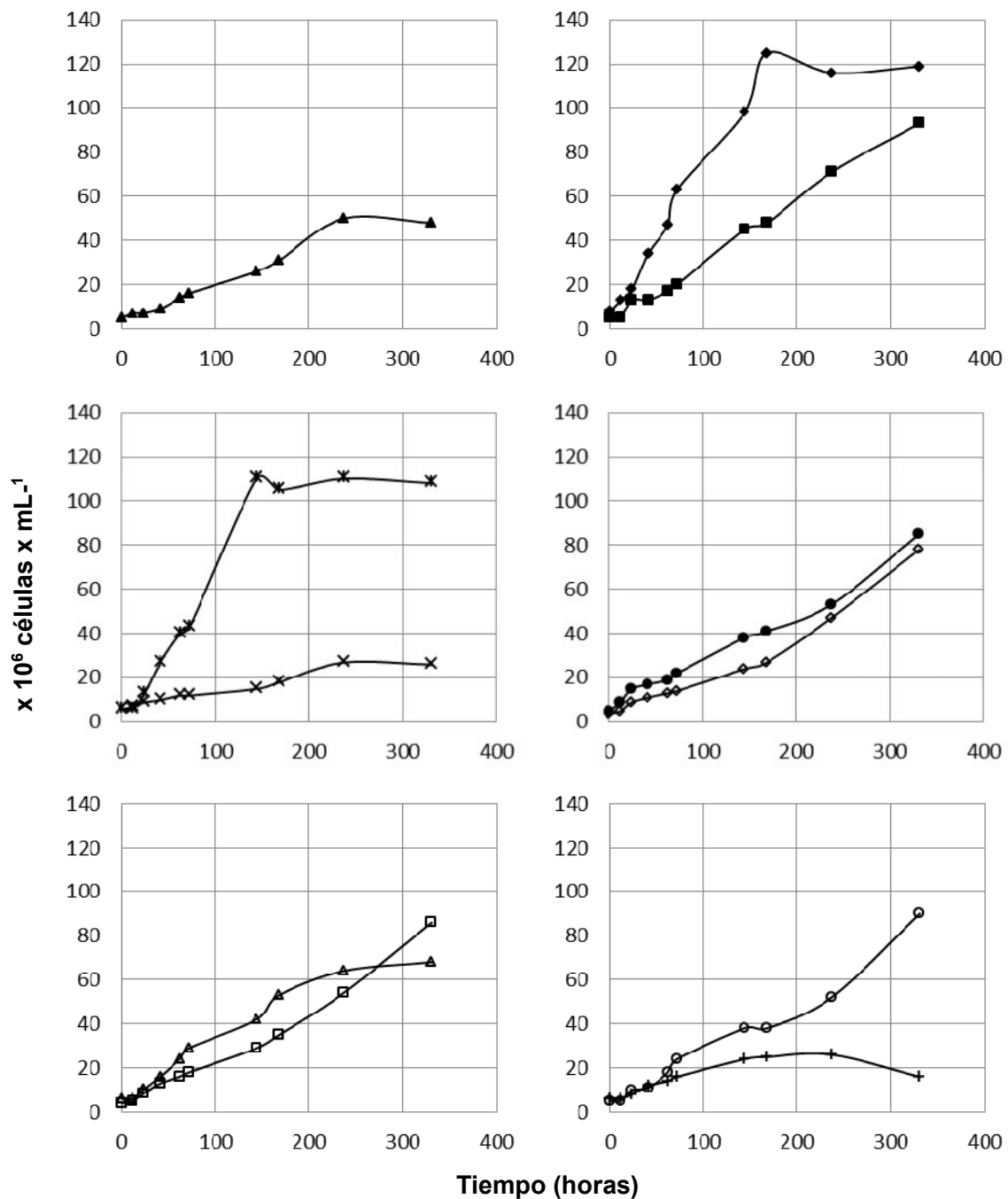


Figura 11. Cinética de crecimiento en medio 9K modificado, pH 1.85 a 5 °C de los once consorcios oxidadores de ion ferroso QuF1(-▲-), QuF2(-X-), QuF3(-◆-), QuF4(-■-), QuF5(-*-), SBF1(-●-), SBF2(-◇-), HuF1(-□-), HuF2(- ○ -), YanF1(-○-), YanF2(-+-).

6.4.2. Cinéticas de crecimiento de consorcios tio-oxidantes a 5°C

Se determinaron las cinéticas de crecimiento de los 11 consorcios tio-oxidantes evaluados (Figura 12), de los cuales destacó el consorcio QuS3 con una $\mu = 8.4 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, para los subsiguientes estudios en sulfuros metálicos.

Además, se determinó la velocidad de crecimiento y el tiempo generacional promedio de cada uno de los consorcios tio-oxidantes evaluados (Tabla 12).

Tabla 12. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales de los consorcios cultivados en medio mínimo más azufre elemental 1% (p/v) a 5°C

Consortio	Medio mínimo con azufre elemental	
	Velocidad de Crecimiento $\mu \times 10^{-3}(\text{h}^{-1})$	Tiempo Generacional (horas)
QuS1	6.8	101.9
QuS2	5.1	135.9
QuS3	8.4	82.5
QuS4	5.8	119.5
QuS5	3.4	203.7
SBS1	5.3	130.8
SBS2	3.8	182.4
HuS1	4.9	141.5
HuS2	6	115.5
YanS1	5.8	119.5
YanS2	4.6	150.7

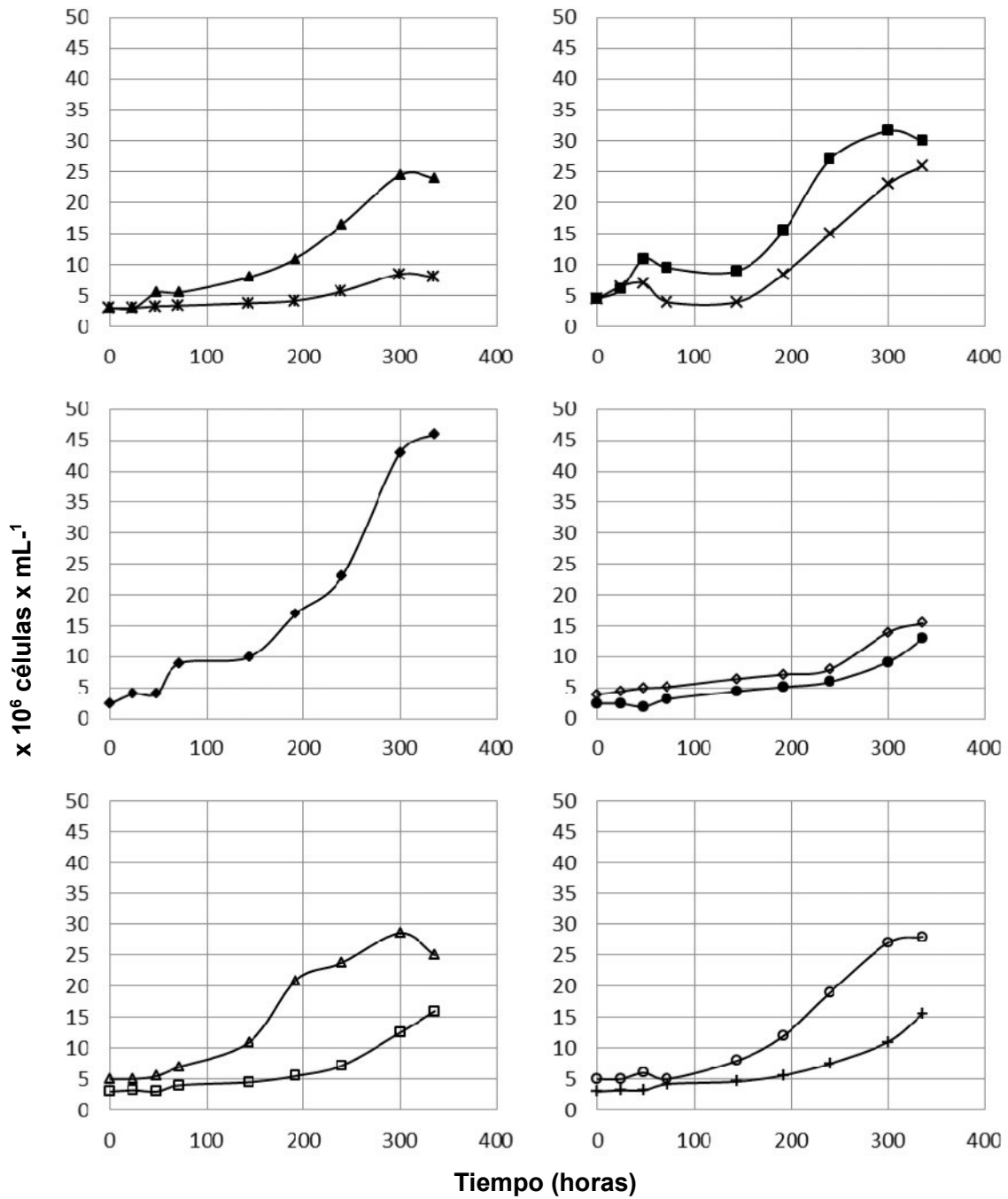


Figura 12. Cinética de crecimiento en medio mínimo más azufre elemental 1% (p/v), pH 2.5 a 5°C de los once consorcios oxidadores de azufre QuS1(-▲-), QuS2(-X-), QuS3(-◆-), QuS4(-■-), QuS5(-*-), SBS1(-●-), SBS2(-◇-), HuS1(-□-), HuS2(-○-), YanS1(-○-), YanS2(-+-).

6.4.3. Cinéticas de crecimiento de consorcios lixiviantes de CuS a 5°C

Se evaluó el crecimiento microbiano en medio mínimo más sulfuro de cobre (CuS) 0.5% (p/v) a 5°C, pH 2.5 de los cinco mejores consorcios ferro-oxidantes (QuF1, QuF3, QuF4, QuF5 y SBF1) y el mejor consorcio tio-oxidante (QuS3), lográndose determinar las cinéticas de crecimiento de todos ellos (Figura 13). Las velocidades de crecimiento específico y tiempos generacionales promedio de cada uno de los consorcios se presentan en la tabla 13.

El CMLP QuF1 mostró el mejor patrón de crecimiento en este sulfuro metálico, con una $\mu = 14 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, por lo que fue elegido para los posteriores ensayos de liberación de cobre (II) de sulfuro de cobre (CuS) y un mineral azufrado compuesto principalmente por calcopirita (CuFeS_2).

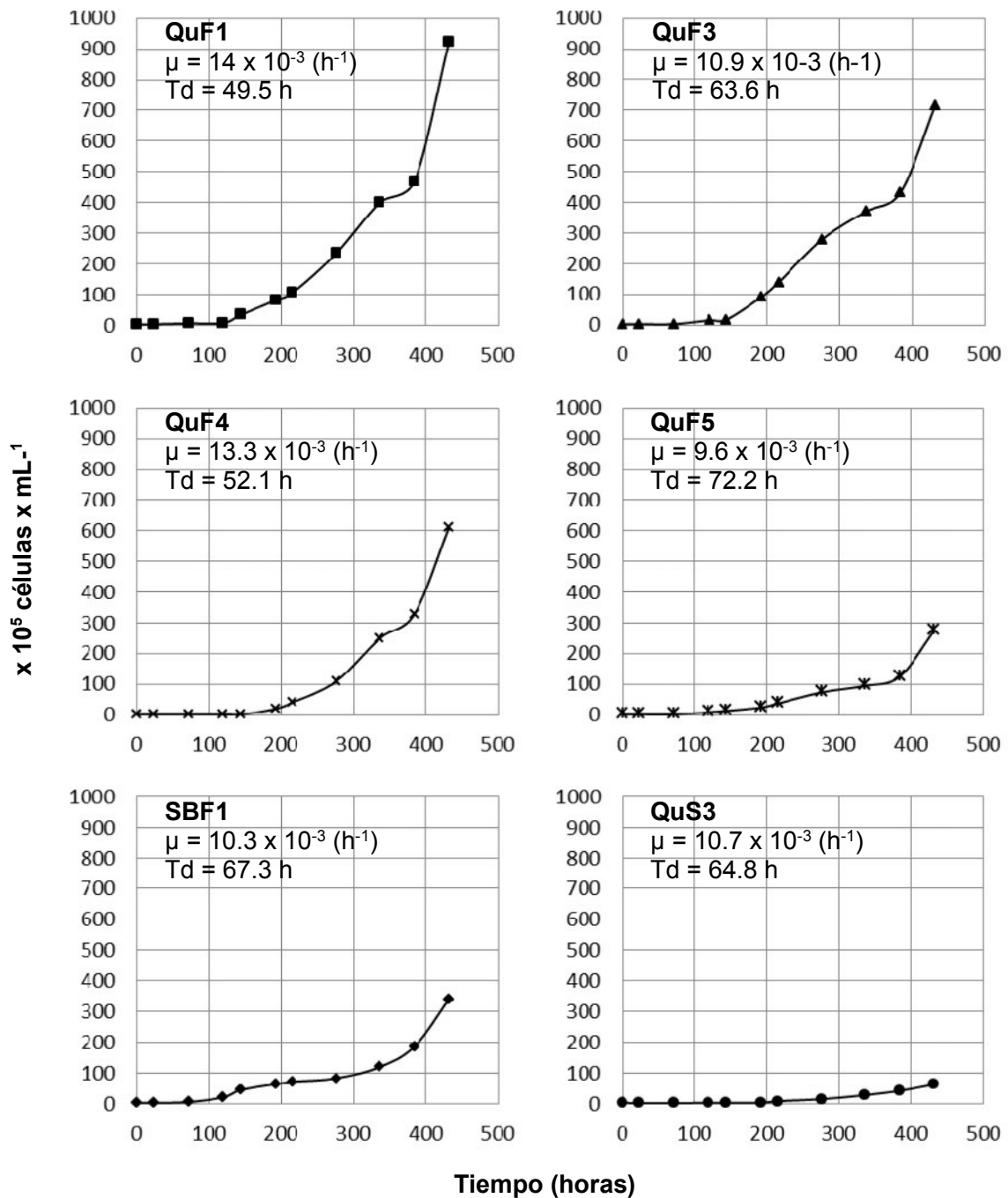


Figura 13. Cinética de crecimiento en medio mínimo más CuS 0.5% (p/v), pH 2.5 a 5°C de los seis consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes elegidos.

6.4.4. Cinéticas de crecimiento de los CMLP en ZnS a 5°C

Se estudio el crecimiento microbiano de los CMLP en medio mínimo suplementado con sulfuro de zinc (ZnS) 0.5 % (p/v) a 5°C (Figura 14), las cinéticas de crecimiento obtenidas son presentadas en la figura 15, mientras que las velocidades de crecimiento específica y tiempos generacionales son mostrados en la tabla 13, donde destacan los consorcios QuF1 y QuF4, tanto en CuS como en ZnS.

Tabla 13. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales de los CMLP cultivados en medio mínimo más CuS 0.5% (p/v) y ZnS 0.5% (p/v) a 5°C

Consortio	CuS		ZnS	
	Velocidad de Crecimiento $\mu \times 10^{-3} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Tiempo Generacional (horas)	Velocidad de Crecimiento $\mu \times 10^{-3} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Tiempo Generacional (horas)
QuF1	14	49.5	9.4	73.7
QuF3	10.9	63.6	8.4	82.5
QuF4	13.3	52.1	11.4	60.8
QuF5	9.6	72.2	6.3	110
SBF1	10.3	67.3	9	77
QuS3	10.7	64.8	6.8	101.9



Figura 14. Cultivos de CMLP en medio mínimo suplementado con sulfuro de zinc a 5°C en reposo (izquierda) y agitación (derecha).

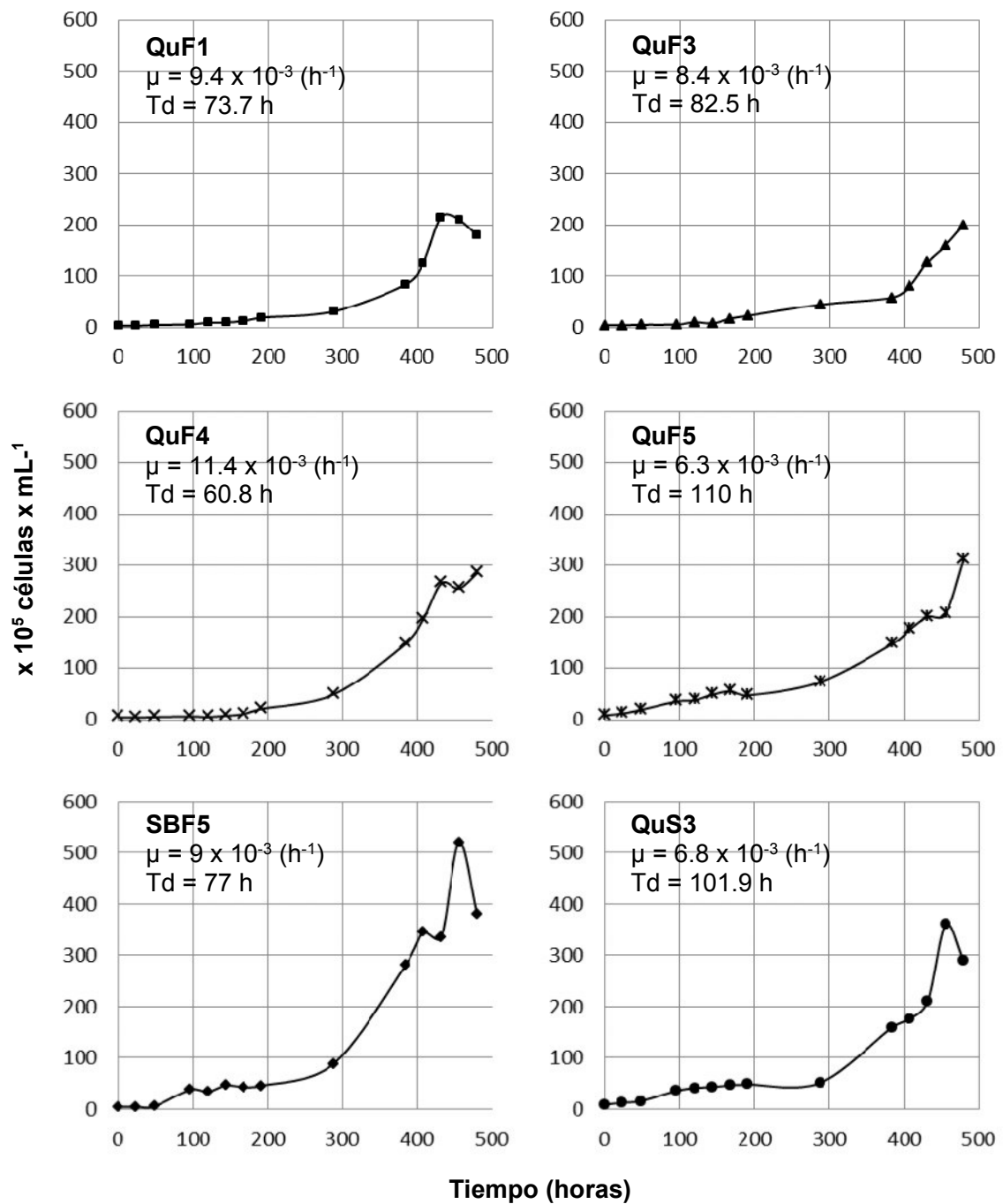


Figura 15. Cinética de crecimiento en medio mínimo más ZnS 0.5% (p/v), pH 2.5 a 5°C de los seis CMLP elegidos.

6.5. Cinéticas de liberación de cobre (II)

El CMLP QuF1, quien resulto tener las mejores características de crecimiento en medio mínimo con CuS, fue elegido para llevar a cabo los experimentos de liberación de cobre (II) a 5°C y pH 2.5 en CuS y un mineral azufrado compuesto por CuFeS₂.

6.5.1. Cinética de liberación de cobre en CuS

El ensayo de liberación de cobre (II) fue llevado a cabo por triplicado y por espacio de 30 días incluyendo un control negativo (blanco). La figura 16 muestra la cinética de liberación de cobre (II) por el consorcio QuF1 obtenida usando el software SPSS v 20.0, teniendo en cuenta para el análisis ± 3 desviaciones estándar que engloban aproximadamente un 99,7% de probabilidad y usando datos normalizados para las concentraciones de cobre (II).

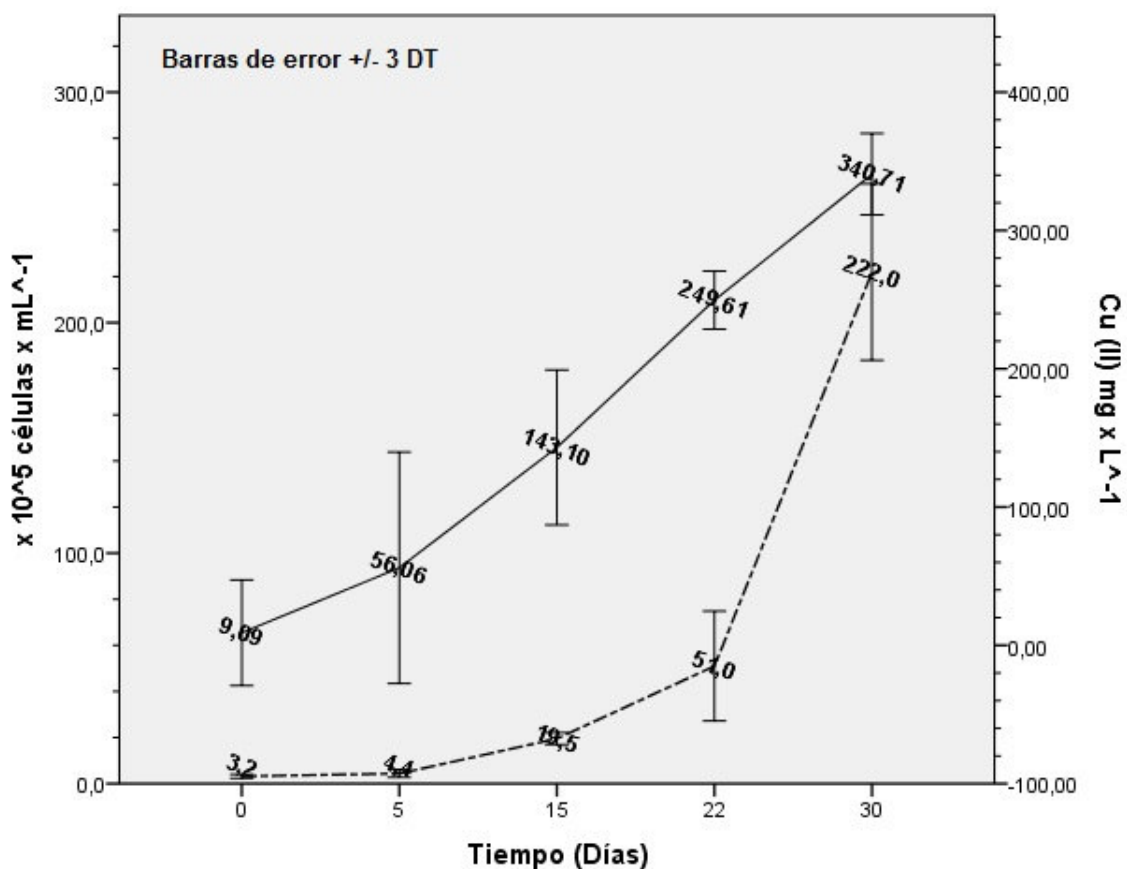


Figura 16. Cinética de liberación de cobre (II) del consorcio QuF1 en medio mínimo suplementado con CuS donde se muestra la curva de liberación de cobre (—) y la curva de crecimiento del consorcio QuF1 (- · -).

Se determinó el rendimiento del consorcio QuF1 para la liberación de cobre (II) en 1.51 mg/L por cada 10^5 células/ml y la liberación de aproximadamente 0.20711 g de cobre por acción microbiana a los 30 días.

6.5.2. Cinética de liberación de cobre en un mineral azufrado.

El ensayo de liberación de cobre (II), proveniente principalmente de la calcopirita (CuFeS_2) constituyente del mineral azufrado, fue llevado a cabo por triplicado (Figura 17) y por un periodo de 35 días donde también se incluyó un control negativo (Blanco).



Figura 17. Cultivos por triplicado del consorcio QuF1 (I, II y III) y un cultivo control (B) en medio mínimo suplementado con un mineral azufrado que contenía calcopirita.

La figura 18 muestra la cinética de liberación de cobre (II) del mineral azufrado, obtenida de la misma forma que en el apartado 6.5.1., donde observamos que la máxima liberación de Cu (II) se dá cuando la población microbiana llega a las 18.5×10^5 células/mL en 14 días.

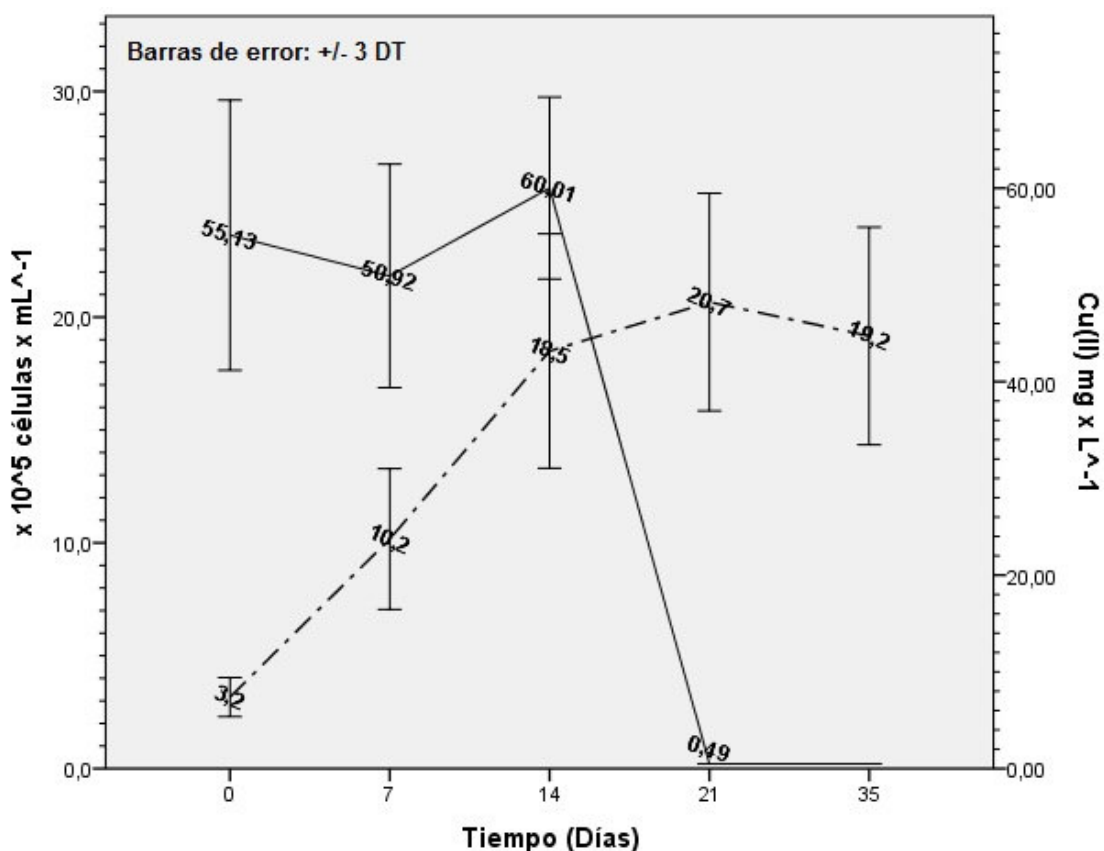


Figura 18. Cinética de liberación de cobre (II) del consorcio QuF1 en medio mínimo suplementado con un mineral azufrado compuesto por CuFeS_2 donde se muestra la curva de liberación de cobre (—) y la curva de crecimiento del consorcio QuF1 (- -):-

Después de la lectura del cobre (II) liberado por el consorcio QuF1 en el décimo cuarto día de incubación a 5°C , los niveles de este cayeron hasta ser indetectables por análisis de absorción atómica (<0.5 ppm) a diferencia del blanco empleado; por lo que no se pudo calcular el rendimiento de liberación de cobre en este sustrato y solo se determinó una liberación aproximada de 0.0048 g de cobre (II) por acción microbiana a los 14 días.

6.6. Análisis Metagenómico

6.6.1. Extracción y cuantificación de DNA de los consorcios lixiviantes de CuS

Se comprobó la calidad del DNA extraído de los consorcios QuF1, QuF3, QuF4, SBF1, QuF5 y QuS3 mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% y además fueron cuantificados en un espectrofotómetro NanoDrop Lite donde los promedios de los valores obtenidos son mostrados en la tabla 14.

Tabla 14. Valores de absorbancia y concentración obtenidos luego de cuantificar el DNA de los consorcios en un espectrofotómetro NanoDrop Lite

DNA	Abs. 260nm	Proporción de Pureza de DNA*	Concentración (ng.µL ⁻¹)	Volumen (µL)	Cantidad Total (µg)
QuF1	0.295	1.66	14.7	80	1.176
QuF3	0.889	1.74	44.4	80	3.55
QuF4	2.313	1.77	139.2	55	7.6
SBF1	1.335	1.67	66.7	55	3.6
QuF5	2.442	1.76	122.1	55	6.7
QuS3	2.224	1.74	111.2	55	6.1

*: Pureza de DNA determinada por el coeficiente de absorbancias a 260 y 280nm.

6.6.2. Amplificación de la región hipervariable V4 de los genes 16S rRNA

Para comprobar la factibilidad de la construcción de las librerías de amplicones con el DNA extraído, se evaluó la inhibición de la amplificación de los genes 16S rRNA incluyendo a la región hipervariable V4 de los consorcios QuF1, QuF3, QuF4, SBF1, QuF5 y QuS3 con los *pmes* bacterianos 27F y 907R, lográndose amplificar exitosamente y descartando la posibilidad de inhibición que pudiera resultar por la presencia de metales u otros iones en el medio de cultivo.

6.6.3. Análisis Bioinformáticos

6.6.3.1. Agrupamiento de *reads* con datos del muestreo usando RDP *Pipeline*

Se obtuvieron 132097 *reads* de 484 pb luego del pirosecuenciamiento, lo cual fue verificado por el análisis preliminar efectuado por el RDP *Pipeline* (Anexo 2), posteriormente, al realizar comparaciones entre la abundancia de *reads*, las especies obtenidas en los consorcios y los parámetros medidos en el muestreo, se evidenciaron cambios significativos solo por los parámetros: concentración de cobre, concentración de zinc y el pH de las muestras. En la figura 19A se observa un marcado agrupamiento de *reads* alineados al género *Acidithiobacillus* sp. a 37.24 mg/L de cobre total y una minoritaria cantidad de *reads* agrupados bajo 20.03 mg/L de cobre total. La concentración de zinc en la muestra de donde fueron recuperados mayor cantidad de *reads* de *Acidithiobacillus* sp. fue de 801.25 mg/L de zinc (Figura 19B), representando ambas concentraciones a la muestra 3.

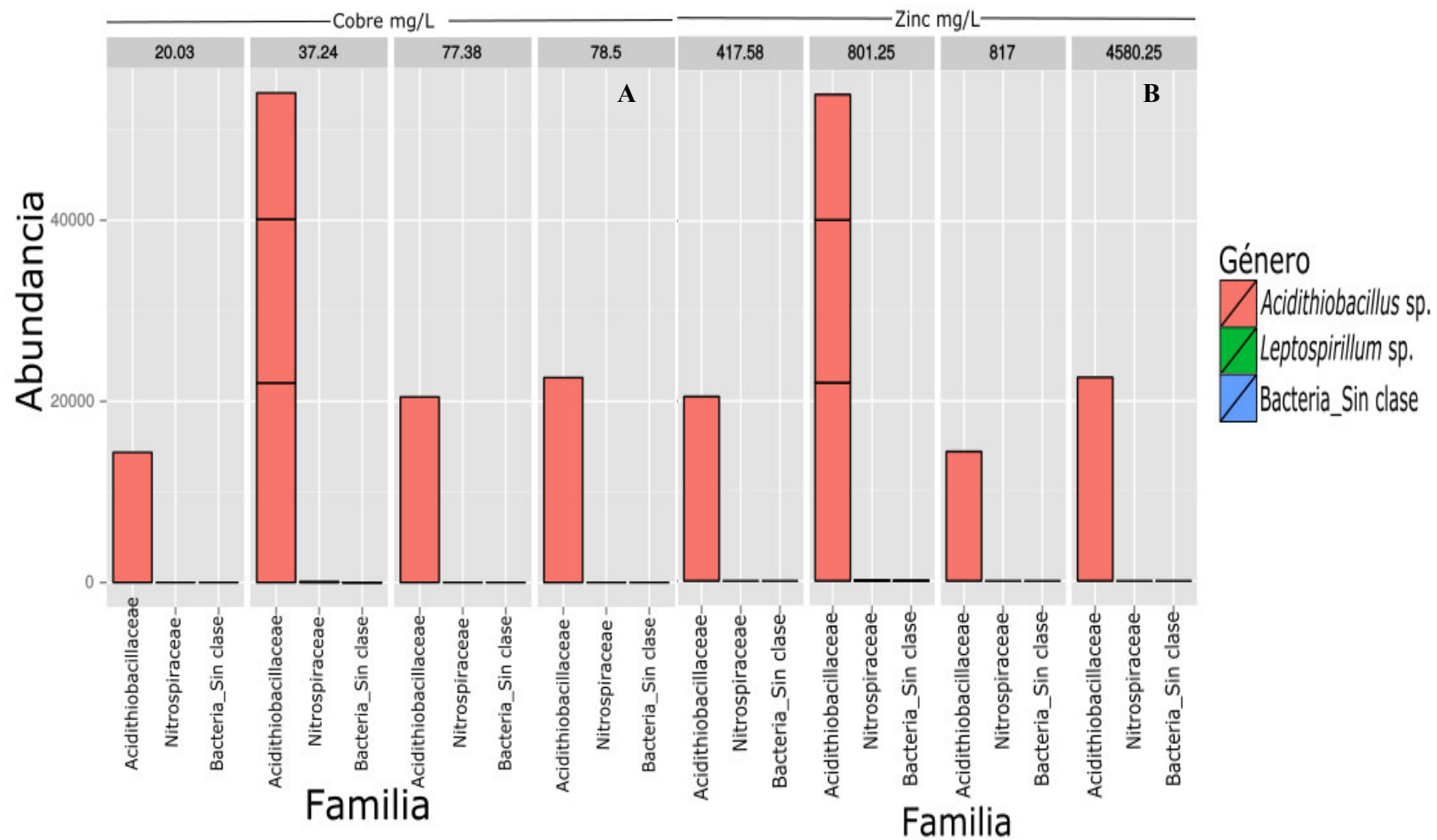


Figura 19. Abundancia de *eads* agrupados por género versus las concentraciones de cobre total en las muestras (A) y zinc total en las muestras (B).

Finalmente, el pH de las muestras de donde se recuperaron mayor cantidad de *eads* del género *Acidithiobacillus* sp. fue 2.65, que correspondió a la muestra 3 y se encuentra representado en la figura 20.

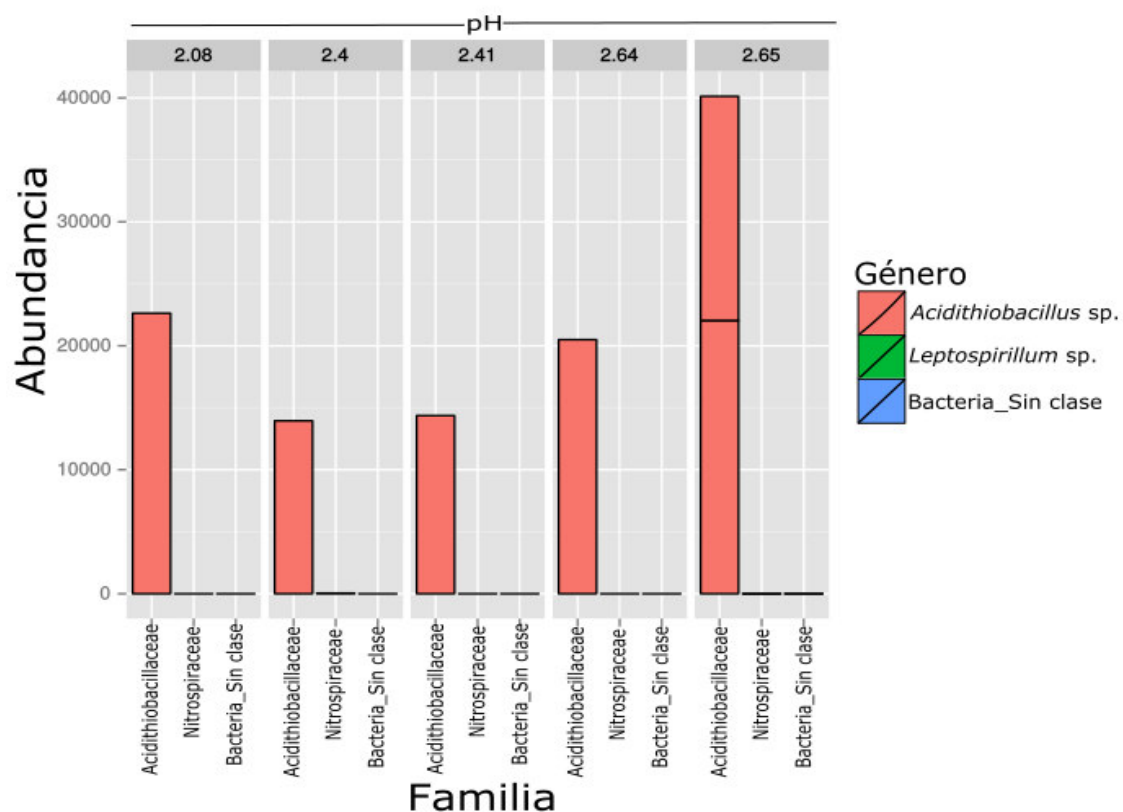


Figura 20. Abundancia de *eads* agrupados por género versus el pH de las muestras.

Las cantidades de *eads* agrupados del género *Leptospirillum* sp. y las bacterias no clasificadas resultaron difíciles de distinguir en las imágenes anteriores, por ello se determinaron sus abundancias cualitativas gráficamente en mapas de calor, usando los mismos parámetros de las imágenes anteriores, al compararlos se logró determinar la asociación del crecimiento de *Leptospirillum* sp. al pH 2.4, concentración de cobre total y zinc correspondientes a la Muestra 1, mientras que las bacterias no identificadas mostraron asociación solo a las concentraciones y el pH correspondiente a la muestra 3 (Figura 21).

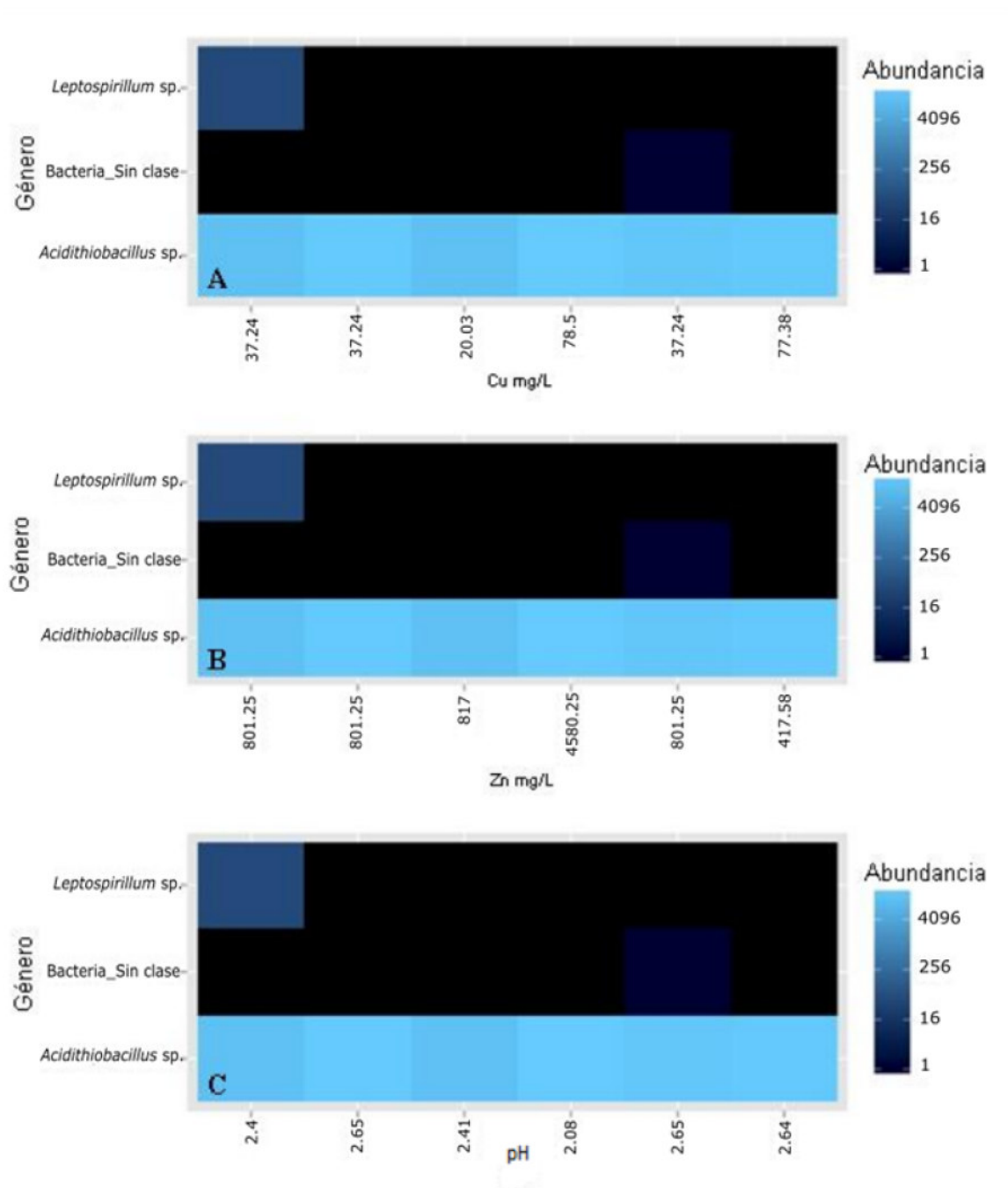


Figura 21. Mapas de calor mostrando la abundancia relativa de los *bad*s analizados respecto al género versus la concentración de cobre total (A), concentración de zinc (B) y la variación del pH en las muestras (C) respectivamente.

6.6.3.2. Análisis de diversidad por especies usando MEGAN

El alineamiento de las secuencias libres de quimeras frente a la base de datos 16S rRNA del Genbank mostró mayor diversidad de géneros a nivel global, usando los parámetros de LCA (*Las Contorno Ancestral*) mostrados en la tabla 4 del apartado 5.9.2. Primero, se determinó la abundancia de *eads* respecto a las especies encontradas en todos los consorcios analizados, teniendo en cuenta el origen de cada grupo de *eads* en el orden QuF1/QuF3/QuF4/QuF5/QuS3/SBF1 mostrado en la figura 22.

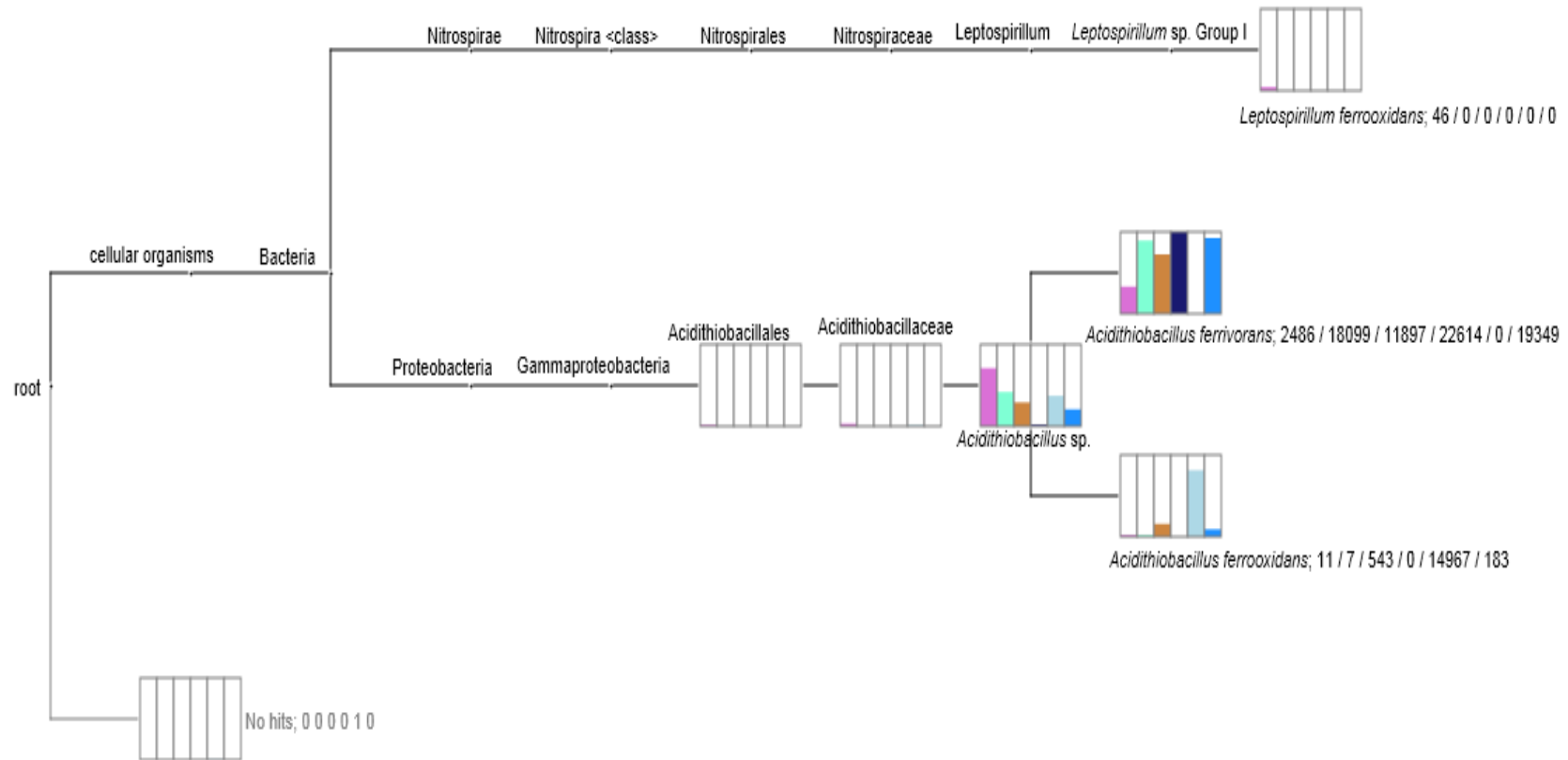


Figura 22. Análisis comparativo de la abundancia de *bad s* presentes por cada especie en los seis consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes, las cantidades presentadas por cada especie siguen el orden: QuF1/QuF3/QuF4/QuF5/QuS3/SBF1.

Posteriormente, los consorcios fueron agrupados en un árbol usando como factor discriminatorio la presencia de especies y el número de *eads* presentes por cada una de ellas, mostrando cercanía entre los consorcios QuF3 y QuF5 por compartir una gran cantidad de *eads* de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y poca o nula presencia de *Leptospira ferrooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, estos dos consorcios son cercanos al consorcio SBF1 compartiendo una elevada cantidad de *eads* de *Acidithiobacillus ferrooxidans*; en contraste a ello el consorcio QuF1 contó con la presencia de las tres especies antes mencionadas y el consorcio QuF4 presentó una cantidad apreciable de *eads* correspondientes a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, lo que lo separó del grupo anterior. Finalmente, el consorcio QuS3 no guardó ninguna relación con los anteriores consorcios y fue agrupado por separado, pues solo presentó una gran cantidad de *eads* pertenecientes a *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Figura 23).

↪ 0.01

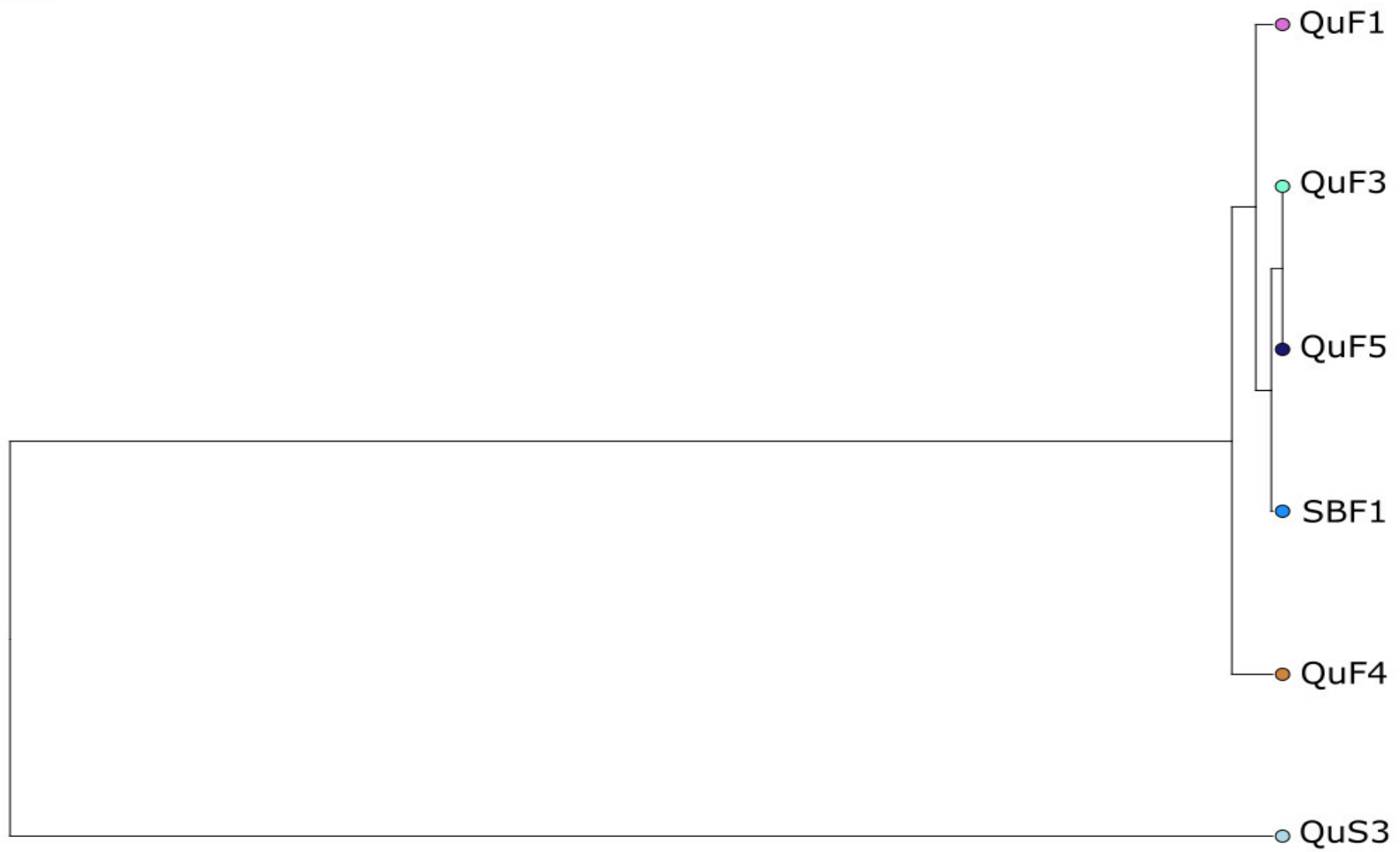


Figura 23. Árbol tipo cladograma agrupando los consorcios lixiviantes analizados.

6.6.3.3. Análisis de diversidad por especies usando MG-RAST

El análisis del alineamiento de las secuencias libres de quimeras frente a las bases de datos del *Ribosomal Database Project* (RDP), Silva (SSU) (Quast *et al.*, 2013) y *Greengenes* (DeSantis *et al.*, 2006) realizado por MG-RAST usando la opción *BestHit Score*, fue sintetizado en la tabla 15 donde se aprecia la predominancia de *reads* correspondientes a "*Uncultured bacteria*" en todos los consorcios lixiviantes y sólo el consorcio QuF01 presentó *reads* alineados a *Leptothorax feoidans* y *Acidithiobacillus feoidans* con una abundancia media y baja respectivamente.

Tabla 15. Resumen de los alineamientos efectuados por la plataforma de análisis metagenómico MG-RAST usando como base de datos: RDP, SSU y Greengenes

Metagenome	Source Database	Family	Genus	Species	Abundance	avg eValue	avg % ident	avg align len	# hits
QuF01	RDP	Nitrospiraceae	Leptospirillum	<i>Leptospirillum fealdans</i>	45	-229	100	401	1
QuF01	SSU	Nitrospiraceae	Leptospirillum	<i>Leptospirillum fealdans</i>	45	-229	100	401	1
QuF01	Greengenes	Nitrospiraceae	Leptospirillum	<i>Leptospirillum fealdans</i>	45	-203	100	357	1
QuF01	RDP	Acidithiobacillaceae	Acidithiobacillus	<i>Acidithiobacillus fealdans</i>	2	-159	99.65	284	1
QuF01	Greengenes	Acidithiobacillaceae	Acidithiobacillus	<i>Acidithiobacillus fealdans</i>	2	-159	99.65	284	1
QuF01	SSU	Acidithiobacillaceae	Acidithiobacillus	<i>Acidithiobacillus fealdans</i>	2	-159	99.65	284	1
QuS03	RDP	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	18145	-210.96	100	370.94	2
QuS03	Greengenes	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	18145	-210.96	100	370.94	2
QuS03	SSU	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	18145	-210.96	100	370.94	2
SBF01	RDP	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	20831	-232	99.29	422	2
SBF01	Greengenes	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	20831	-232	99.29	422	2
SBF01	SSU	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	20831	-232	99.29	422	2

Continuación...

QuF01	RDP	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	14153	-234.81	99.76	415.66	2
QuF01	Greengenes	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	14153	-234.81	99.76	415.66	2
QuF01	SSU	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	14153	-234.81	99.76	415.66	2
QuF03	RDP	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	22341	-240	100	419	1
QuF03	SSU	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	22341	-240	100	419	1
QuF03	Greengenes	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	22341	-240	100	419	1
QuF05	Greengenes	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	22924	-272.98	99.18	485.97	2
QuF05	SSU	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	22924	-272.98	99.18	485.97	2
QuF05	RDP	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	22924	-272.98	99.18	485.97	2
QuF04	SSU	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	14535	-237.03	99.76	420.06	2
QuF04	Greengenes	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	14535	-237.03	99.76	420.06	2
QuF04	RDP	unclassified (derived from Bacteria)	unclassified (derived from Bacteria)	uncultured bacterium	14535	-237.03	99.76	420.06	2

La suficiencia de la cantidad de *reads* analizados para la asignación de especies fue medida gracias a las curvas de rarefacción construidas por la plataforma MG-RAST, obteniendo curvas idénticas para los consorcios QuF03, QuF04, QuF05, QuS03 y SBF01 (curvas no mostradas) las cuales llegaron a la región *Plataeu* al nivel de una especie, mostrando la representatividad de los *reads* analizados en estos consorcios; mientras que para el consorcio QuF01, se obtuvo una curva de rarefacción distinta (Figura 24), que de igual forma mostró la representatividad de la cantidad de *reads* analizados.

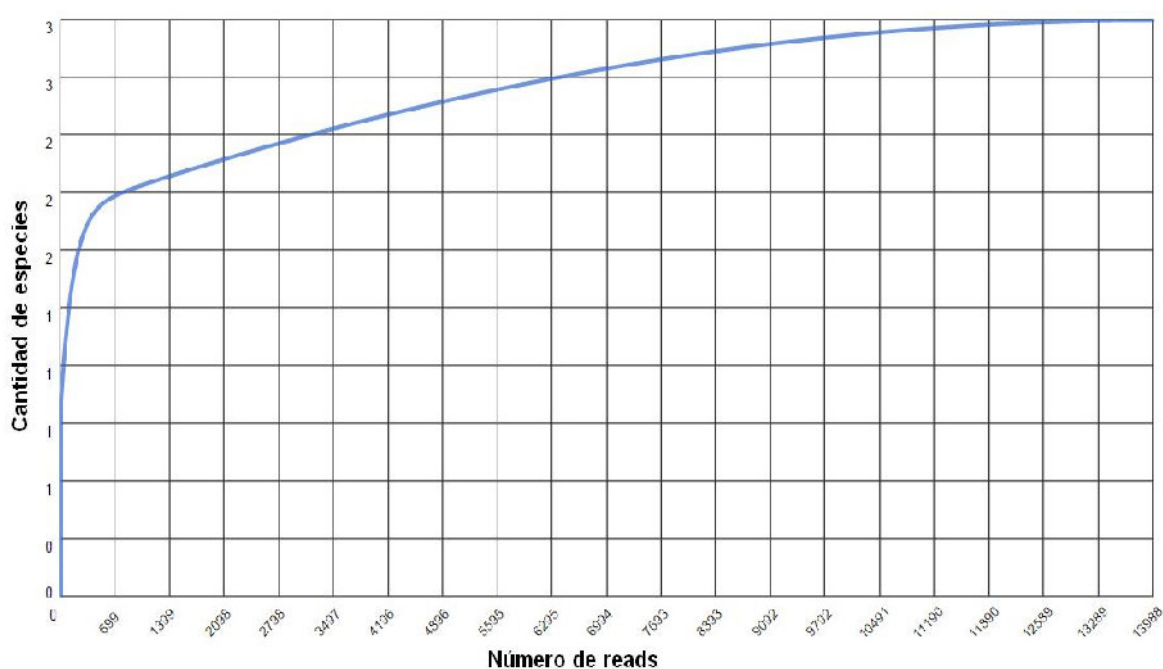


Figura 24. Curva de rarefacción de los *reads* correspondientes al consorcio QuF01 construida en la plataforma MG-RAST.

Además, mediante la plataforma de MG-RAST se calcularon los valores de la diversidad alfa para cada consorcio (Tabla 16), evidenciando la cantidad media de especies presentes igual a 1 en cada consorcio.

Tabla 16. Valores de diversidad alfa calculados para cada consorcio en la plataforma MG-RAST

Metagenoma	Diversidad Alfa
QuF1	1.023
QuF3	1.000
QuF4	1.000
QuF5	1.000
QuS3	1.000
SBF1	1.000

6.6.3.4. Análisis de diversidad por OTUs (*Operational Taxonomic Units*) usando Mothur

Para el análisis de la abundancia de OTUs en cada consorcio, se trabajaron los *reads* sin procesar obtenidos luego del pirosecuenciamiento, siguiendo la metodología planteada en el apartado 5.9.4.

Se obtuvieron 6 OTUs en los 6 consorcios analizados en conjunto para una distancia de 0.09 (la mayor distancia ejecutada entre todas las secuencias), la composición de cada consorcio de acuerdo a los OTUs presentes es representada en un mapa de calor en la figura 25. Se determinó que los consorcios lixiviantes QuF3 y QuF4 estuvieron constituidos con el mayor número de OTUs (3 OTUs cada uno).

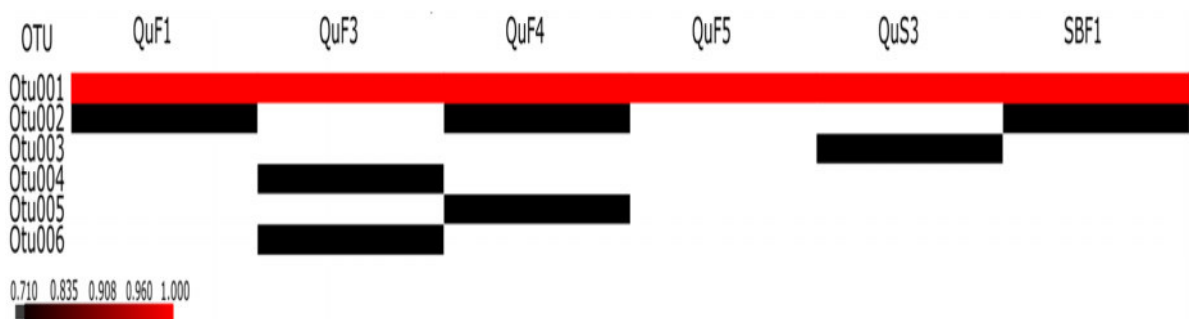


Figura 25. Mapa de calor obtenido por Mothur representando los OTUs hallados versus los consorcios lixiviantes analizados a una distancia de 0.09.

En base al mapa de calor obtenido, se determinó que los consorcios QuF1 y SBF1 presentaron la misma composición de OTUs, por lo cual solo el consorcio QuF1 fue elegido como consorcio representativo para construir un diagrama de Venn (Figura 26) que muestre comparativamente el número de OTUs entre 4 consorcios (número máximo de consorcios comparables en el diagrama de Venn), mientras que el consorcio QuF5 no fue considerado para este análisis ya que posee solo un OTU y lo comparte con todos los consorcios.

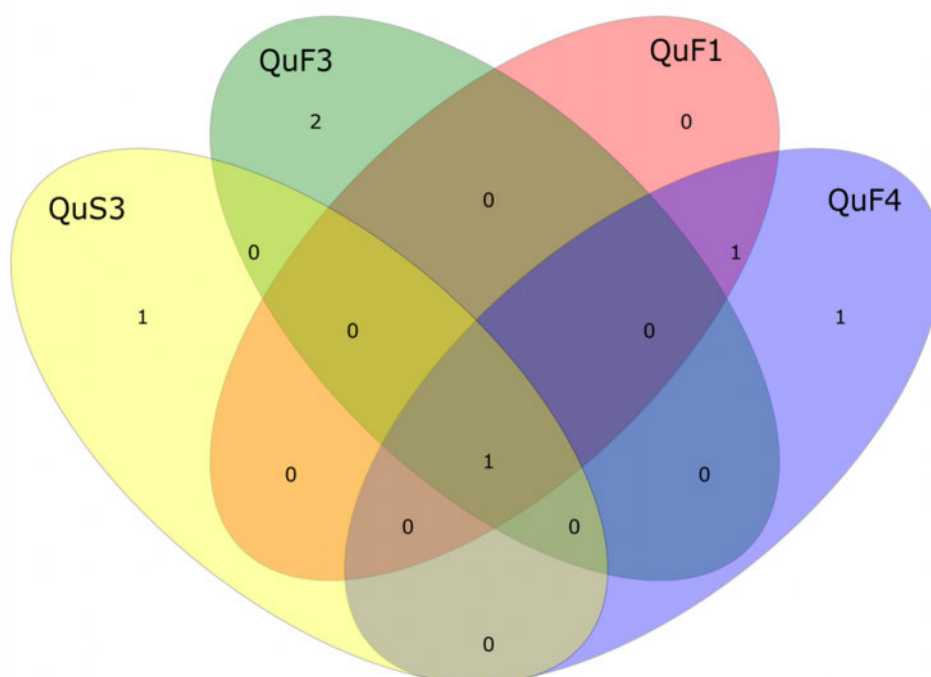


Figura 26. Diagrama de Venn a la distancia de 0.09, comparando la composición de OTUs entre los consorcios QuF1, QuF3, QuF4 y QuS3.

Para determinar la diversidad alfa de cada consorcio lixivante, se calcularon la inversa del índice de Simpson y el estimador de riqueza CHAO1 incluyendo los límites correspondientes al intervalo de confianza al 95% para cada consorcio lixivante y para una distancia de 0.09 entre todos los *eads* evaluados (Tabla 17). Se determinaron valores cercanos a 1 para todos los consorcios respecto a la inversa del índice de

Simpson evidenciando la predominancia de un solo tipo de OTU en cada uno de los consorcios, mientras que los valores obtenidos para el estimador CHAO1 muestran diferencias para el número de OTUs estimados en cada uno de los consorcios, donde solo el consorcio QuF5 tuvo un valor de 1.0000 como la cantidad de OTUs estimados.

Tabla 17. Índices de diversidad alfa calculados para cada consorcio lixiviante en el software Mothur v 1.35

Consortio	# Reads	INV SIMPSON			CHAO 1		
		0.09	lci	hci	0.09	lci	hci
QuF1	21390	1.0155	1.0132	1.0179	2.0000	2.0000	2.0000
QuF3	29743	1.0001	0.9999	1.0003	4.0000	3.0774	15.9241
QuF4	20971	1.0002	0.9999	1.0005	4.0000	3.0774	15.9241
QuF5	29038	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
QuS3	24167	1.0001	0.9999	1.0002	2.0000	2.0000	0.0000
SBF1	27589	1.0001	0.9999	1.0002	2.0000	2.0000	0.0000

Abreviaciones: lci=Límite inferior del intervalo de confianza; hci: Límite superior del intervalo de confianza.

Finalmente, la identificación taxonómica de cada OTU comparada a la base de datos del RDP es detallada en la tabla 18.

Tabla 18. Identificación taxonómica de cada OTU, comparados a la base de datos RDP

OTU	Taxonomía
Otu001	<i>Acidithibacillus</i> sp.
Otu002	<i>Leptothorax</i> sp.
Otu003	unclassified
Otu004	<i>Acidithibacillus</i> sp.
Otu005	<i>Acidithibacillus</i> sp.
Otu006	unclassified

6.6.3.5. Análisis del contenido metagenómico de los CMLP.

La suficiencia de la cantidad de genomas referenciales para la predicción metagenómica es representada por el índice NSTI, que determina si es posible ejecutar una predicción para los consorcios analizados. Este índice se calculó para cada uno de los consorcios evaluados, y sus valores se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Valores del *Nearest Sequenced Taxon Index* (NSTI) para cada consorcio lixivante

Consorcio	Índice	Valor
QuF1	NSTI	0.0397968267223
QuF3	NSTI	0.0358825653382
QuF4	NSTI	0.0359043982453
QuF5	NSTI	0.03588
QuS3	NSTI	0.0358831572414
SBF1	NSTI	0.0358985458499

Posteriormente se evaluó la presencia de diferentes genes relacionados a la psicrotolerancia, oxidación de sustratos, obtención de energía, formación de biofilm y resistencia a metales pesados, cuya presencia/ausencia se detalla en la tabla 20.

Tabla 20. Cantidades de genes por genoma y porcentajes de contribución de los genes evaluados para cada consorcio lixiviante

PROBABLE FUNCIÓN EN EL METAGENOMA	Función	Gen	Código KEGG	Consortio		QuF1	QuF3	QuF4	QuF5	QuS3	SBF1	
				OTU N°		1022355	191142	1022355				
				Genero/Especie		sp.		sp.				
Parámetros calculados				<i>Acidithiobacilla</i>	<i>Leptothrix</i> <i>feraxans</i>	<i>Acidithiobacilla</i>						
CONTROL POSITIVO	Replicación del DNA	DNA Girasa Subunidad A	K02469	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967	
		DNA Girasa Subunidad B	K02470	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967	
CONTROL NEGATIVO	Fotosíntesis	Centro de reacción fotosintético	K13992	Cantidad de genes por genoma	-	-	-	-	-	-	-	
				Porcentaje de contribución al consorcio	-	-	-	-	-	-	-	

Continuación...

PSICROTOLERANCIA	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados	Estearoil-CoA desaturasa	K00507	Cantidad de genes por genoma	-	1.0	-	-	-	-	-
				Porcentaje de contribución al consorcio	-	1.0	-	-	-	-	-
	Biosíntesis de lípidos	3-oxoacyl-[proteína portadora de acilo] sintasa II	K09458	Cantidad de genes por genoma	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.969842 357779	0.03015 764222 07	0.9999 77585 511	0.9998 09287 69	1.0	0.9999 724137 93	0.9998 55030 444
		3-oxoacyl-[proteína portadora de acilo] sintasa III	K00648	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 32759 548	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 172459 45	0.9999 27509 967
	Metabolismo de carbohidratos	Sacarosa sintasa	K00695	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		Sacarosa-fosfato sintasa	K00696	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
		Alfa-trehalosa-fosfato sintasa	K00697	Cantidad de genes por genoma	-	1.0	-	-	-	-	-
				Porcentaje de contribución al consorcio	-	1.0	-	-	-	-	-
		N-acetilneuraminato sintasa	K01654	Cantidad de genes por genoma	-	1.0	-	-	-	-	-
				Porcentaje de contribución al consorcio	-	1.0	-	-	-	-	-

Continuación...

Protección anti-congelamiento	Familia HlyD de proteínas de secreción	K01993	Cantidad de genes por genoma	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	
			Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967	
	5-formil tetrahidrofolato ciclo-ligasa (Proteína anticongelante tipo I)	K01934	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
			Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967	
	Factores de transcripción (Procesamiento de información genética)	Proteína <i>ctd/sok</i> de la familia CspA	K03704	Cantidad de genes por genoma	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.992286 115007	0.00771 388499 299	0.9999 55172 027	0.9999 52315 102	1.0	0.9999 448291 08	0.9999 63753 67
Metabolismo de Nucleotidos (Purinas) y aminoácidos (alanina, aspartato y glutamato)	Liasa adenilosuccinato	K01756	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
			Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967	
	Adenilosuccinato sintasa	K01939	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
			Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967	
Sistema de dos componentes (Procesamiento de información ambiental)	Sistema de dos componentes, familia OmpR, regulador de respuesta	K02483	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
			Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	0.9999 77585 511	1.0	1.0	0.9999 724137 93	1.0	

Continuación...

	Plegamiento de proteínas y procesamiento asociado	Peroxirredoxina Q/BCP	K03564	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
				Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	0.9999 77585 511	1.0	1.0	0.9999 724137 93	1.0	
		Peroxirredoxina (Subunidad C de la alquil-hidroperóxido reductasa)	K03386	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 55172 027	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 448291 08	0.9999 27509 967	
	Transporte y catabolismo/ Peroxisoma	Superoxido dismutasa, familia Fe-Mn	K04564	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	1.0	0.9999 04634 751	1.0	1.0	0.9999 27509 967	
	Traducción, biogénesis ribosomal	Caja DeaD helicasa de RNA dependiente de ATP	K05592	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
				Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	0.9999 77585 511	1.0	1.0	0.9999 724137 93	1.0	
	OXIDACIÓN DE SUSTRATOS Y OBTENCIÓN DE ENERGÍA	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Proteína no caracterizada involucrada en la oxidación del azufre intracelular	K06039	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
					Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967
Metabolismo del metano		Subunidad A de la Heterodisulfuro reductasa	K03388	Cantidad de genes por genoma	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.969842 357779	0.03015 764222 07	0.9998 65528 138	0.9998 09287 69	1.0	0.9998 345055 85	0.9998 55030 444	
		Subunidad B de la Heterodisulfuro reductasa	K03389	Cantidad de genes por genoma	3.0	1.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.994844 152801	0.00515 584719 944	0.9999 85056 896	0.9999 68209 563	1.0	0.9999 816090 26	0.9999 75835 488	

Continuación...

		Subunidad C de la Heterodisulfuro reductasa	K03390	Cantidad de genes por genoma	2.0	1.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0		
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.992286 115007	0.00771 388499 299	1.0	0.9999 52315 102	1.0	1.0	0.9999 63753 67		
	Metabolismo del Nitrógeno		Proteína de fijación de nitrógeno NifB	K02585	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
					Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 77585 511	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 724137 93	0.9999 27509 967	
			Proteína de fijación de nitrógeno NifT	K02593	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
					Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
			Proteína de fijación de nitrógeno NifU y proteínas relacionadas	K04488	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
					Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	0.9999 55172 027	1.0	1.0	0.9999 448291 08	1.0	
			Proteína de fijación de nitrógeno NifX	K02596	Cantidad de genes por genoma	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
					Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	1.0	0.9999 04634 751	1.0	1.0	0.9999 27509 967	
			Proteína de fijación de nitrógeno NifZ	K02597	Cantidad de genes por genoma	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
					Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
		FORMACIÓN DE BIOFILM	Señalización y procesamiento celular	Proteína de membrana externa para exportación de polisacáridos	K01991	Cantidad de genes por genoma	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
						Porcentaje de contribución al consorcio	0.984690 32707	0.01530 967292 97	0.9999 88792 63	0.9999 04634 751	1.0	0.9999 862067 06	0.9999 27509 967
Factores de transcripción, sistema de dos componentes	Regulador transcripcional de la familia LuxR, η - <i>sen</i> g <i>sb</i> <i>egl</i> ab SdiA		K07782	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		
				Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0		

Continuación...

	Proteínas de la motilidad bacteriana	Proteína FlgA para la formación del anillo P en el cuerpo basal de los flagelos	K02386	Cantidad de genes por genoma	-	1.0	-	-	-	-	-
				Porcentaje de contribución al consorcio	-	1.0	-	-	-	-	-
	Sistema de secreción	Proteína G de la vía de secreción general/Proteína putativa CtsG pseudopilina	K02456	Cantidad de genes por genoma	-	2.0	-	-	-	-	-
				Porcentaje de contribución al consorcio	-	1.0	-	-	-	-	-
RESISTENCIA A METALES PESADOS	Metabolismo energético	ATPasa exportadora de Cu ²⁺ copB	K01533	Cantidad de genes por genoma	3.0	1.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	0.994844 152801	0.00515 584719 944	0.9999 85056 896	0.9999 68209 563	1.0	0.9999 816090 26	0.9999 75835 488
	Sistema de dos componentes	Regulon fosfato, regulador de respuesta para la resistencia de cobre	K07665	Cantidad de genes por genoma	-	1.0	-	-	-	-	-
				Porcentaje de contribución al consorcio	-	1.0	-	-	-	-	-
	Procesos celulares y de señalización	Proteína de membrana de la bomba para arsénico	K03893	Cantidad de genes por genoma	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
				Porcentaje de contribución al consorcio	1.0	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Además, algunos genes evaluados que no estuvieron presentes en los metagenomas virtuales están indicados en la tabla 21.

Tabla 21. Genes ausentes en el análisis de los metagenomas virtuales de los CMLP

Función evaluada	Función	Gen	Código KEGG
Obtención de energía	Metabolismo del nitrógeno	Proteína de fijación de nitrógeno NifQ	K15790
Resistencia a metales pesados	Transporte de metales pesados	Proteína de resistencia a cobalto, zinc y cadmium CzcA	K15726
Psicrotolerancia	Respuesta al choque de frío	Inhibidor A asociado al ribosoma	K05809
Psicrotolerancia	Metabolismo de carbohidratos	Trehalosa-6-fosfato fosfatasa	K01087
Psicrotolerancia	Metabolismo de carbohidratos	Betaína aldehído deshidrogenasa	K00130

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos fisicoquímicos obtenidos de cada una de las muestras evidencia la relación existente entre conductividad y valores de pH, así pues, a valores elevados de conductividad se correspondieron valores bajos de pH, como es el caso de la muestra 7 del distrito de Simon Bolívar, con un pH de 1.89 (la muestra con menor pH de todas) y conductividad de 3 999 (máximo valor detectable por el multiparámetro) en contraste a la muestra 10 de la Unidad de Producción Minera Huarón que presentó un valor de pH de 3,65 (el máximo valor obtenido en el muestreo) y un valor de conductividad de 1 200 (el mínimo valor obtenido en el muestreo). En general, todas las muestras presentaron valores de pH por debajo de 3,65 siendo este el parámetro que más importancia tuvo al momento del muestreo (Kuang *et al.* , 2013), pues a valores de pH por debajo de 4, es más probable hallar microorganismos lixiviantes acidófilos viables (Abanto *et al.* , 2013).

A diferencia de algunos estudios que señalan que la temperatura ambiental es el principal factor que controla la estructura y dinámica de comunidades microbianas (Ward *et al.* , 1998; Miller *et al.* , 2009), en el presente trabajo la temperatura ambiental no fue determinante para el aislamiento de consorcios eficientes, pues el consorcio QuF5 demostró patrones de crecimiento eficientes a pesar de haber sido aislado de una muestra con una temperatura a 20°C (la segunda temperatura más alta en el muestreo).

Se obtuvieron consorcios acidófilos a partir de todas las muestras de aguas ácidas cultivadas en medio modificado 9K a temperatura ambiente (~25°C), pero al ensayar la psicrotolerancia a temperaturas menores e iguales a 15°C se obtuvieron solo 10 consorcios microbianos acidófilos con un óptimo crecimiento, mientras que el consorcio YanF2 mostró un patrón de crecimiento demasiado lento con poca capacidad de oxidación de sulfato ferroso. Esto puede deberse a la inexistencia de poblaciones

microbianas acidófilas psicrotolerantes oxidadoras de hierro en el consorcio YanF2, producto de un alto pH y las bajas concentraciones de metales como cobre y zinc en la muestra de donde fue aislada. Luego de la evaluación de los parámetros cinéticos en los consorcios ferro-oxidantes se eligieron los consorcios QuF1, QuF3, QuF4, QuF5 y SBF1 para los posteriores estudios en sulfuros metálicos.

En cuanto a los cultivos en medio mínimo suplementado con perlas de azufre, todos los consorcios mostraron crecimiento a temperatura ambiente (~25°C) y a bajas temperaturas, incluso el consorcio YanF2, lo que podría sugerir que existen poblaciones microbianas psicrotolerantes en este consorcio, pero que solo son tio-oxidantes. Posteriormente, después de la evaluación de los parámetros cinéticos a 5°C se eligió el consorcio QuS3 para los ensayos en sulfuros metálicos.

Los consorcios lixiviantes de sulfuro de cobre fueron cultivados por varios días hasta evidenciar la liberación de cobre (II) gracias al cambio de color del sobrenadante a un azul turquesa (formación de sulfato de cobre). Los consorcios más eficientes respecto al crecimiento utilizando solamente CuS, fueron los consorcios QuF1, QuF3, QuF4, QuF5, QuS3 y SBF1, que provinieron de muestras con altas concentraciones de cobre y principalmente zinc, como es el caso de la muestra 1 que dio origen al consorcio QuF1. El crecimiento óptimo de dichos consorcios puede deberse también a la mineralogía del lugar de muestreo, y las propiedades lixiviantes que le confiere a las comunidades microbianas (Shi *et al.* , 2006), pues, el consorcio QuF1 fue muestreado en la localidad de Quiulacocha, cercana a desmontes de pirita (FeS₂) y calcopirita (CuFeS₂), por lo que puede contar con capacidad de oxidación de sulfuros de cobre (Johnson, 1998). Luego de evaluar los parámetros cinéticos de los seis consorcios lixiviantes antes mencionados a 5°C, se eligió el consorcio QuF1 para los posteriores ensayos de liberación de cobre (II), ya que mostró el tiempo generacional más corto (49.5 horas) y la velocidad de crecimiento

más alta ($14 \times 10^{-3} \mu/h$) denotando una buena adaptación a la lixiviación a bajas temperaturas.

Respecto al crecimiento en medio mínimo suplementado con sulfuro de zinc como único sustrato, las velocidades de crecimiento y los tiempos generacionales fueron menores y mayores respectivamente en cada uno de los consorcios lixiviantes evaluados en comparación a sus parámetros cinéticos en CuS, pudiendo deberse a las propiedades mineralógicas del sustrato utilizado, la acumulación de azufre elemental y la inexistencia o poca disponibilidad de trazas de hierro en el cultivo que puedan servir para activar la lixiviación como lo sugerido por Shi *et al.* (2006).

En el ensayo de liberación de cobre (II) a partir de un cultivo en CuS por el consorcio QuF1 se determinó un rendimiento de 1.51 mg/L de cobre (II) por cada 10^5 células/mL y la liberación de 0.20711 g de cobre por acción microbiana a los 30 días a diferencia de los 0.25g reportados por Kinnunen y Puhakka (2004) en cultivos termófilos en sulfuros de cobre. Respecto al ensayo de liberación de cobre (II) a partir del mineral azufrado (Calcopirita principalmente) no se logró determinar eficiencia alguna y solo se calculó la liberación aproximada de 0.0048 g de cobre (II) por acción microbiana a los 14 días, hallándose lecturas posteriores menores a 0.05 mg/L de cobre (II) posiblemente por el incremento de la precipitación de azufre o derivados férricos que recubren al mineral sulfurado e impiden el desarrollo de la biolixiviación o producto de la naturaleza recalcitrante de los minerales sulfurados de cobre y principalmente de la calcopirita, como lo señalan Dopson y Lindström (2004) y Kim *et al.* (2009).

El análisis de los 174,831 *reads* obtenidos con el pirosecuenciamiento de las librerías de amplicones de los consorcios lixiviantes mostró la clara predominancia del género *Acidithiobacillus* sp. en los seis consorcios analizados, apoyado por los análisis en

el RDP Pipeline , el ~~bio~~ Mothur y principalmente en el ~~bio~~ MEGAN donde además se identificaron a las especies *Acidithiobacillus ferrooxidans* en todos los consorcios con excepción del consorcio QuS3 y a *Acidithiobacillus ferridans* en todos los consorcios con excepción del consorcio QuF5; mientras que la plataforma en línea MG-RAST calificó como “*Uncultured bacterium*” a la mayoría de ~~ead~~ s analizados para todos los consorcios lixiviantes, pudiendo indicar que la comparación de secuencias mediante este método fue realizada con las bases de datos aun etiquetadas con “*Environmental samples*”, “*Uncultured*” o “*Unclassified*” como se muestra en versiones anteriores indicadas por Huson *et al.* (2011). Para el caso del género *Leptospirillum* sp. y más específicamente para la especie *Leptospirillum ferrooxidans*, se determinó su presencia principalmente en el consorcio QuF1 (apoyado por todos los análisis) y el ~~bio~~ Mothur determinó también su presencia en los consorcios QuF4 y SBF1 a nivel del análisis por OTUs (un análisis menos específico), hallando además a los OTUs 003 y 006 sin clasificar (*Unclassified*), lo que evidenciaría la ausencia de secuencias relacionadas en la base de datos usada para su asignación taxonómica (Huson *et al.*, 2007).

Los índices NSTI calculados para los consorcios lixiviantes estudiados, bordearon el valor de 0.03, el cual demuestra que se pueden predecir los metagenomas de los consorcios lixiviantes, usando genomas de referencia cercanos en un 97% tal como lo indican Langille *et al.* (2013). Los análisis de la presencia de los genes relacionados a la psicrotolerancia, en los metagenomas virtuales de los consorcios microbianos lixiviantes psicrotolerantes (CMLP), evidenciaron la presencia mayoritaria de estos en todos los OTUs que conforman los CMLP a diferencia de aquellos que codifican la sacarosa sintasa, sacarosa fosfato sintasa, familia OmpR del sistema de dos componentes, peroxirredoxina Q/BCP y la caja DeaD helicasa de RNA dependiente de ATP, que no

estuvieron presentes en el OTU identificado como *Leptothorax feidans* ; y los genes que codifican a la esteroil-CoA desaturasa, alfa-trehalosa-fosfato sintasa y la N-acetilneuraminato sintasa que estuvieron presentes sólo en este OTU, sugiriendo distintos mecanismos de psicotolerancia entre los géneros *Acidithiobacillus* sp y la especie *Leptothorax feidans* (Liljeqvist, 2012), sin embargo los genes compartidos entre todos los OTUs como aquellos que codifican a la 3-oxoacyl- [proteína portadora de acilo] sintasa II y III, familia *HlyD* de proteínas de secreción, 5-formiltetrahidrofolato ciclo-ligasa (proteína anticongelante tipo I), proteína *cbi shok* de la familia *Cbl*, liasa adenilosuccinato, adenilosuccinato sintasa, peroxirredoxina (subunidad C de la alquilhidroperóxido reductasa) y la familia Fe-Mn de la superóxido dismutasa, pueden servir de evidencia de que los roles de sensibilidad ante la variación de la temperatura, modificación de la membrana lipídica (Russell, 2008), mantenimiento de la histéresis térmica gracias a proteínas anticongelantes y la defensa ante el estrés oxidativo son estrategias compartidas y necesarias entre la especie *Leptothorax feidans* ns y el género *Acidithiobacillus* sp para desarrollar psicotolerancia (Liljeqvist *et al.* , 2015).

El análisis de genes relacionados a la oxidación de sustratos y obtención de energía mostró la presencia de todos los genes analizados en todos los OTUs, como aquellos codificantes de las subunidades de la heterodisulfuro reductasa implicada en la oxidación de compuestos de azufre inorgánicos, proteínas para la fijación de nitrógeno *Nif* y una proteína para la oxidación de azufre intracelular a diferencia de aquellos que codifican las subunidades T y U de la proteína de fijación de nitrógeno *Nif*, que estuvieron ausentes en la especie *Leptothorax feidans*, lo cual se diferencia de los hallazgos producto de la secuenciación de la cepa *Leptothorax feidans* s L3, donde se identificó la presencia del gen *NifU* con un 77% de homología al gen *NifU* de *Escherichia coli* (Parro y Moreno-Paz, 2004). Sólo se analizaron cuatro genes relacionados a la formación de

biólm , de los cuales sólo aquel que codifica la proteína de membrana externa para exportación de polisacáridos estuvo presente en todos los OTUs, mientras que aquel que codifica el regulador transcripcional de la familia *L/R* estuvo presente sólo en el género *Acidithiobacillus* sp., en el que ya es conocida la presencia de genes relacionados al *qsensg* (Valdés *et al.* , 2008). Los genes que codifican la proteína *FlgA* para la formación del anillo P en el cuerpo basal de los flagelos y la proteína G de la vía de secreción general estuvieron presentes sólo en la especie *Leptothorax feidans* , que además puede expresar distintos genes relacionados a la formación de flagelo cuando se encuentra formando *biólm* y cuando se encuentra como célula planctónica (Moreno-Paz *et al.* , 2010).

La evaluación de genes relacionados a la resistencia a metales pesados, mostró la presencia de aquel que codifica a la ATPasa exportadora de Cu^{2+} *coB* , en todos metagenomas virtuales, al regulón fosfato de respuesta para la resistencia a cobre, presente sólo en el género *Leptothorax feidans* y a la proteína de membrana de la bomba para arsénico, presente solo en el género *Acidithiobacillus* sp. La presencia de genes relacionados a la resistencia a cobre en el género *Acidithiobacillus* sp, concuerda con hallazgos anteriores, especialmente del regulon *cop*, efectuados por Navarro *et al.* (2013), a diferencia de la resistencia a arsénico que no está presente en los OTUs de *Acidithiobacillus* sp pero que ya había sido documentada por Xu *et al.* (2014). Los genes evaluados en todo el estudio fueron elegidos de acuerdo a la clasificación mostrada en el reciente estudio de Liljeqvist *et al.* (2015). Los metagenomas virtuales son útiles para la exploración de rasgos fisiológicos en organismos previamente estudiados individualmente, cuya información puede ser validada mediante la comparación con los productos de secuenciación *shg* de las muestras, como lo demostraron Okuda *et al.* (2012).

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se aislaron y caracterizaron por primera vez consorcios acidófilos psicotolerantes ferro-oxidantes y tio-oxidantes a 5°C de la provincia de Cerro de Pasco, región altoandina de la sierra central del Perú.
- ✓ Se aislaron y caracterizaron por primera vez consorcios microbianos acidófilos lixiviantes psicotolerantes de sulfuro de cobre (CuS) y sulfuro de zinc (ZnS) a 5°C, compuestos principalmente por los géneros *Acidithiobacillus* sp. y *Leptothrix* sp.
- ✓ Se caracterizaron los parámetros cinéticos de liberación de cobre (II) del consorcio microbiano lixiviante psicotolerante QuF1 para su aplicación a procesos industriales de recuperación de cobre a partir de minerales azufrados compuestos principalmente por covelita.
- ✓ Se determinó la composición y abundancia de especies en los consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes a 5°C caracterizados mediante análisis metagenómico.
- ✓ Se observó por primera vez la presencia de *Leptothrix feridans* en consorcios microbianos lixiviantes psicotolerantes a 5°C.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abanto M, Pariona N, Calderón J, Guerra G, Ramirez R, De la Cruz-Calvo F, y Ramirez P. (2013) Molecular Identification of Iron Oxidizing Bacteria Isolated from Acid Mine Drainages in Peru. *Advanced Materials Research* 825:84 – 87.

Baker Brett J. y Banfield Jillian F. (2003) Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology* 44: 139-152.

Boon M. (2001) The mechanism of 'direct' and 'indirect' bacterial oxidation of sulphide minerals. *Hydrometallurgy* 62:67–70.

COBBING, John; QUISPESIVANA, Luis; PAZ, Manuel (1996) Geología de los cuadrangulos de Ambo, Cerro de Pasco y Ondores. Boletín N° 77. Lima. INGEMMET. Serie A: Carta Geológica Nacional.

COCHILCO. (2009) Biolixiviación: Desarrollo actual y sus expectativas. Comisión Chilena del Cobre. Diciembre. http://www.cochilco.cl/descargas/estudios/tematico/innovacion/estudio_biolixiviacion.pdf

Cole J.R., Wang Q., Fish J.A., Chai B., McGarrell D. M., Sun Y., Brown C.T., Porras-Alfaro A., Kuske C.R. y Tiedje J.M. (2013) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* (41):D633-D642.

Delong EF. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:5685–5689.

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P. y Andersen G.L. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72(7): 5069-5072.

Dopson M. y Lindström E.B. (2004) Analysis of community composition during moderately thermophilic bioleaching of pyrite, arsenical pyrite, and chalcopyrite. *Microbial Ecology* 48:19–28.

Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., y Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.

Edwards K.J., Bond P.L., Gihring T.M. y Banfield J.F. (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 279:1796–1799.

Edwards R.A., Rodriguez-Brito B., Wegley L., Haynes M., Breitbart M., Peterson D.M., Saar M.O., Alexander S., Alexander Jr E.C. y Rohwer F. (2006) Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* 7:57.

Erlich, H., 1999. Past, present and future of biohydrometallurgy. In: Amils, R., Ballester, A. (Eds.), *International Biohydrometallurgy Symposium IBS-99. Part A*. Elsevier, pp. 3–12.

Fowler T.A. y Crundwell F.K. (1998) Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans* : Experiments with a controlled redox potential indicate no direct bacterial mechanism. *Applied Environmental Microbiology* 64:3570–3575.

Gurgui C. y Piel J. (2010) Metagenomic approaches to identify and isolate bioactive natural products from microbiota of marine sponges. *Metagenomics*. Humana Press p.247-64.

Haas B., Gevers D., Earl A. M., Feldgarden M., Ward D.V., Giannoukos G., Ciulla D., Tabbà D., Highlander S.K., Sodergren E., Methe B., DeSantis T.Z., The Human Microbiome Consortium, Petrosino J.F., Knight R. y Birren, B.W. (2011) Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454 pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Research* 21:490-504.

Hamady M. y Knight R. (2009) Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research* 19(7):1141–52.

Holmes D.S. y Bonnefoy V. (2006) Genetic and Bioinformatic Insights into Iron and Sulfur Oxidation Mechanisms of Bioleaching Organisms. In: Rawlings DE, Johnson B, eds. *Biomining: Practice, Theory and Microbiology*. Springer (submitted).

Huang K., Brady A., Mahurkar A., White O., Gevers D., Huttenhower C. y Segata N. (2014) MetaRef: a pan-genomic database for comparative and community microbial genomics. *Nucleic Acids Research* 42(D1):D617–24.

Huse S.M., Welch D.M., Morrison H.G., y Sogin M.L. (2010) Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environmental Microbiology* 12: 1889-1898.

Huson D.H., Auch A.F., Qi J. y Schuster S.C. (2007) MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Research* 17:377-386.

Huson D.H., Mitra S., Ruscheweyh H., Weber N. y Schuster S.C. (2011) Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. *Genome Research* 9:1552-1560.

IZARD, Jacques y RIVERA, Maria C. (2015) *Metagenomics for microbiology*. 1ra ed. EE.UU. Academic Press. 188p. ISBN: 978-0-12-410508-9

Jaramillo M.L., Abanto M., Quispe R.L., Calderón J., Del Valle L.J., Talledo M. y Ramírez P. (2012) Cloning, expression and bioinformatics analysis of ATP sulfurylase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in *Escheichia coli*. *Bioinformation*. 8(15): 695–704.

Jarvie T. (2007) Genome Sequencer System. Amplicon Sequencing. Application note N°5. February Roche Diagnostics.

Jerez C.A. (2011) Biobleaching and biomining for the industrial recovery of metals. In *Comprehensive Biotechnology*. M. Moo-Young, Ed. The Netherlands. Elsevier Vol. 3, 2nd edition, p. 717-729.

Johnson, D.B. (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 27: 307–317.

Karlin S, Mrázek J. y Campbell A.M. (1997) Compositional biases of bacterial genomes and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology* 179(12):3899–913.

Kembel S.W., Wu M., Eisen J.A. y Green J.L. (2012) Incorporating 16S Gene Copy Number Information Improves Estimates of Microbial Diversity and Abundance. *PLoS Computational Biology* 8(10): e1002743.

Kim D., Pradhan D., Chaudhury G.R., Ahn J. y Lee S. (2009) Bioleaching of complex sulfides concentrate and correlation of leaching parameters using multivariate data analysis technique. *Materials Transactions* 50:2318-2322.

Kimura S, Bryan C.G., Hallberg K.B. y Johnson D.B. (2011) Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environmental Microbiology* 13: 2092-2104.

Kinnunen P.H.M y Puhakka J.A. (2004) Chloride-promoted leaching of chalcopyrite concentrate by biologically produced ferric ion. *Journal of Chemical Technology* 79:830–834.

Kuang J., Huang L.N., Chen L.X., Hua Z.S., Li S.J., Hu M., Li J.T. y Shu W.S. (2013) Contemporary environmental variation determines microbial diversity patterns in acid mine drainage. *The ISME Journal* 7(5):1038-1050.

Kunin V., Engelbrekton A., Ochman H., y Hugenholtz P. (2010) Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* 12:118–123.

Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. En: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt E. y Goodfellow M., eds. John Wiley e hijos, New York, NY, pp. 115-175.

Langille M. G.I., Zaneveld J., Caporaso J. G., McDonald D., Knights D., Reyes, J., Clemente J. C., Burkepila D. E., Vega Thurber R. L., Knight R., Beiko R. G., y Huttenhower C. (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology* 1-10. 8.

Liljeqvist, María (2012) Genomics, physiology and applications of cold tolerant acidophiles. Umeå University, Suecia. Department of Chemistry Printing Service. 73p. ISBN: 978-91-7459-472-0.

Liljeqvist M., Ossandon F.J., Gonzáles C., Rajan S., Stell A., Valdes J. Holmes D.S., y Dopson M. (2015) Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream. *FEMS Microbiology Ecology* 91:fiv011.

LUFIN CORREA, Luis Alejandro. (2007) “Desarrollo de un modelo computacional para el proceso de lixiviación de sulfuros de cobre en pilas” Asesor: Tomas Vargas Valero. Tesis Grado de Magister. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago de Chile.

Mande S.S., Mohammed M.H. y Ghosh T.S. (2012) Classification of metagenomic sequences: methods and challenges. *Briefings in Bioinformatics* 13(6): 669-681.

Mardis, E.R. (2008) Next generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9:387-402.

Marshall M.M., Amos R.N., Henrich V.C. y Rublee P.A. (2008) Developing SSU rDNA metagenomic profiles of aquatic microbial communities for environmental assessments. *Ecological Indicators* 8:442–453.

McDonald D., Clemente J. C., Kuczynski J., Rideout J. R., Stombaugh J., Wendel D., Wilke A., Huse S., Hufnagle J., Meyer F., Knight R. y Caporaso J. G. (2012) The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. *GigaScience* 1:7

McMurdie P.J., y S. Holmes. (2012) Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS ONE 8(4): e61217.

MENADIER STAVELOT, Maurice Andre. (2009) “Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas”. Asesor: Tomas Vargas Valero. Memoria para optar al título de ingeniero civil químico. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Santiago de Chile.

Metzker M. L. (2010) Sequencing technologies – The next generation. Nature Reviews Genetics 11:31-46.

Meyer F., Paarmann D., D’Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J. y Edwards R.A. (2008) The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. BMC Bioinformatics 9:386.

Miller S.R., Strong A.L., Jones K.L. y Ungerer M.C. (2009) Barcoded pyrosequencing reveals shared bacterial community properties along the temperature gradients of two alkaline hot springs in Yellowstone National Park. Applied Environmental Microbiology 75:4565–4572.

Ministerio de energía y minas. (2012) Estadística de la producción de los principales productos metálicos a nivel nacional durante el año 2012. En: Estadísticas, categoría Producción Minera [En línea]. [Citado 10 de noviembre de 2014]. Disponible en internet: http://www.minem.gob.pe/_estadistica.php?idSector=1&idEstadistica=7332

Ministerio de Energía y Minas. (2006) Inventario de Pasivos Ambientales Mineros. En: Informes, sección Minería [En línea]. [Citado 4 de agosto de 2015]. Disponible en internet: <http://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/Mineria/PUBLICACIONES/INFORMES/PASIVOS/index.htm>

Moreno-Paz M., Gómez M.J., Arcas A., y Parro V. (2010) Environmental transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptothrix* spp. in their natural microbial community. BMC Genomics 11:404.

Navarro C.A., Von Bernath D. y Jerez C.A. (2013) Heavy Metal Resistance Strategies of Acidophilic Bacteria and Their Acquisition: Importance for Biomining and Bioremediation. Biological Research 46(4) ISSN 0716-9760.

Okuda S., Tsuchiya Y., Kiriya Ch., Masumi I. y Morisaki H. (2012) Virtual metagenome reconstruction from 16S rRNA gene sequences. Nature Communications 3 1203

Parro V. y Moreno-Paz M. (2004) Nitrogen fixation in acidophile iron-oxidizing bacteria: The nif regulon of *Leptothrix ferrians*. Research in microbiology 155: 703-709

Pradhan N., Nathsarma K.C., Srinivasa Rao K., Sukla L.B. y Mishra B.K. (2008) Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. Minerals Engineering (21): 355-365.

Preheim S.P., Perrotta A.R., y Martin-Platero A.M. (2013) Distribution-based clustering: using ecology to refine the operational taxonomic unit. Applied Environmental Microbiology 79 (21):6593–603.

Quince C., Lanzen A., Curtis T.P., Davenport R.J., Hall N., Head I.M., Read L.F. y Sloan W.T. (2009) Noise and the accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* 6:639–641.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J. y Glöckner F.L. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acid Research* 41:D590-D596.

Ramirez P., Toledo H., Guiliani N. y Jerez C.A. (2002) An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferroplans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Applied Environmental Microbiology* 68(4):1837-1845.

Rosen G.L., Reichenberger E.R. y Rosenfeld A.M. (2011) NBC: the Naïve Bayes classification tool webserver for taxonomic classification of metagenomic reads. *Bioinformatics* 27:127-129.

Russell N.J. (2008) Membrane components and cold sensing. En: Margesin R, Schinner F., Marx J.C., et al. (eds). *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology*. Berlin: Springer-Verlag 177–90.

Schippers A. y Sand W. (1999) Bacterial leaching of metal sulfides processes by indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied Environmental Microbiology* 65:319–25.

Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewsky R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thalinger G.G., Van Horn D.J. y Weber C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 75: 7537–7541.

Schloss P.D., Gevers D. y Westcott S.L. (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. PLoS ONE 6(12):e27310.

SENAMHI (2004) Boletín Meteorológico e Hidrológico del Perú. Año IV, N°01.

Segata N. y Huttenhower C. (2011) Toward an efficient method of identifying core genes for evolutionary and functional microbial phylogenies. PloS One 6(9):e24704.

Shi S.Y., Fang Z.H. y Ni J.R. (2006) Comparative study on the bioleaching of zinc sulphides. Process Biochemistry 41:438–446

Tan, Gui-Liang, Wen-Sheng Shu, Kevin B Hallberg, Fang Li, Chong-Yu Lan, Wen-Hua Zhou, y Li-Nan Huang. (2008) Culturable and Molecular Phylogenetic Diversity of Microorganisms in an Open-Dumped, Extremely Acidic Pb/Zn Mine Tailings. Extremophiles : life under extreme conditions 12(5): 657–64.

Tributsch, H. y Bennett, J.C. (1981a) Semiconductor electrochemical aspects of bacterial leaching: Part 1. Oxidation of metals sulphides with large energy gaps. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 31:565–577.

Tributsch, H. y Bennett, J.C. (1981b) Semiconductor electrochemical aspects of bacterial leaching: Part 2. Survey of rate controlling sulphides properties. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 31:627–635.

Torma, A.E. y Sakaguchi, H. (1978) Relation between the solubility product and the rate of metal sulfide oxidation by Thiobacillus ferrooxidans. Journal of Fermentation Technology 56:173–178.

Valdés J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R., Tettelin H., Blake II R., Eisen J.A. y Holmes D.S. (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9:597.

Wang Q., Garrity G., Tiedje J., y Cole J. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environmental Microbiology* 73: 5261–5267.

Ward D.M., Ferris M.J., Nold S.C. y Bateson M.M. (1998) A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62:1353–1370.

Xu Y., Yang M., Yao T. y Xiong H. (2014) Isolation, identification and arsenic-resistance of *Acidithiobacillus ferrooxidans* HX3 producing schwertmannite. *Journal of Environmental Sciences* 26(7): 1463-70.

Zaneveld J.R.R. y Thurber R.L.V. (2014) Hidden state prediction: a modification of classic ancestral state reconstruction algorithms helps unravel complex symbioses. *Frontiers in Microbiology* 5:431.

10. ANEXOS

ANEXO 01: Reporte de la calidad de las librerías de amplicones construidas por MACROGEN y criterios de calidad.

Tabla 22. Reporte de la calidad de las librerías de amplicones construidas por MACROGEN

#	Library Name	Library Type	Conc. (moleculas/ul)	Size (bp)	Result
1	QF1	Amplicon library(Lib-L)	1.15 X 10 ^ 11	600	Pass
2	QF3	Amplicon library(Lib-L)	1.21 X 10 ^ 11	600	Pass
3	QS3	Amplicon library(Lib-L)	1.19 X 10 ^ 11	600	Pass
4	QF4	Amplicon library(Lib-L)	1.17 X 10 ^ 11	600	Pass
5	QF5	Amplicon library(Lib-L)	1.17 X 10 ^ 11	600	Pass
6	SBF1	Amplicon library(Lib-L)	1.16 X 10 ^ 11	600	Pass

Platform	Requested library type		QC Criteria			
			Conc (moleculas/μl)	Conc (nM)	Conc (ng/μl)	Size (bp)
FLX	shotgun library	RL library (for GS FLX PLUS)(>1.5kb)	1.46*10^8			1400~1800
FLX	shotgun library	RL library (for GS FLX titanium)	1.46*10^8			600~900
FLX	shotgun library	RL library (low molecular weight DNA)	1.46*10^8			
FLX	Amplicon library	Amplicon library(Lib-L)	1.0*10^9			
FLX	Amplicon library	Amplicon library(Lib-A, A & B bead)	1.0*10^9			
FLX	Amplicon library	Amplicon library(Lib-A, A bead only)	1.0*10^9			
FLX	Amplicon library	Amplicon library(Lib-A, B bead only)	1.0*10^9			
FLX	Mate paired end library	Mate paired End library (3kb)			>0.2ng/ul	500~700
FLX	Mate paired end library	Mate paired End library (8kb)			>0.2ng/ul	500~700
FLX	Mate paired end library	Mate paired End library (20kb)			>0.2ng/ul	500~700
FLX	Mate paired end library	Mate paired End library (other size)			>0.2ng/ul	500~700

Figura 27. Criterios de calidad de las librerías de amplicones admitidas por MACROGEN para su posterior secuenciamiento por el sistema GS FLX Plus 454 Pyrosequencing, el presente proyecto se encuentra incluido en el criterio remarcado por el recuadro rojo.

ANEXO 02: Recorte y evaluación inicial de los reads desarrollado por el RDP Pipeline.

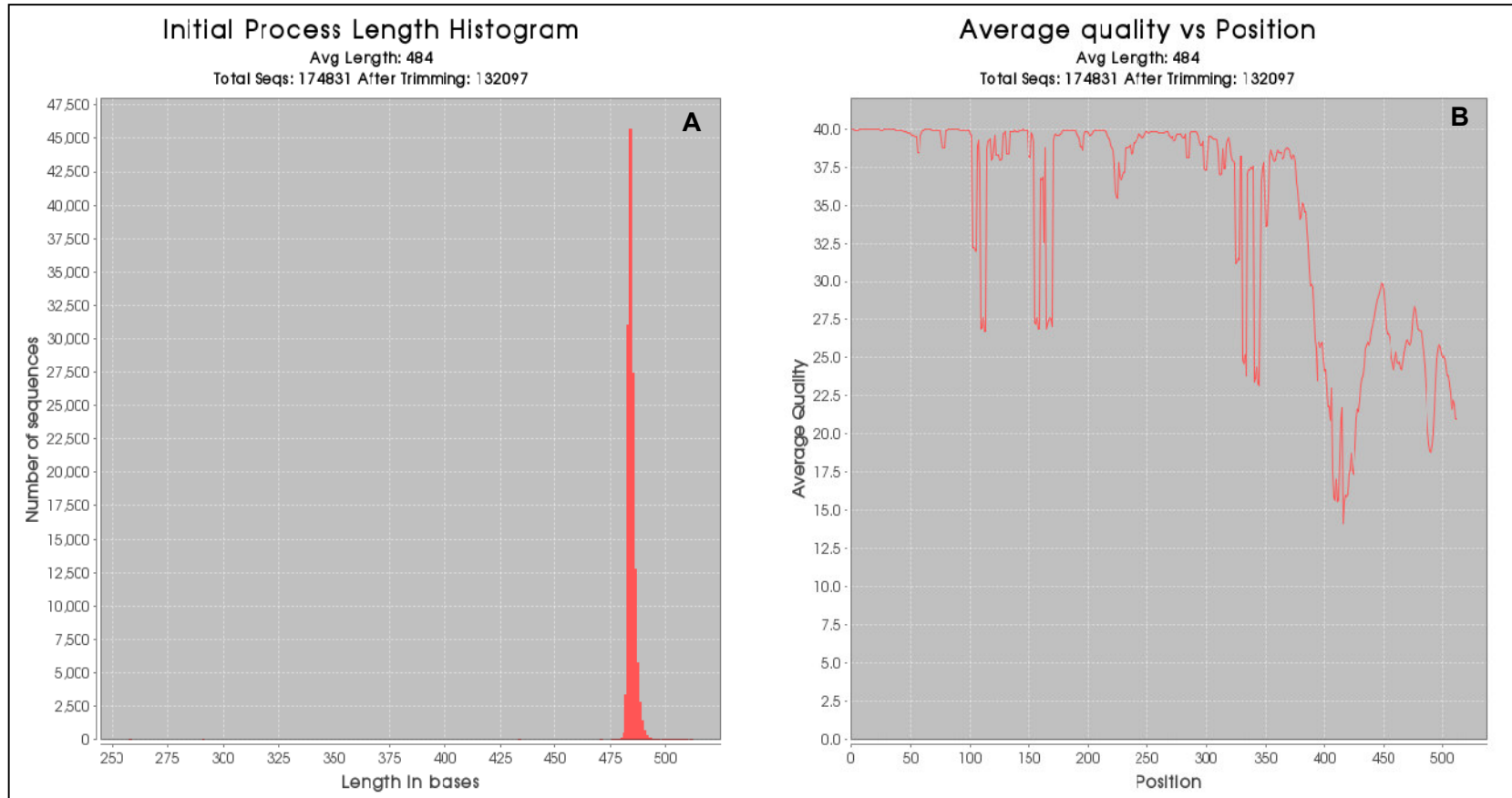


Figura 28. Procesamiento inicial llevado a cabo por la plataforma en línea del RDP Pipeline . A: Histogramas denotando la longitud promedio de los reads analizados, B: calidad promedio de los nucleótidos de acuerdo a su posición en los reads .

ANEXO 03: Medio de cultivo empleado para la obtención de consorcios y la posterior evaluación de su capacidad biolixivante.

Medio mínimo:

MgSO ₄ .7H ₂ O	0.4 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 g/L
KH ₂ PO ₄ .3H ₂ O	0.04 g/L
Agua destilada	1 L

Para consorcios ferro-oxidantes: Medio mínimo + FeSO₄.7H₂O (33,3 g/L) y ajustar el pH a 1.85 constituyendo el medio modificado 9K (Ramirez *etal* ., 2002).

Para consorcios tio-oxidantes: Medio mínimo + perlas de azufre al 1% (p/v) y ajustar pH a 2.5