

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS ARDRA Y COMPARACIÓN *IN SÍLICO* DE MICROORGANISMOS NATIVOS UTILIZADOS EN PROCESOS DE BIOLIXIVIACIÓN DE MANGANESO REFRACTARIO

David Enrique Zazueta Álvarez^a, Hiram Medrano Roldan^a, Walfred Rosas Flores^a, Damian Reyes Jáquez^a, Juan Antonio Rojas Contreras^a,

^aDepartamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Durango, Felipe Pescador 1830 Ote. Col. Nueva Vizcaya, Durango, Dgo. México C.P. 34080, México.

✉ 04040561@itdurango.edu.mx

Palabras clave: *Biolixiviación, Microorganismos nativos, ARDRA.*

Introducción

La biolixiviación es un proceso bio-hidrometalúrgico, especializado para la recuperación de metales a partir de minerales donde los microorganismos pueden mejorar en gran medida la solubilización de materiales refractarios o metales pesados que impidan el 100 % de la extracción (1,2). Los ambientes donde se llevan a cabo estos procesos se caracterizan por las altas concentraciones de metales, temperaturas elevadas y altos niveles de acidez, por lo que la presencia de microorganismos capaces de sobrevivir a pesar de las circunstancias extremas del medio es de gran interés respecto a la selectividad de los minerales que se buscan recuperar (3). Para esto uno de los métodos que se pueden utilizar es la técnica ARDRA por sus siglas en inglés (Amplified rDNA Restriction Analysis) siendo una herramienta adecuada para diferenciar los productos de PCR posterior a la digestión con enzimas. De esta manera los perfiles electroforéticos que resultan pueden determinar a qué especies pertenecen, con la característica de que se cuente con el número y tipo adecuado de enzimas de restricción (4, 5). La identificación se realiza al comparar los perfiles de bandas experimentales con los obtenidos mediante un análisis *in silico*, determinando la variación de especies.

Metodología

Se tomaron muestras de las zonas húmedas de la presa de residuos de un complejo minero ubicado al noreste de Torreón, Coahuila, México. Medio de cultivo: Las cepas bacterianas nativas se diseminaron en medio 9K. La extracción de ADN total: Se realizó mediante kit formulado (PowerSoil, MO BIO). La amplificación del gen 16S ribosomal: Se realizó mediante PCR, en donde se programaron 32 ciclos de la siguiente manera: Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 40 segundos; Alineamiento de los iniciadores a 55 °C durante 1 minuto; Elongación del fragmento a 72 °C durante 2 minutos (T100TM Thermal Cycler, BIO-RAD). Se utilizaron los primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Se realizó la clonación del gen 16S ribosomal en un vector comercial (pGEM-TEasy Vector). Análisis ARDRA: Se llevó a cabo mediante la enzima de restricción HhaI, para posteriormente separar los productos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con EtBr. (95 Voltios, 90 minutos en buffer TBE). Análisis *in silico*: Se analizó el patrón de bandas del gen 16S ribosomal de bacterias características de este tipo de ambientes y/o procesos de biolixiviación. Las muestras obtenidas de la extracción de ADN plasmídico que mostraron perfiles de bandeado diferentes se

analizaron mediante secuenciación Sanger en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

Resultados

Posterior a la restricción con la enzima HhaI el patrón de bandas que resultó al revelarlo en un gel de agarosa al 2 % (Figura 1) se comparó con el análisis *in silico* (Figura 2), que fueron corroborados por secuenciación.



Figura 1. Análisis ARDRA de distintas clonas (longitud total del fragmento ARNr 16S 1500 pb) al 1 %.

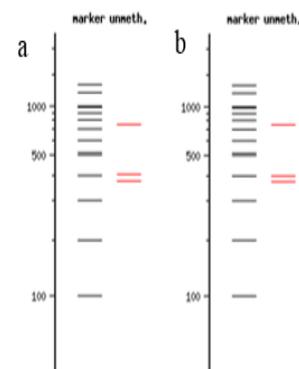


Figura 2. Análisis *in silico* para *Leptospirillum ferrooxidans* (a) y *Leptospirillum ferriphilum* (b) al utilizar la enzima de restricción HhaI al 1 %.

Conclusiones

Se pudieron identificar en este trabajo miembros de los grupos I y II del género *Leptospirillum* (*L. ferrooxidans* y *L. ferriphilum* respectivamente), característicos de los procesos de biolixiviación. Además, se demuestra que la técnica ARDRA y una comparación *in silico* de los patrones de bandeado puede ser útil para diferenciar géneros de microorganismos utilizados en procesos de biolixiviación, sin embargo, es complicado la diferenciación de especies muy emparentadas.

Bibliografía

1. Castro, C, & Donati, E (2016) *Hydrometallurgy*, 162, 49-56.
2. Zhao, H, *et al.* (2017) *Miner. Eng.*, 109, 153-161.
3. Dopson *et al.* (2014) *Front Microbiol*, 5, 157.
4. Malik, S, *et al.* (2008) *Environ Int*, 34, 265-276.
5. Sklarz, M, *et al.* (2009) *Antonie van Leeuwenhoek*, 96, 659-664.