

Comunidades microbianas extremófilas en el sistema geotermal del volcán Copahue y sus aplicaciones biotecnológicas

por Laura Lavalle¹, Alejandra Giaveno², Patricia Chiacchiarini¹, M. Sofía Urbieta², Cintia Cordero¹, y Edgardo Donati²

¹ IDEPA (CONICET- UNCo), Dpto. Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, (8300) Neuquén, Argentina.

² CINDEFI (CONICET-UNLP), Fac. Cs. Exactas (UNLP), La Plata, Argentina



Figura 1: Toma de muestras en Las Maquinitas

El sistema geotermal del volcán Copahue (situado a los 37°45'S y 71°18'O, a 2977 msnm), se encuentra ubicado al noroeste de la Provincia del Neuquén, Argentina. A partir de este volcán andesítico, que presenta una pequeña laguna en su cráter y dos fuentes termales ácidas, nace el río Agrio Superior, que descarga en el lago Caviahue, y posteriormente alimenta al río Agrio Inferior. El área presenta una influencia antropogénica debido a la localización de dos pequeñas villas, Caviahue y Copahue, que atraen a muchos turistas que disfrutan de las aguas y lodos terapéuticos termales y de los deportes invernales. Dicha zona se encuentra dentro del Parque Provincial Caviahue-Copahue, Provincia del Neuquén, Argentina.

En las últimas décadas, científicos de todo el mundo han dedicado mucho tiempo y esfuerzo a estudiar diferentes regiones del planeta cuyas condiciones ambientales (temperatura, presión, pH, salinidad) son tan "extremas" desde el punto de vista humano que resultarían incompatibles para el desarrollo de seres vivos superiores. Sin embargo, se ha demostrado que muchos de estos ambientes inhóspitos y desolados están colonizados por gran cantidad de microorganismos a los cuales se los ha denominado "extremófilos"

por haber desarrollado estrategias metabólicas para sobrevivir a tan severas condiciones ambientales. Dentro del grupo de extremófilos hay microorganismos que viven y se reproducen en ambientes de elevada temperatura (termófilos) mientras que otros se desarrollan en ambientes fríos, próximos al punto de congelación del agua (psicrófilos). Existen los que toleran valores de pH muy bajos (acidófilos) como elevados (alcalófilos) y otros que sobreviven en ambientes de gran salinidad (halófilos) o soportan altas presiones (barófilos).

Las regiones aledañas a los volcanes resultan particularmente atractivas para su estudio porque ofrecen la posibilidad de tener al alcance de la mano variados ambientes extremos los cuales, en muchos casos, se asemejan o reproducen las condiciones ambientales en las que se desarrolló la vida en los orígenes de la Tierra.

Desde el año 1997, nuestro grupo de investigación ha realizado muestreos periódicos en el sistema geotermal del volcán Copahue, tanto en los ríos Agrio Superior y Agrio Inferior, en la laguna del cráter del volcán, en el lago Caviahue así como también en las diferentes fuentes termales y emanaciones en las villas Copahue, Las Maquinitas y Las Máquinas (Figura 1).

La finalidad de nuestros trabajos de investigación ha sido la identificación y caracterización de microorganismos que comparten este hábitat en condiciones ácidas extremas y en un variado rango de temperaturas, utilizando técnicas tradicionales de microbiología y de biología molecular.

¿Qué importancia tienen los microorganismos que habitan lugares incompatibles con la vida humana?

La importancia de los extremófilos se centra en el papel que juegan en procesos biotecnológicos, como por ejemplo:

- la biominería, que engloba un conjunto de técnicas que propician la extracción de metales mediante la actividad oxidativa de microorganismos específicos. Como ejemplo de estos procesos se puede mencionar la solubilización de sulfuros metálicos y la subsiguiente recuperación de los metales de interés comercial llevada a cabo por microorganismos oxidantes del hierro y azufre.
- en la recuperación del medio ambiente a través de procesos que se conocen en conjunto

como biorremediación donde los microorganismos pueden contribuir, por ejemplo, a la eliminación de metales pesados mediante diferentes mecanismos de acción (bioacumulación, biosorción, bioprecipitación, etc.)

- en la producción de extremozimas de interés industrial, como lo fue el hallazgo de la enzima Taq polimerasa (obtenida a partir del microorganismo termófilo *Thermus aquaticus*) que revolucionó la ciencia moderna desde el desarrollo de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), ampliamente utilizada en investigación biológica o forense y en diagnóstico médico.

De esta forma, los microorganismos extremófilos constituyen una atractiva fuente potencial en múltiples aplicaciones industriales.

¿Qué tipo de ensayos se llevaron a cabo y cuáles fueron los principales logros alcanzados en el marco de los proyectos de investigación que hemos realizado en el sistema geotermal del volcán Copahue?

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

En primer lugar se realizó un exhaustivo muestreo del área. Los análisis fisicoquímicos de las muestras tomadas en diferentes puntos del ecosistema permitieron conocer las características del ambiente en el que se encontraban los diferentes grupos microbianos de cada lugar. En la Tabla 1 se presentan como ejemplo los resultados obtenidos de los puntos de muestreo en la última campaña realizada.

Los valores de pH indican extrema acidez, entre 0,8 y 3,7 mientras que la temperatura medida a campo presenta un amplio rango compatible con el crecimiento de microorganismos acidófilos, tanto mesófilos como termófilos moderados y extremos, según el caso. Por otra parte puede apreciarse cómo la concentración de elementos metálicos se incrementa a medida que nos acercamos a la naciente del río Agrio haciéndose cada vez más extremo el ambiente en cuanto a la presión osmótica, pH y temperatura que deben soportar los microorganismos que colonicen el lugar.

CARACTERIZACIÓN MICROBIANA

Una parte de los estudios realizados por nuestro grupo se llevó a cabo aplicando técnicas de microbiología clásica mediante el cultivo de muestras naturales en medios (sólidos o líquidos) de enriquecimiento específicos y el posterior aislamiento de especies. A partir de estos ensayos

fue de energía para sus funciones vitales.

Específicamente, hemos aislado y caracterizado fisiológica y molecularmente especies oxidantes del hierro y del azufre. Algunas cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* fueron aisladas del río Agrio Superior, cercano a la descarga en el lago Caviahue,

	pH	T (°C)	Cond. (mS cm ⁻¹)	Fe	K	Mg	Ca	Na	Mn
NA Naciente del Agrio	0,8	70	65,1	816,1	485,0	552,2	13,2	867,4	18,8
VA1 Vertiente Agrio Sur	0,8	45	63,1	834,6	504,9	696,2	14,8	911,7	21,2
VA2 Vertiente Agrio Norte	1,0	42	42,0	537,8	151,6	341,7	17,1	364,9	10,2
CG Cascada del Gigante 1	1,9	10	24,3	510,0	147,5	281,2	13,0	326,0	11,3
CC Cascada de la Culebra 1	1,9	10	24,5	447,4	136,0	239,7	14,9	282,6	9,7
CV Cascada de la Virgen 1	2,3	13	23,5	450,6	134,5	266,3	15,0	282,6	10,1
LC Lago Caviahue 2	3,1	16	1,17	21,3	4,4	18,1	3,2	14,0	0,7
PG Puente Gendarmería 1	3,3	16	0,72	2,7	4,6	11,0	1,6	11,6	0,4
SA Salto del Agrio 1	3,7	16	0,35	Nd	2,9	7,7	2,3	7,5	0,1
LS Laguna Sulfurosa 3	3,0	55	1,12	3,2	12,6	4,8	5,8	25,2	0,1
LVE Laguna Verde Este	2,4	28	2,60	6,6	8,7	1,8	3,2	17,3	0,1
B9 Baño 9 2	2,0	50	3,38	7,7	5,4	2,2	0,8	12,6	0,1
AL Agua del Limón 3	2,0	55	5,10	31,4	11,1	1,5	2,3	23,2	0,1
LMI Las Maquinitas 2	2,5	85	8,60	43,2	9,7	4,4	3,2	26,4	0,7
LMA Las Máquinas 1	1,8	39	3,81	10,6	5,7	8,3	2,8	15	0,2

Tabla 1. Características de muestras de aguas en distintos puntos de muestreo. La concentración de metales está expresada en ppm. (Nd: No determinado)

fue posible obtener diferentes microorganismos denominados "cultivables" por la factibilidad de crecer "in vitro", algunos de los cuales pudieron ser identificados y utilizados posteriormente para evaluar su potencial biotecnológico.

La caracterización microbiana del área de muestreo reveló una gran biodiversidad de microorganismos acidófilos representada por bacterias quimiolitótrofas, arqueas, levaduras y hongos filamentosos. Cabe consignar que los organismos quimiolitótrofos son capaces de captar la energía que está disponible en compuestos inorgánicos (ej. So, Fe(II), Fe(III), H₂, H₂S, etc.). Si pueden utilizar CO₂ como única fuente de carbono se denominan autótrofos (quimiolitóautótrofos) mientras que si requieren compuestos orgánicos como fuente de carbono serán heterótrofos (quimiolitoheterótrofos). Finalmente, los organismos fotótrofos, como las plantas, utilizan a la luz solar como

y otras en el río Agrio Inferior (puntos de muestreo PG y SA) (Lavalle y col., 2005). Mientras que cepas de *Acidithiobacillus thiooxidans* fueron aisladas sobre el río Agrio Superior únicamente. Cepas de *Leptospirillum ferrooxidans* fueron aisladas de los puntos denominados CC, LC, PG y SA y cepas de *Acidithiobacillus caldus* en B9, AL y LMI (Chiacchiarini y col., 2010).

Heterótrofos mesófilos y termófilos moderados crecieron en medio de cultivos sólidos, especialmente diseñados de los sitios de muestreo VA1, VA2, LVE, B9, AL, LMI y LMA. Las colonias eran cremosas, de aspecto gelatinoso y brillante y de variadas morfologías (Figura 2).

Por otro lado, bacterias sulfato reductoras fueron detectadas a 30 y 45 °C en LMA, LMI y B9.

Entre las arqueas detectadas en el parque provincial Copahue se destaca una cepa perteneciente al género

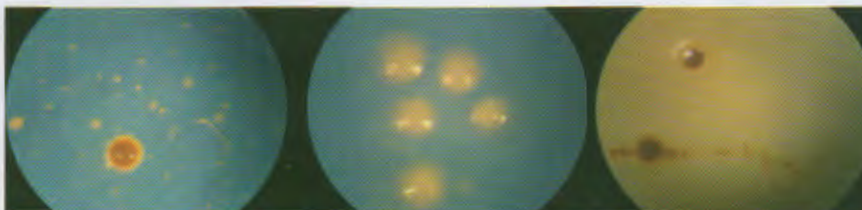


Figura 2. Colonias de acidófilos crecidas sobre medio sólido. Se puede observar en algunas colonias la presencia de compuestos oxidados de hierro.

Acidianus la cual fue aislada del río Agrio Superior (NA, VA1 y VA2) y del campo geotermal Copahue (B9, LMI y LMa). Ésta (Figura 3) no ha sido descrita previamente en ningún sistema similar y posee propiedades metabólicas muy versátiles que la convierten en excelente candidata para ser utilizada en procesos biotecnológicos, tanto en el campo de la minería como otros de interés industrial (Giaveno, 2010).

Adicionalmente se aislaron y caracterizaron hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*; variadas cepas de levaduras (*Cryptococcus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporidiobolus salmonicolor*) prevalecieron en las muestras provenientes de CC, CV, B9 y SA.

Es sabido que el porcentaje de células que se pueden cultivar, respecto del total de células existentes en un ecosistema, es muy pequeño, no supera el 1% en la mayoría de los casos (Amman y col., 1995).

El uso de técnicas de biología molecular, independientes del cultivo, para la detección e identificación de microorganismo nos permitieron ampliar el conocimiento de la biodiversidad en este ambiente extremo. Empleando técnicas moleculares tales como hibridación fluorescente in situ (FISH), clonado del gen 16SrRNA y secuenciación se pudo detectar

la presencia de *Acidithiobacillus albertensis* (oxidante del azufre), termófilos moderados (géneros *Alicyclobacillus* y *Sulfobacillus*), oxidante del hierro estricto (*Ferri-microbium*) y arqueas del género *Ferroplasma*. Otras especies no cultivables fueron encontradas y podría tratarse de nuevas especies no reportadas aún (Urbieta y col., 2012).

¿Qué tipo de aplicaciones biotecnológicas se ensayaron con los microorganismos provenientes del sistema geotermal del volcán Copahue?

BIOlixiviación Y BIOOXIDACIÓN DE MINERALES REGIONALES

Desde hace más de medio siglo se conoce la existencia de comunidades microbianas que contribuyen a la extracción de metales en el campo de la minería, pero en las últimas décadas se ha incrementado notablemente el número de operaciones comerciales biotecnológicas para la explotación de este tipo de minerales. Los procesos biotecnológicos utilizados pueden ser agrupados de acuerdo con dos propósitos distintos: los que producen la conversión de sulfuros (u óxidos) metálicos insolubles en sulfatos solubles en agua (biolixiviación) o los utilizados como

pre-tratamientos para atacar matrices minerales y permitir que otros agentes lixiviantes químicos pueden alcanzar y solubilizar los metales de interés (biooxidación).

Con la finalidad de estudiar los procesos antes mencionados utilizando minerales de la Provincia del Neuquén se seleccionaron algunos de los microorganismos aislados o consorcios nativos. Específicamente se evaluó la biolixiviación de un mineral polimetálico con alto contenido de sulfuro de cinc proveniente del yacimiento La Resbalosa. El consorcio termófilo constituido por arqueas del género *Acidianus* y bacterias no identificadas permitió extraer un 40% más de cinc que los controles estériles (Giaveno y Donati, 2007). Adicionalmente, se comprobó la incidencia positiva sobre biorrecuperación de metales (Zn, Cu) del yacimiento La Silvita cuando se usaron consorcios conformados simultáneamente por microorganismos heterótrofos y autótrofos (Chiacchiarini y col., 2012). Por otra parte, se realizaron diferentes ensayos de biooxidación de minerales del distrito minero Andacollo con la finalidad de aumentar la eficiencia en la recuperación de oro. Se utilizaron cultivos mesófilos y termófilos siguiendo diferentes protocolos y, en todos los casos, los microorganismos provenientes del sistema

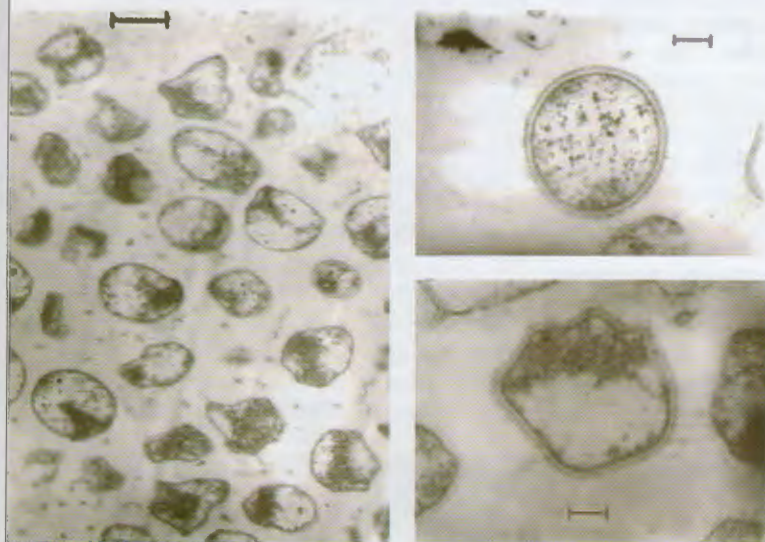


Figura 3: Imágenes de microscopías electrónicas de transmisión (TEM) de un cultivo de células del género *Acidianus* aisladas de Las Maquinitas, sistema geotermal Copahue, Argentina. Se puede apreciar en detalle la membrana celular típica de arqueas. (Giaveno, 2010).

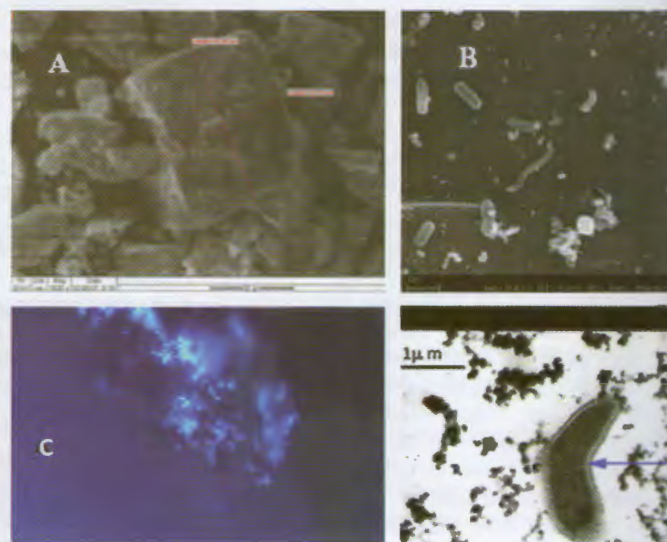


Figura 4: A) Micrografía electrónica de barrido de una muestra de mineral de Andacollo, Provincia del Neuquén, conteniendo pirita. B) Consorcio microbiano obtenido de un pozo termal de Las Maquinitas C) Partícula de mineral colonizada por microorganismos extraída de un ensayo de Biolixiviación D) Micrografía de transmisión electrónica (TEM) de una célula de arquea.

geotermal Copahue fueron eficientes, propiciando un menor consumo de cianuro y una mayor recuperación de oro respecto de los controles estériles (Giaveno y col., 2009) (Figura 4).

BIORREMEDIACIÓN

Desde hace años se han propuesto diferentes métodos para la descontaminación y recuperación de metales pesados del ambiente. Algunos de ellos se basan en el uso de microorganismos. Una cepa de *A. thiooxidans* aislada del río Agrío, denominada AtAgri06, mostró ser una eficiente productora de ácido sulfúrico por lo cual fue utilizada en la biolixiviación de lodos municipales, provenientes de la Planta de Tratamiento de efluentes del Parque Industrial de Neuquén, para remediar la contaminación con metales pesados (Chiacchiarini y col., 2010).

Otros microorganismos, como es el caso de las levaduras, son considerados potenciales biorremediadores. Diferentes especies de levaduras aisladas a partir de muestras de aguas del río Agrío y otras surgentes fueron estudiadas con el fin de evaluar su capacidad de crecimiento a distintas concentraciones de metales pesados, níquel, cadmio, zinc y cobre. La levadura pigmentada (Agrío 16), identificada por métodos fisiológicos y moleculares como perteneciente a la especie *Rhodotorula mucilaginosa*, presentó la mayor tolerancia. En ensayos posteriores se demostró la capacidad de esta cepa para capturar metales pesados a partir de soluciones diluidas por biosorción y bioacumulación (Lavalle y col., 2007) (Figura 5).

Uno de los temas más discutidos cuando se trata de evaluar un proyecto minero es la posible generación de drenajes ácidos de mina (DAM). Este proceso ocurre cuando se exponen al aire minerales sulfurados que antes estaban enterrados. La oxidación de los sulfuros implica producción de protones y la consecuente disminución del pH del sistema. Este incremento en la acidez del ambiente favorece la movilización de

metales pesados, los cuales pueden ser transportados hasta los cursos de agua, donde además se incrementa la concentración de sulfatos y otros aniones superando muchas veces los límites permitidos para diferentes aplicaciones (consumo, riego, industria, etc.). La generación de DAM a menudo se ve favorecida por la presencia de microorganismos acidófilos oxidantes del hierro y del azufre. La mejor manera de prevenir y/o controlar este problema ambiental es estudiando tanto los mecanismos que lo generan como las posibles interacciones que surjan del contacto entre los minerales y los microorganismos presentes. Es allí donde nuestro grupo ha contribuido al conocimiento del tema ya que se estudiaron sistemas modelo utilizando sulfuros de hierro (troilita) y consorcios microbianos constituidos por bacterias y arqueas provenientes del sistema geotermal Copahue. (Giaveno y col., 2011).

CONCLUSIONES

La gran diversidad de microorganismos encontrada es útil para comprender la composición de las comunidades microbianas. Además, las exitosas aplicaciones llevadas a cabo usando algunas de las cepas y consorcios aislados a escala de laboratorio, hacen del sistema geotermal Copahue un área de gran interés como fuente de microorganismos aplicables en importantes procesos biotecnológicos, como la recuperación de metales y la remediación de sitios contaminados con metales pesados, y como también en el desarrollo de nuevas tecnologías. Los resultados alcanzados son alentadores e implican un desafío para continuar estas investigaciones.

Referencias

- Amann, R. I.; Ludwig, W.; Scliefer, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Mol Biol Rev* 59:143-169, 1995.
- Chiacchiarini, P.; Lavalle, L.; Giaveno, A.; Donati, E. First assessment of acidophilic microorganisms from geothermal Copahue-Caviahue system. *Biotechnological Applications. Hydrometallurgy* 104, 334-341, 2010.
- Chiacchiarini, P.; Lavalle, L.; Giaveno, A.; Donati, E. Biorecuperación de zinc a partir de un mineral sulfurado de baja ley del yacimiento La Silvita, Neuquén. En el Libro de las XI Jornadas Argentinas De Tratamiento De Minerales, 2012., 307-312. ISBN 978-987-604-311-3.
- Giaveno, A. Biolixiviación y biooxidación de minerales utilizando cepas nativas de capacidad termofílica. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata-Argentina. 2010
- Giaveno, A.; Chiacchiarini, P.; Cordero, C.; Lavalle, L.; Huergo, J.; Donati, E. Oxidative capacity of native strains from Copahue geothermal system in the pretreatment of a gold sulfide ore. *Advanced Materials Research Vols. 71-73*, 473-476, 2009.
- Giaveno, A.; Donati, E. Bioleaching of a zinc sulfide ore by thermophilic consortia isolated from Copahue Volcano. *Advanced Materials Research* 20-21, 79-82, 2007.
- Giaveno, A.; Pettinari, G.; González Toril, E.; Aguilera, A.; Urbieto, S.; Donati, E. The influence of two thermophilic consortia on troilite (FeS) dissolution. *Hydrometallurgy*, 106. 19-25, 2011.
- Lavalle, L.; Chiacchiarini, P.; Pogliani, C.; Donati, E. Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina. *Process Biochemistry* 40, p. 1095-1099, 2005.
- Lavalle, L.; Portillo, M.; Chiacchiarini, P.; Donati, E. *Advanced Materials Research*. 20-21, 139, 2007.
- Urbieto, S.; González Toril, E.; Aguilera, A.; Giaveno, A.; Donati, E. First Prokaryotic Biodiversity Assessment Using Molecular Techniques of an Acidic River in Neuquén, Argentina. *Microbial Ecology* 64, 91-104, 2012.

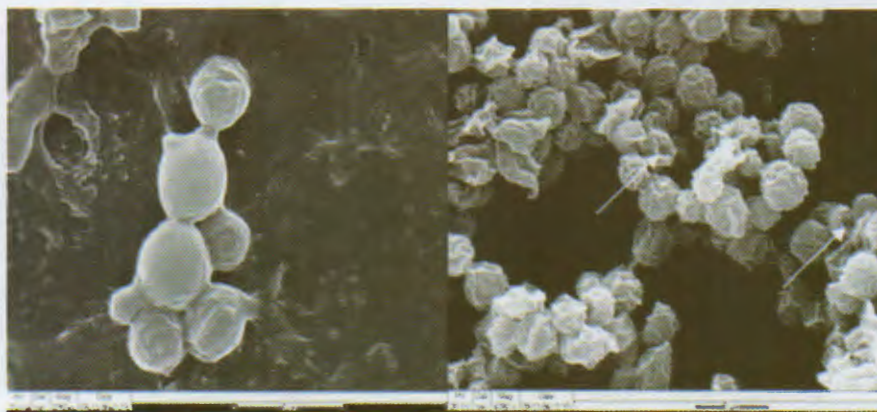


Figura 5: Imagen de una micrografía electrónica de barrido (SEM) de un cultivo de levaduras en medio sin metal (izquierda) y células expuestas a alta concentración de metal (derecha). Se aprecia una alteración en la superficie celular y las flechas muestran ruptura.