



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO**

**Efecto de la composición de un consorcio microbiano formado por microorganismos acidófilos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidothiobacillus thiooxidans* sobre su adherencia en un mineral aurífero refractario.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** Curipoma Quizhpe, Rebeca Dayana

**DIRECTORA:** Aguirre Chamba, Paulina Isabel, Ing.

**LOJA - ECUADOR**

**2018**



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>*

2018

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

**Ingeniera.**

Paulina Isabel Aguirre Chamba

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación **Efecto de la composición de un consorcio microbiano formado por microorganismos acidófilos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidothiobacillus thiooxidans* sobre su adherencia en un mineral aurífero refractario**, realizado por Curipoma Quizhpe Rebeca Dayana ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, enero del 2018

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Rebeca Dayana Curipoma Quizhpe declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Efecto de la composición de un consorcio microbiano formado por microorganismos acidófilos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidothiobacillus thiooxidans* sobre su adherencia en un mineral aurífero refractario**, de la titulación de Ingeniería Química, siendo Ing. Paulina Isabel Aguirre Chamba directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

F.....

Autor: Rebeca Dayana Curipoma Quizhpe

**Cédula: 1105913642**

## DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado principalmente al arquitecto de mi vida, mi ser celestial, quien me guía y me bendice a cada instante de mi vida.

A las personas que más amo, mi familia, mis hermanos en especial a mis padres quienes con sus sabios consejos, amor, apoyo y comprensión he podido cumplir con éxito cada uno de mis sueños.

Rebeca D. Curipoma

## AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a Dios, por guiar e iluminar mi camino. Gracias por la vida y por todas las bendiciones que he recibido durante mi formación como profesional.

A mis padres Galo y Sonia, por su amor, apoyo y comprensión en especial a la persona más importante en mi vida, mi madre, quien me inspira a superarme cada día más y ser la forjadora de mis sueños inalcanzables.

A mis hermanos, Galo, Joel, Kimberly y Josué David por el apoyo incondicional, por estar conmigo en mis fracasos y triunfos.

A mi sobrina, Cristell quien con su dulce y sensible alma me enseña lo maravillosa que es la vida.

A mis primas, Diana y Karina que desinteresadamente me brindaron su apoyo tanto económico como emocional durante toda mi carrera universitaria.

A mi directora de tesis, Ing Paulina quien ha compartido sus conocimientos y valiosos aportes que ayudaron a fortalecer mis conocimientos como profesional. Gracias por su confianza e infinita paciencia, por darme la oportunidad de trabajar junto a Ud.

A mi tribunal, Ph.D Eduardo y Magtr. Claudia gracias por guiarme y formar parte de este importante logro.

A mis amigas, Thalía por compartir los mejores momentos de verdadera amistad y compañerismo, a karlita quien ha estado a mi lado apoyándome de una u otra manera.

Y a todas aquellas personas por brindarme su apoyo y palabras de motivación durante la realización del presente trabajo.

Rebeca D. Curipoma

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....</b>	<b>II</b>
<b>DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO.....</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>6</b>
1.1. Biominería en el Ecuador. ....	7
1.2. Biolixiviación y biooxidación. ....	7
1.3. Bacterias usadas en el proceso de biooxidación. ....	8
1.4. Adherencia celular al mineral.....	8
1.5. Uso de consorcios microbiano en el proceso de biooxidación. ....	9
1.6. Parámetros para el proceso de biooxidación. ....	10
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>11</b>
2.1. Preparación del mineral. ....	12
2.2. Medio de cultivo y preparación de inóculo de microorganismos.....	12
2.3. Adaptación de microorganismos utilizando galactosa e ion férrico como inductores.....	13
2.4. Adherencia y formación del consorcio microbiano.....	13
2.5. Determinaciones analíticas. ....	14
2.5.1. Determinación de adherencia celular.....	14
2.5.2. Determinación de proteína plasmática.....	14
2.5.3. Determinación del número de células/mL utilizando cámara de Neubauer. ....	14
2.5.4. Medición de pH.....	15

2.5.5. Determinación de ion ferroso (Fe <sup>+2</sup> ) y hierro total en solución.....	15
2.5.6. Determinación de sulfatos. ....	15
2.6. Análisis de la Varianza (ANOVA). ....	15
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>18</b>
3.1. Cinéticas de crecimiento de los microorganismos <i>L. ferrooxidans</i> DSM2705 <sup>T</sup> y <i>A. thiooxidans</i> DSM14887 <sup>T</sup> adaptados a Hierro y Galactosa.....	19
3.2. Adherencia sobre el mineral del cultivo puro de <i>Acidothiobacillus thiooxidans</i> . ....	21
3.2.1. Proteína adherida del microorganismo <i>Acidothiobacillus thiooxidans</i> DSM14887 <sup>T</sup> . ....	23
3.3. Adherencia sobre el mineral de cultivo puro de <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM2705 <sup>T</sup> .....	24
3.3.1. Proteína adherida del microorganismo <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM2705 <sup>T</sup> . ....	26
3.4. Determinación de la mayor adherencia del consorcio formado por las bacterias <i>A. thiooxidans</i> DSM1487 <sup>T</sup> y <i>L. ferrooxidans</i> DSM2705 <sup>T</sup> en el mineral aurífero refractario adaptadas a diferentes concentraciones de inductores (Galactosa, Hierro). ....	27
3.4.1. Proteína Adherida del consorcio microorganismo formado por <i>A. thiooxidans</i> DSM14887 <sup>T</sup> y <i>L. ferrooxidans</i> DSM 2705 <sup>T</sup> en el mineral aurífero refractario. ....	29
3.5. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA). ....	30
3.5.1. Análisis estadísticos de la adherencia celular y proteínas del microorganismo <i>Acidothiobacillus thiooxidans</i> DSM1487 <sup>T</sup> adaptada a galactosa. ....	30
3.5.2. Análisis estadísticos del microorganismo <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM2705 <sup>T</sup> adaptadas a ion férrico.	32
3.5.3. Análisis estadísticos del consorcio microorganismo formado por <i>A. thiooxidans</i> DSM14887 <sup>T</sup> y <i>L. ferrooxidans</i> DSM2705 <sup>T</sup> en el mineral aurífero refractario .....	34
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>36</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>42</b>

## RESUMEN

La adherencia bacteriana sobre la superficie del mineral es uno de los aspectos más importantes en los procesos de biooxidación de sulfuros. Motivo por el cual en el presente trabajo se realizó la formación de un consorcio microbiano determinando su adherencia sobre un mineral. Los microorganismos utilizados en la investigación fueron: *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> los cuales crecieron a 30°C y pH 1.8, fueron previamente adaptados a diferentes concentraciones de galactosa y hierro, se procedió a realizar la adherencia celular a diferentes intervalos de tiempo (1, 10, 30, 60, 120, 180, 240 min). Se determinó proteína y número de células adheridas.

Para la formación del consorcio microbiano se procedió a variar las proporciones de cada especie microbiana en las siguientes relaciones 30/70; 40/60; 50/50; 60/40; 70/30% v/v de *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidothiobacillus thiooxidans*.

La mayor adherencia del cultivo *A. thiooxidans* se dio utilizando 0.15% de galactosa, para el cultivo de *L. ferrooxidans* se dio a 27g/L de concentración de hierro, mientras que para el consorcio se dio en 60 % *L. ferrooxidans* y 40% *A. thiooxidans* v/v con 83% adherencia.

**Palabras claves:** Adherencia, microorganismos acidófilos, consorcio microbiano.

## ABSTRACT

The bacterial adhesion on the surface of the mineral is one of the most important aspects in the processes of biooxidation of sulfides. Reason for which in the present work the formation of a microbial consortium was made determining its adherence to a mineral. The microorganisms used in the investigation were: *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705T and *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM14887T which grew at 30 ° C and pH 1.8, were previously adapted to different concentrations of galactose and iron, proceeded to perform cell adhesion at different time intervals (1, 10, 30, 60, 120, 180, 240 min). Protein and number of adhered cells were determined.

For the formation of the microbial consortium the proportions of each microbial species were varied in the following relationships 30/70; 40/60; 50/50; 60/40; 70/30% v / v of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidothiobacillus thiooxidans*.

The highest adherence of the culture *A. thiooxidans* was given using 0.15% of galactose, for the culture of *L. ferrooxidans* was given at 27g / L of iron concentration, while for the consortium was given in 60% *L. ferrooxidans* and 40% *A. thiooxidans* v / v with 83% adherence.

**Key words:** Attachment, acidophilic microorganisms, microbial consortium.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente a nivel nacional no se realizan pre-tratamientos de minas refractarias de oro, ni se ha llevado a cabo un proceso de biooxidación de minerales de manera comercial, pese de considerarse como una alternativa de remediación ambiental (Muñoz, 2003; Ospina et al., 2012). Por otra parte, la adhesión celular bacteriana sobre la superficie del mineral es considerada como uno de los aspectos más importantes en los procesos de biooxidación de minerales sulfurados (Natarajan, 2013).

La Biooxidación se puede definir como la disolución del mineral debido a la acción de los microorganismos ya sea mecanismo vía polisulfuro o tiosulfato. En el proceso se involucran bacterias que poseen diferentes características fisiológicas son, quimiolitotrófos, acidófilos y mesófilos, capaces de crecer a medias y altas temperaturas y bajas concentración de pH, su fuente de energía es la oxidación de hierro y compuestos reductores de azufre (Donati, 2006; Ospina et al., 2012; Mejía, 2010). Generalmente estas bacterias se encuentran aisladas de sitios donde ocurre la oxidación mineral natural tales como: minas, aguas termales enriquecidas con azufre. (Rosales et. al., 2001; Rodríguez et al, 2003; López, 2007). Los microorganismos participantes en procesos de biooxidación de minerales son principalmente: *Acidothiobacillus ferrooxidans*, *Acidothiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*.

Por tal motivo el objetivo del presente proyecto tiene como finalidad establecer el efecto de la composición de un consorcio microbiano formado por los microorganismos *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> y *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> sobre su adherencia en un mineral aurífero refractario y así favorecer con un menor tiempo el proceso de biooxidación.

El capítulo 1 describe el marco teórico de la investigación, donde se indica brevemente sobre la biominería en el Ecuador, bacterias que intervienen en el proceso de biooxidación, adherencia celular sobre el mineral, usos de los consorcios microbianos y parámetros importantes para el proceso de biooxidación.

En el capítulo 2 se detalla los materiales y métodos empleados en este estudio como: el diseño experimental, el medio de cultivo utilizado, preparación de los inóculos microbianos previamente adaptados a galactosa y hierro, formación del consorcio microbiano y adherencia celular sobre el mineral. Además, se realizaron las siguientes determinaciones analíticas: proteína plantónica, número de células plantónicas y medición de pH entre otros.

En el capítulo 3 se expone los resultados alcanzados en dicha investigación, se puede apreciar las adherencias celulares de los microorganismos representados en tablas y gráficos, además, de los análisis estadísticos empleados.

Finalmente se muestran las conclusiones y recomendaciones de acuerdo a los resultados obtenidos de esta investigación.

Es importante recalcar que se logró cumplir con los objetivos planteados en el desarrollo de esta investigación, donde se determinó la mayor adherencia celular de las especies microbianas *Leptospirillum ferrooxidans DSM2705<sup>T</sup>* y *Acidothiobacillus thiooxidans DSM14887<sup>T</sup>* sobre el mineral, y su posterior formación de un consorcio modelo que nos permitió acotar la mejor proporción de cada una de estas especies para obtener una mayor adherencia al mineral y por ende un menor tiempo de biooxidación.

## OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto de la composición de un consorcio microbiano formado por los microorganismos *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> y *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> sobre su adherencia en un mineral aurífero refractario, previamente adaptado a galactosa y hierro.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el efecto de la galactosa sobre la adherencia a un mineral aurífero refractario del cultivo puro del microorganismo *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> previamente adaptado a diferentes concentraciones de galactosa.
- Establecer el efecto del ión férrico sobre la adherencia a un mineral aurífero refractario del cultivo puro del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> previamente adaptado a diferentes concentraciones de ion férrico.
- Determinar la mejor adherencia del consorcio formado por las bacterias *A. thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> y *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> en el mineral aurífero refractario, previamente adaptadas a diferentes concentraciones de inductores (Galactosa, Hierro).

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

**H<sub>0</sub>:** La galactosa y el hierro no afectan la adherencia de las células sobre el mineral.

**H<sub>1</sub>:** La galactosa y el hierro afectan la adherencia de las células sobre el mineral

## **CAPÍTULO I**

## **1. Marco teórico.**

### **1.1. Biominería en el Ecuador.**

La explotación minera ha crecido significativamente en los últimos años, en especial en la recuperación de metales; de ahí que la biominería constituye una alternativa sustentable, económicamente más viable y amigable con el medio ambiente, esta consiste en utilizar un proceso natural con ciertos microorganismos con capacidad oxidante de hierro y azufre, a altas o moderadas temperaturas y pH ácidos; esta tecnología se aplica con éxito a nivel comercial para la recuperación de oro, cobre, cobalto, entre otros (Donati, 2006; Jaramillo 2014).

La actividad minera en el Ecuador es una fuente alta de recursos para la economía del país, ya que el veinte por ciento de la extensión territorial son zonas mineras, tanto en la provincia del Azuay, Zamora Chinchipe y Morona Santiago que son atravesadas por abundantes minerales en oro, plata y cobre. Actualmente a nivel nacional no se realizan pre-tratamientos de minas refractarias, ni se ha llevado a cabo un proceso de biooxidación de minerales de manera comercial, por lo que se cree que existe gran pérdida en ello (Muñoz, 2003). Además de considerarse como una alternativa de remediación ambiental, se debe emprender proyectos de explotación de dichos minerales, apoyados con la investigación y aplicaciones de novedosas e innovadoras herramientas biotecnológicas, que busquen favorecer la recuperación de recursos naturales en el Ecuador (Paladines, 2010; Iñiguez 2016).

### **1.2. Biolixiviación y biooxidación.**

Son procesos empleados para la oxidación de sulfuros, la biominería se dividen en dos ramas: la biolixiviación, en la que se emplea bacterias específicas para extraer un metal de valor (cobre, níquel, cobalto, entre otros) presentes en menas o en concentrados minerales, el producto final de la biolixiviación es una solución ácida que contiene metal en forma soluble y el residuo sólido se desecha. (Donati, 2006; Jaramillo 2014).

Mientras que la biooxidación es un proceso de pre-tratamiento de menas refractarias como el oro previo a su cianuración, se emplea cuando el elemento a recuperar no puede ser solubilizado por los microorganismos, pero su presencia beneficia la recuperación del mismo, tienen como objetivo liberar el oro a través de la degradación de la matriz del mineral en la que está el elemento de interés (Donati, 2006). La Biooxidación tiene mayor aplicación para el mejoramiento de la extracción de oro y obtención de plata y molibdeno (Donati, 2006).

### **1.3. Bacterias usadas en el proceso de biooxidación.**

En la biooxidación de minerales se utilizan microorganismos que poseen diferentes características fisiológicas: son quimiolitotrófos (capaces de oxidar compuestos inorgánicos como azufre y/o hierro) empleados como fuente de energía para su crecimiento; autótrofos porque asimilan directamente CO<sub>2</sub> del aire y acidófilos con capacidad de crecer en ambientes ácidos (pH menor 3) y finalmente mesófilos, ya que se encuentran a temperaturas entre 25° y 35°C, los microorganismos que se destacan son *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, entre otros, que han sido utilizados a nivel industrial (Rossi, 1990; Rosales et. al., 2001; López, 2007; Mejía, 2010).

#### **1.3.1. *Acidithiobacillus thiooxidans*.**

Estos microorganismos pertenecen a la gamma de Proto-bacteria, se los puede encontrar en depósitos de azufre y sulfuros donde fácilmente se los puede aislar. Se aisló por primera vez por Waksman y Jofe en (1992). Son microorganismos acidófilos de Gram-negativas que ocupan un área alrededor de 0.60 µm, se adaptan a un pH 2 y temperatura óptima de 28 - 30 °C. Temperaturas mayores a 37°C la oxidación del azufre y el crecimiento celular son significativamente más lentos. (López, 2007; Mejía, 2010).

#### **1.3.2. *Leptospirillum ferrooxidans*.**

Estos microorganismos pertenecen a la familia Nitrospira, bacteria que fue aislada de un medio mineral de sulfuros de cobre en Armenia por Markosyan en 1972 (Rossi, 1990; Donati, 2006). Oxida el sustrato (mineral) bajo condiciones mesofílicas y acidofílicas (1,3 < pH <2,4), tiene forma de espiral, con ancho de 0.3 a 0.5 µm y longitud de 0.9 a 3.0 µm, crecen a temperatura de 20 a 40° C, gram-negativas y quimiolitotróficos (Rosales et al., 2001).

### **1.4. Adherencia celular al mineral.**

La adhesión celular bacteriana sobre la superficie del mineral es uno de los aspectos más importantes en el proceso de biooxidación, tiene propiedades quimiotáxicas (adhesión al sitio específico) que permiten el movimiento de las bacterias a los sustratos que contienen los nutrientes; para que exista el contacto entre las bacterias y el mineral es requisito la presencia de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Natarajan, 2013). La adherencia celular favorece la liberación del ion ferroso por lixiviación y la oxidación de azufre elemental, los que pueden ser acumulados en la superficie del mineral (Adriana et al., 2012; Vilinska y Rao, 2009).

En la adherencia celular es posible diferenciar dos características: un aspecto cinético donde la velocidad de adherencia es un proceso rápido y se establece el equilibrio térmico. Una segunda característica de mayor importancia, es la adherencia de manera selectiva, que está controlada no solo por la interacción física (hidrofobias y electrostáticas) sino también que las bacterias reconocen los sitios activos de alto contenido energético en los se encuentran los iones reducidos en el mineral y se adhieren selectivamente a ellos. (Crundwell 1995; Gonzales 1999).

Por otro lado, en diferentes estudios experimentales han confirmado la capacidad de los microorganismos biooxidantes para adherirse a las superficies minerales. Donde la unión bacteriana al mineral se caracteriza por dos etapas distintas. Una etapa con una disminución continua de células libres en la solución con respecto a las células adheridas, y una segunda etapa en la que se alcanza un equilibrio entre células unidas y libres hasta el final del proceso (Rodríguez et al, 2003).

#### **1.5. Uso de consorcios microbiano en el proceso de biooxidación.**

Un consorcio microbiano es una asociación natural de dos o más especies, que comúnmente se encuentran juntas porque tienen los mismos requerimientos ambientales y comparten elementos de su nicho, o dependen de la presencia de un factor común para sobrevivir, generando mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promoviendo la estabilidad de los miembros en el tiempo (Morris, 2007; Ochoa 2010).

Entre una de las ventajas del uso de consorcios microbianos, es que las especies actúan como una comunidad, se benefician de las actividades conjuntamente, reflejan estilos de vida sinérgicos o sintróficos en el que el crecimiento se conduce de manera efectiva mejorando el flujo cíclico de nutrientes en las poblaciones. (López et al. 2007).

Existen diferentes estudios que reportan el uso de consorcios microbianos de hierro y azufre oxidantes, que mejoran el proceso de biooxidación de minerales. Qiu et al. (2005), demostró que un cultivo mixto de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* fue mejor en el proceso de lixiviación de calcopirita, a diferencia del uso de cultivos puros por separado; mientras que Falco et al. (2003) realizó pruebas de biolixiviación de covelita utilizando cultivos puros y mixtos, llegando a la conclusión que la biooxidación del mineral se realizó de mejor manera cuando se utilizó un cultivo mixto, es decir, un consorcio microbiano entre *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*.

## **1.6. Parámetros para el proceso de biooxidación.**

En un proceso de biooxidación no basta considerar los microorganismos y el mineral, también es fundamental considerar los parámetros de operación y requerimientos del cultivo, ya que dependen de la naturaleza de las bacterias y del mineral que domine dicho proceso.

### **1.6.1. Concentración de inóculo e inductor.**

La concentración de inóculo es la cantidad de microorganismos en un volumen determinado que intervienen en el proceso de biooxidación (Barreto, 2005). Los inductores son sustancias que fastidian o incomodan a los microorganismos ayudando a la producción de EPS y a la vez a que exista mayor adherencia celular.

Los inductores utilizados en el proceso de biooxidación son: el sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), que está relacionado con el mecanismo indirecto, e interviene en el proceso ayudando a la reacción a oxidar de ion ferroso a ion férrico (Arroyave 2010, Díaz 2012). En el caso de la Galactosa como inductor ayuda al incremento de producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) por la bacteria. Según Barreto et al., (2005) indica que al agregar cierta concentración de galactosa a un cultivo se obtiene una diferencia significativa en la producción de EPS, como lo obtuvo con la pirita por células cultivado en presencia y sin presencia de galactosa (Barreto et al., 2005).

### **1.6.2. Temperatura.**

En la biooxidación de minerales la temperatura tiene consecuencia directa en el crecimiento celular, la solubilidad de los minerales, velocidad de reacción y las interacciones electroquímicas medio-mineral. La temperatura óptima permite que sea posible las reacciones con una velocidad considerable. Las bacterias *A. thiooxidans* y *L. ferroxidans* se encuentran a una temperatura entre 20 a 40°C (Arroyave 2008; Jaramillo 2014).

### **1.6.3. Potencial redox (Ph) y Potencial de oxidación (Eh).**

El pH indica la concentración del ion ( $\text{H}^+$ ) e interviene en el crecimiento de los microorganismos influyendo a los grupos de ionizables presentes en las células, puede variar debido a las características del mineral si posee componentes consumidores de ácido (Gómez et al., 2005). Mientras que el Eh indica la actividad de los electrones en el sistema, es un indicador de la actividad bacteriana en un proceso. La oxidación de especies sulfuradas se caracteriza por la presencia de un potencial mixto, donde se dan dos procesos electroquímicos fuera del equilibrio: la oxidación del sulfuro y la reducción del ión férrico (González, 1999; Gómez et al. 2005).

## **CAPÍTULO II**

## 2. Materiales y métodos.

### 2.1. Preparación del mineral.

El mineral utilizado fue recolectado del sector minero Bella Rica, es un mineral polimetálico compuesto especialmente de pirita y calcopirita con un porcentaje de 17 y 2% respectivamente, el cual fue molido hasta obtener un tamaño de partículas de 74  $\mu\text{m}$  en un molino de bolas y los sulfuros fueron concentrados por gravimetría. El mineral fue lavado, acidificado a un pH de 1.8 y esterilizado a 121°C por 24 horas con calor seco y sometido a 1 atm de Nitrógeno por 10 min para evitar previa oxidación.

### 2.2. Medio de cultivo y preparación de inóculo de microorganismos.

Se usó como referencia el medio de cultivo propuesto por (Kim et al 2002) para los microorganismos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> usando como fuente de energía el sulfato ferroso y azufre, los cuales fueron cultivados en medios definidos como se muestra en la tabla 2.1 y 2.2.

**Tabla 2.1.** Composición del medio de cultivo para el cultivo de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup>

Compuesto	Concentración (g/L)
KCL	1.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.6
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	44
pH (ajustado a 1.8 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10N)	

**Fuente:** Aguirre et al., (2017)

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

**Tabla 2.2.** Composición del medio de cultivo para el cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup>.

Compuesto	Concentración (g/L)
KCL	1.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.6
Azufre elemental	10
pH (ajustado a 1.8 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10N)	

**Fuente:** Aguirre et al., (2017)

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

### **2.3. Adaptación de microorganismos utilizando galactosa e ion férrico como inductores.**

Para la adaptación microbiana se utilizó cultivos puros de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> y *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup>, los cuales crecieron en los medios de cultivo anteriormente mencionadas, se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo, el cual se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C. Se esterilizó el azufre a 105°C por 24 horas a calor seco, mientras que la solución de sulfato ferroso se esterilizó mediante filtración con un filtro miliporo de 0.45 µm.

Para los cultivos de *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> y *L. ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> se establecieron las siguientes condiciones de trabajo: temperatura de 30°C, 180 rpm en un agitador orbital marca Thermo scientific, pH inicial de 1.8 y 1.3. Mediante el conteo celular y oxidación del ion ferroso y azufre los cultivos se consideraron adaptados.

La especie *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> fue adaptada a diferentes concentraciones de galactosa (0, 0.15; 0.25; 0.35%) mientras que *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> se adaptado a diferentes concentraciones de hierro (9, 18, 27 y 36 g/L), para lo cual se partió de inóculos activos, se acondicionó al medio (Kim et al 2002) más galactosa. Una vez el microorganismo se adaptó a la concentración más baja de galactosa se tomó un inóculo del 10%v/v para pasar a la próxima concentración, este paso se realizó tanto para los microorganismos cultivados en galactosa como en hierro.

### **2.4. Adherencia y formación del consorcio microbiano.**

Se llevó a cabo la formación del consorcio microbiano el cual se sometió a ensayos de adherencia sobre mineral, los cultivos microbianos usados fueron aquellos que dieron mejor resultado en la prueba de adherencia por separado.

Los consorcios de prueba se formaron variando las proporciones de cada uno de los microorganismos en las siguientes proporciones: 30/70; 40/60; 50/50; 60/40; 70/30% v/v *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> / *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup>, obteniéndose un inóculo del 10%v/v, el mismo que se agregó al medio fresco suplementado con 2% p/v de mineral del sector minero Bella Rica.

Los experimentos fueron realizados en un agitador marca Orbit 1900 a 180 rpm, utilizando matraces de 250 mL con un volumen de trabajo de 50 mL y pH inicial de 1.8. Para determinar la adherencia del consorcio se realizó las cinéticas de adherencia microbianas por conteo de células platónicas a diferentes tiempos en cámara de Neubauer de 0.02 mm de profundidad

y además se determinó proteína plantónica como método de comprobación de los experimentos.

## **2.5. Determinaciones analíticas.**

### **2.5.1. Determinación de adherencia celular.**

La adherencia celular se realizó durante 4 horas en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de volumen de trabajo, donde se removió 3 ml del cultivo bacteriano en intervalos específicos de tiempo (1, 10, 30, 60, 120, 180, 240 min). El número de células se determinó en la fase líquida con recuento en cámara de Neubauer con 0.02 mm de profundidad mediante el uso del microscopio de contraste de fases (MOD Pluss ZEISS AXIO). El número de células unidas a la superficie del mineral se determinó como la diferencia entre la concentración inicial de las células inoculadas y la concentración de las células restantes en la fase líquida.

### **2.5.2. Determinación de proteína plantónica.**

El contenido de proteínas fue determinado usando el método de Bradford (1951). Se utilizó albúmina de suero de bovino Sigma- Aldrich (BSA) como estándar. Previamente se realizó la ruptura de la estructura celular con la finalidad de obtener la proteína de las células. El procedimiento consistió en agregar 1.5 ml de la muestra en análisis en un tubo Falcón y fue centrifugado a 7380 rpm durante 15 minutos, el pellet formado fue tratado con 0.5N NaOH donde se homogenizó la muestra y se llevó a ebullición en baño María durante 10 minutos. Se dejó enfriar la muestra, se llevó a centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. Finalmente se tomó una muestra de 100 µL del sobrenadante, se mezcló con 5.0 mL del reactivo de Bradford, se dejó en obscuridad durante 10 min, se midió la absorbancia de la mezcla a 595 nm en un espectrofotómetro de UV-visible (Thermo Scientific Modelo Genesys 20).

### **2.5.3. Determinación del número de células/mL utilizando cámara de Neubauer.**

Para determinar el número de bacterias por mL de las muestras, se realizó conteos celulares en una cámara de Neubauer de 0.02 mm de profundidad, donde se colocó una cierta cantidad de muestra entre la cámara y el cubre-objetos, se observó en un microscopio de contraste de fases (MOD Pluss ZEISS AXIO) con lente de 100X. (Anexo 1). Posteriormente fue necesario aplicar la siguiente ecuación para calcular el número de bacterias presentes en un mL de medio.

$$\frac{bact}{ml} = \left( \frac{\#bacterias\ contadas * FD}{Área * Profundidad} \right) * 1000 \quad Ec. 1$$

**Dónde:**

Área = 0.04 mm<sup>2</sup>

Profundidad = 0.02 mm

1000 = Factor que indica el número de células que existe en 1mL

FD = Factor de dilución de la muestra

**2.5.4. Medición de pH.**

La medición de pH de las muestras se realizó de manera directa con un pHmetro marca Hanna, previamente calibrado utilizando soluciones estándar de pH de 4.0 y 7.0.

**2.5.5. Determinación de ion ferroso (Fe<sup>+2</sup>) y hierro total en solución.**

El ion ferroso se determinó utilizando el método de Muir (Muir y Andersen, 1977; Herrera 1989), basado en la formación de un complejo coloreado entre (Fe<sup>+2</sup>) y 1.10- fenantrolina cuantificado espectrofotométricamente a 510 nm y se comparó con una curva de calibrado.

El hierro total se midió por reducción del (Fe<sup>+3</sup>) con clorhidrato de hidroxilamina, y midiendo el (Fe<sup>+2</sup>) resultante de la forma ya descrita. El ion férrico se determinó por diferencia entre ion ferroso y hierro total. (Anexo 2).

**2.5.6. Determinación de sulfatos.**

El ion sulfato en solución se determinó por un método turbimétrico, donde fue precipitado en un medio ácido con cloruro de bario formando cristales uniformes de sulfato de bario. La absorbancia de esta suspensión fue una medida de la concentración de iones sulfato, medido a 520nm y se comparó con una curva de calibrado. (Anexo 3).

**2.6. Análisis de la Varianza (ANOVA).**

Para la siguiente investigación se planteó un diseño estadístico en donde cada variable independiente será analizada por separado. Las siguientes tablas presentan tal diseño, así como condiciones de operación de cada uno de los objetivos planteados.

La tabla 2.3. Muestra las variables independientes y dependientes que se desarrolló para el ensayo de adherencia del cultivo puro de la especie *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup>

(At) adaptada a diferentes concentraciones de galactosa (0, 0.15, 0.25 y 0.35 %). Los ensayos se realizaron por duplicado, con un total de 8 experimentos.

**Tabla 2.3.** Ensayo 1: Ensayo de adherencia de cultivo puro de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup>.

Variables Independientes	Variables Dependientes	Parámetros de Trabajo	Número de Experimentos
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM14887 <sup>T</sup> (At) cultivo puro a diferentes concentraciones de Galactosa	Número de células adheridas, proteína	pH inicial: 1.8 Temperatura: 30°C Agitación: 180 rpm % mineral: 2 p/v Mejor concentración Galactosa.	8

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

La tabla 2.4. Indica las variables independientes y dependientes para el desarrollo de adherencia celular utilizando un cultivo puro de la especie *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> (Lf) previamente adaptada a diferentes concentraciones de ion férrico (9, 18, 27 y 36 g/L). Los ensayos se realizaron por duplicado, con un total de 8 experimentos.

**Tabla 2.4.** Ensayo 2: Ensayo de adherencia de cultivo puro de *Leptospirillum ferrooxidans*.

Variables Independientes	Variables Dependientes	Parámetros de Trabajo	Número de Experimentos
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM2705 <sup>T</sup> (Lf) cultivo puro a diferentes concentraciones de Hierro.	Número de células adheridas, proteína.	Ph inicial: 1.8 Temperatura: 30°C Agitación: 180 rpm % mineral: 2 p/v Mejor concentración Hierro.	8

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

Tabla 2.5. Muestra un tercer ensayo donde se prueba la adherencia de un consorcio formado por las especies *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> (Lf) y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> (At) a diferentes proporciones de cada una. Los ensayos se realizaron por triplicado, con un total de 15 experimentos.

**Tabla 2.5.** Ensayo 3: Proporción de la cantidad de c/especie.

<b>Variables Independientes</b>	<b>Variables Dependientes</b>	<b>Parámetros de Trabajo</b>	<b>Número de Experimentos</b>
30Lf/70At 40Lf/60At 50Lf/50At 60Lf/40At 70Lf/30At	Número de células adheridas, proteína.	Ph inicial: 1.8 Temperatura: 30°C Agitación: 180 rpm % mineral: 2 p/v Mejor concentración Galactosa.	15

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

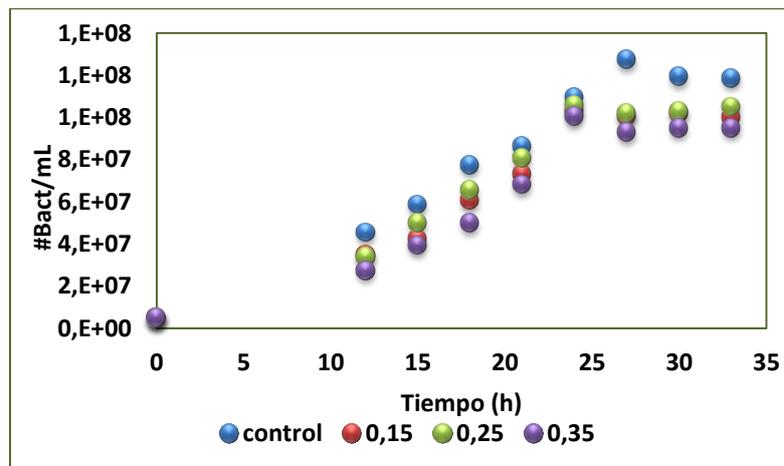
### **CAPÍTULO III**

### 3. Resultados y análisis.

#### 3.1. Cinéticas de crecimiento de los microorganismos *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y *A. thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> adaptados a Hierro y Galactosa.

Se realizó la cinética de crecimiento de los cultivos de *A. thiooxidans* previamente adaptados a diferentes concentraciones de galactosa (0.15, 0.25 y 0.35%) junto con un control sin galactosa, donde se determinó la concentración microbiana y oxidación de sulfatos. El tiempo total que necesitaron los microorganismos para llegar a la fase estacionario y oxidar todo el azufre a sulfato fueron de 33 horas.

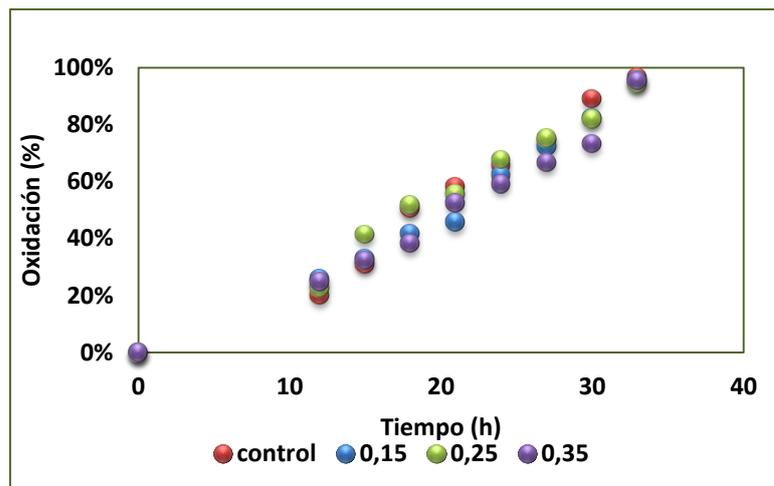
La figura 3.1 muestra la concentración celular (bacterias/mililitros) en función al tiempo (horas) para las diferentes concentraciones de galactosa antes mencionadas, en donde se observa que en un tiempo de 24 horas se da la fase exponencial de los microorganismos. En la figura 3.2 se puede ver la oxidación del ion sulfato en función del tiempo para los cultivos *A. thiooxidans*, donde un tiempo de 33 horas de crecimiento indicando se alcanza valores aproximados al 100% de oxidación.



**Figura 3.1.** Cinética de crecimiento microbiano de *A. thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> a diferentes concentraciones de galactosa.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma



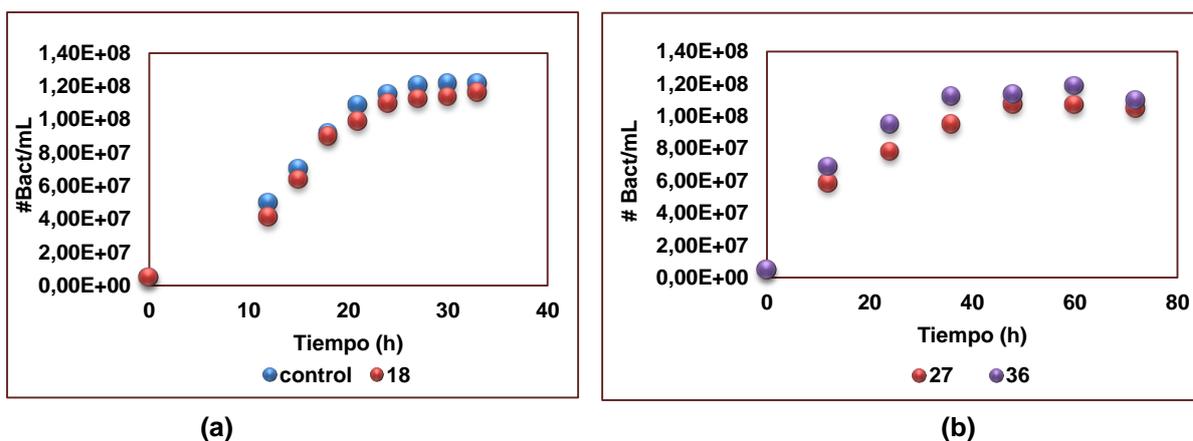
**Figura 3.2.** Porcentaje de oxidación de sulfatos de *A. thiooxidans* DSM14887T a concentraciones de galactosa.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

Por otro lado, se realizó la cinética de crecimiento a los cultivos de *L. ferrooxidans* previamente adaptados a diferentes concentraciones de hierro (18, 27 y 36 g/L) junto con un control de 9 g/L, donde se determinó la concentración microbiana y la oxidación del ion ferros a ion férrico.

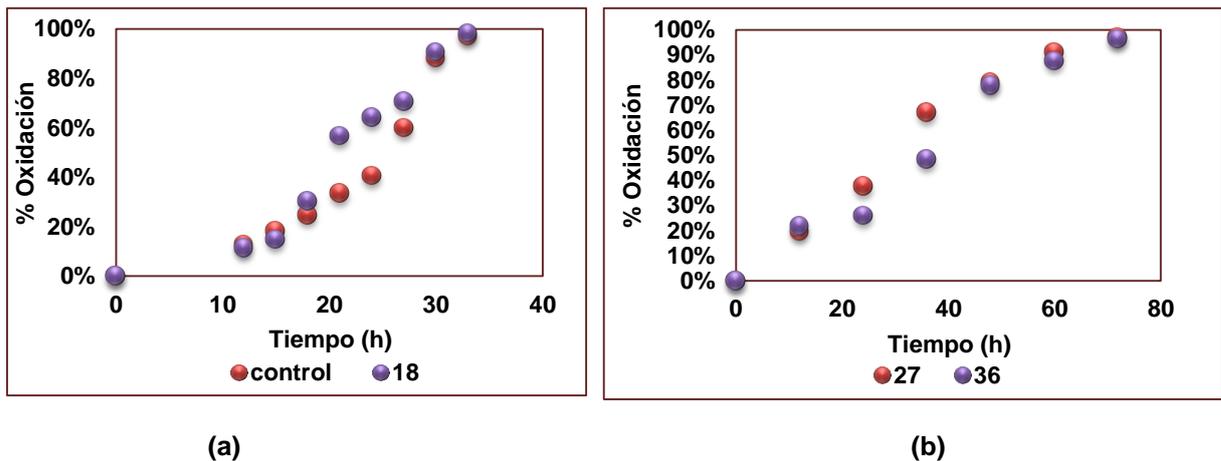
La Figura 3.3 (a y b) indica la concentración celular (bacterias/mililitros) en función del tiempo (horas) para las diferentes concentraciones de hierro, en donde se observa que para las concentraciones de 9 y 18 g/L (Figura 3,3 a) se da el máximo crecimiento a las 24 horas. Por otro lado, para las concentraciones de 27 y 36 g/L (Figura 3,3 b) el máximo crecimiento microbiano se dio a las 48 horas.



**Figura 3.3.** Cinética de crecimiento microbiano de *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> a diferentes concentraciones de hierro: control y 18 g/L (a), 27 y 36 g/L (b).

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma



**Figura 3.4.** Porcentaje de oxidación de hierro II de *L. ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> a diferentes concentraciones de hierro: control y 18 g/L (a), 27 y 36 g/L (b).

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

En la figura 3.4 (a y b) se muestra el porcentaje de oxidación del hierro II en función del tiempo para los cultivos *L. ferrooxidans*, en donde a las concentraciones de 9 y 18 g/L (Figura 3,4 a) de hierro la mayor oxidación fue en 33 horas, mientras que para I de 27 y 36 g/L (Figura 3,4 b) de hierro se dio en 72 horas. Comparando estos resultados con el estudio de Escobar (1999) indica que para la especie de *A. ferrooxidans* obtiene un número de células en conteo directo de  $6 \times 10^8$  (bacterias/mL) en un tiempo mínimo de 7 días, mientras que para la especie *L. ferrooxidans* su máximo crecimiento es de  $3,10 \times 10^7$  (bacterias/mL) en el mismo tiempo, esto nos indica que los microorganismos se han adaptado adecuadamente a los inductores pues el tiempo de crecimiento de los mismos es menor.

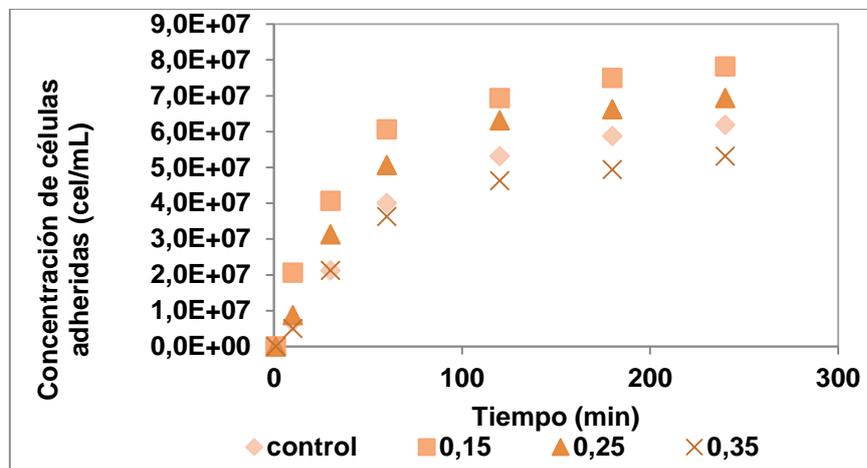
A partir de las cinéticas anteriormente descritas se tomó como referencia el tiempo de 24 horas como el óptimo para la adherencia en los cultivos *A. thiooxidans*, mientras que para los cultivos de *L. ferrooxidans* se tomó como tiempo adecuado 24 horas para las concentraciones de 9 y 18 g/L de hierro y de 48 horas para las concentraciones de 27 y 36 g/L de hierro. que corresponde al máximo crecimiento celular y el 80% de oxidación de hierro y sulfatos, que fue el valor que se tomó como referencia para tomar el inoculo que servirá para los ensayos de adherencia.

### 3.2. Adherencia sobre el mineral del cultivo puro de *Acidothiobacillus thiooxidans*.

La adherencia microbiana sobre un mineral aurífero refractario se determinó mediante cinéticas por conteo de células plantónicas en el tiempo, el ensayo tuvo una duración de 4 horas en las cuales se tomó muestras del sobrenadante cada cierto tiempo, las experiencias

se dieron por finalizadas cuando el número de células contadas fueron invariables en el tiempo. La adherencia microbiana se determinó por diferencia entre el número de células iniciales menos el número de células finales en el medio.

En la Figura 3.5 se muestra el número de células adheridas al mineral en función del tiempo a diferentes concentraciones de galactosa (0, 0.15, 0.25; 0.35%). Como se puede observar la mayor adherencia microbiana se dio a la concentración de 0.15% de galactosa; se ha determinado que la galactosa mejora la adherencia microbiana debido a que genera sustancias poliméricas extracelulares que permiten el enlace entre células y mineral (Barreto, 2005), por otro lado, con respecto al control, el cual no contiene galactosa, se observa que la concentración de células adheridas al mineral es menor que con la presencia de una pequeña cantidad de galactosa.

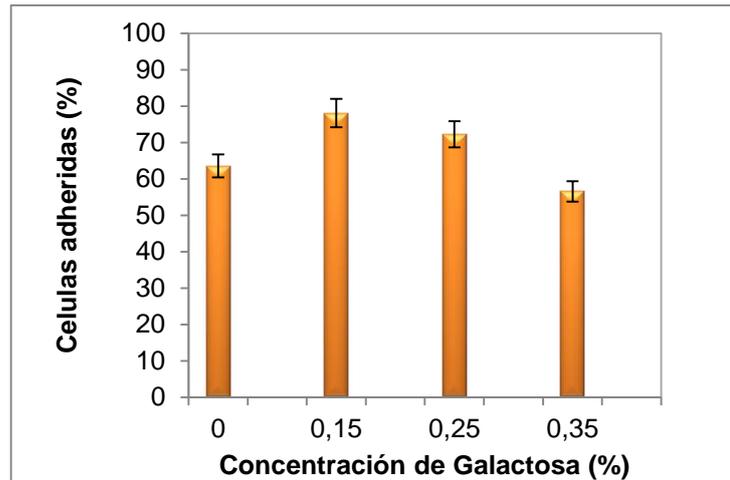


**Figura 3.5.** Adherencia celular del microorganismo *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM1487<sup>T</sup> sobre el mineral aurífero refractario.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

En la Figura 3.6 se muestra el porcentaje de adherencia del microorganismo *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> a las mismas concentraciones de galactosa mencionadas anteriormente, donde se puede verificar que la concentración de 0.15% se obtiene el mayor porcentaje de adherencia celular con un 78%. En estudios realizados por Harneit et al (2006) sobre adherencia microbiana, obtuvo un 85% de células adheridas al mineral en un tiempo de 10 horas, comparando los resultados obtenidos en esta investigación se obtiene un porcentaje similar de células adheridas en un tiempo de 4 horas.



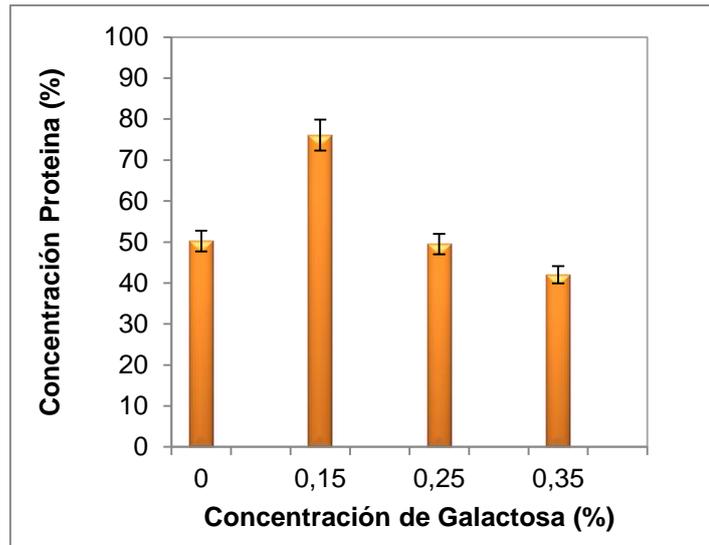
**Figura 3.6.** Porcentaje de adherencia celular del microorganismo *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> utilizando galactosa como inductor.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

### **3.2.1. Proteína adherida del microorganismo *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup>.**

En la Figura 3.7 se muestra el porcentaje de proteína con respecto a las diferentes concentraciones de galactosa, donde se observa nuevamente que a la concentración de 0,15% existe la mayor concentración de proteína adherida. Actualmente no existe una investigación de adherencia utilizando dicho microorganismo, por lo que fue necesario compararlo con el estudio realizado por Goutam et al (1995), en el que realizó adherencia al mineral con una cepa microbiana de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, indica que el contenido de proteína medida se puede correlacionar fácilmente con la población de células bacterianas adheridas a la superficie del mineral, por lo tanto, al comparar la figura 3.6 y 3.7 se puede apreciar que realmente se tiene relación entre la proteína adherida y el número células adheridas a la misma concentración de galactosa.



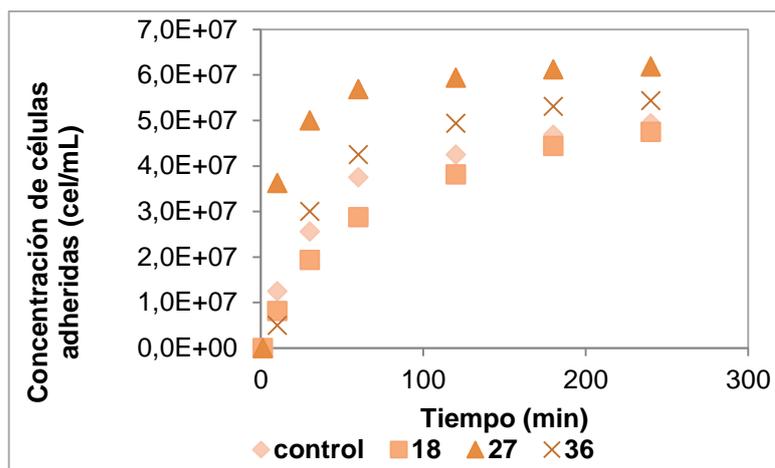
**Figura 3.7.** Porcentaje de concentración de proteína adherida del microorganismo *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> utilizando galactosa como inductor.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

### 3.3. Adherencia sobre el mineral de cultivo puro de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup>.

En el caso del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> utilizando hierro como inductor a diferentes concentraciones (9, 18, 27 y 36 g/L), se puede observar en la Figura 3.8 que la mayor adherencia al mineral se llevó a cabo con una concentración de 27 g/L, donde se obtuvo una concentración celular de  $6,19 \times 10^7$  células/mL en 4 horas de cultivo, en los 60 minutos se obtuvo una adherencia de aproximadamente el 82,5%, comparado con los otros cultivos en los que se obtuvieron 62% para la concentración de 18 g/L y 72% para la concentración de 36 g/L de hierro. De acuerdo al estudio de Vardanyan et al, (2013) al realizar ensayos de *L. ferrooxidans* con 0.5 g/L de hierro no logra detectar adherencia al mineral, mientras que en nuestro caso el hierro influye de manera significativa sobre la unión de células a la superficie del mineral.

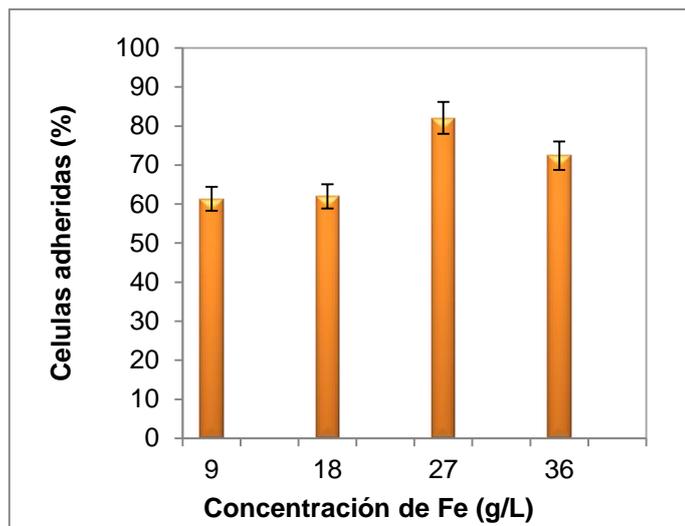


**Figura 3.8.** Adherencia celular del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> previamente adaptado a Hierro sobre el mineral aurífero refractario.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

En la Figura 3.9 se muestra el porcentaje de adherencia del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* en el tiempo a diferentes concentraciones de hierro (9, 18, 27, 36 g/L). De acuerdo a un estudio similar realizado por Rodríguez et al. (2003) indica que la mayor adherencia del microorganismo fue en el tiempo de 200 min con 85% de células adheridas, mientras que en nuestro caso se llevó a cabo un 82% de adherencia en el tiempo de 60 minutos, como se puede observar en la Figura 3.8 y 3.9. Posiblemente la adherencia es debido a que se mejoraron las interacciones electrostáticas del microorganismo, comparando los resultados nos podemos dar cuenta que realmente es posible obtener una mayor adherencia del microorganismo en menor tiempo.



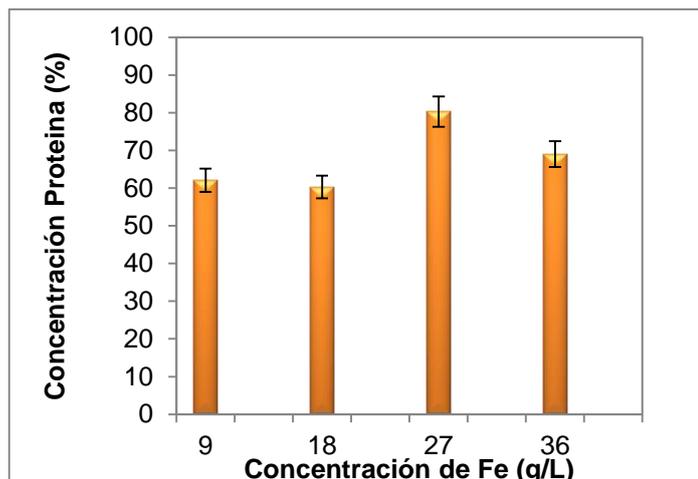
**Figura 3.9.** Porcentaje de adherencia celular del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup>, utilizando hierro como inductor.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

### **3.3.1. Proteína adherida del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup>.**

La figura 3.10 se muestra el porcentaje de proteína adherida con respecto a las diferentes concentraciones de ion férrico (9, 18, 27 Y 36 g/L), en la cual se observa que a la concentración de 27g/L de hierro existe el mayor contenido de proteína adherida. Con esto se verifica de manera indirecta las mediciones en conteo de cámara Nuebauer. Por lo tanto, al comparar la Figura 3.9 y 3.10 se puede apreciar que la proteína y el número células adheridas tienen relación entre sí.



**Figura 3.10.** Porcentaje de concentración de proteína del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup>, utilizando hierro como inductor.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

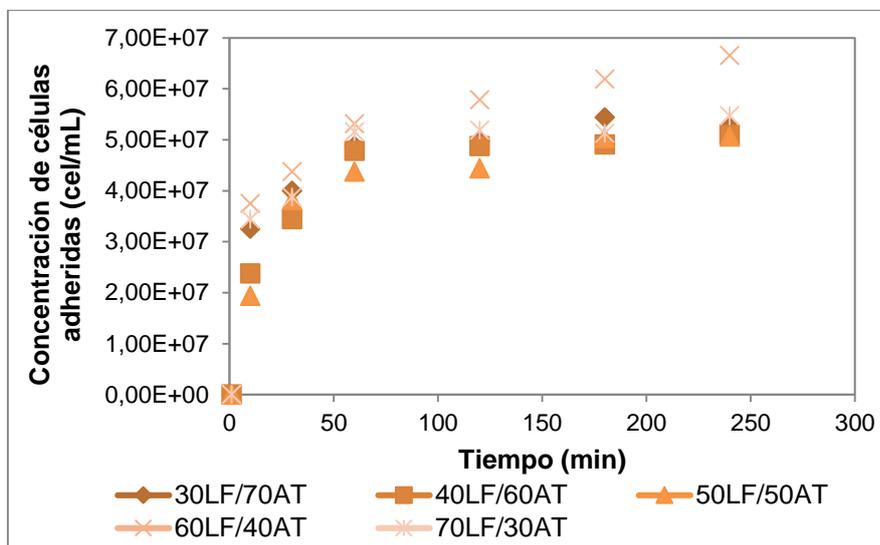
La presencia de hierro favorece el mecanismo de contacto de la biolixiviación, ya que la adherencia bacteriana al mineral es una de las etapas más importantes, debido a que permite tener altas velocidades de disolución gracias al ataque del ion férrico a la superficie del mineral. (Rodríguez et al., 2003).

#### **3.4. Determinación de la mayor adherencia del consorcio formado por las bacterias *A. thiooxidans* DSM1487<sup>T</sup> y *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> en el mineral aurífero refractario adaptadas a diferentes concentraciones de inductores (Galactosa, Hierro).**

La formación del consorcio microbiano se realizó mediante la combinación de dos diferentes especies *A. thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> y *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> previamente adaptado a 0.15% de galactosa y 27 g/L de hierro respectivamente en las siguientes proporciones: (30/70; 40/60; 50/50; 60/40; 70/30% v/v) como inóculo inicial se consideró un número total de bacterias de  $1 \times 10^8$  cel/mL. Se puede observar en la Figura 3.11 que la mayor adhesión sobre el mineral se dio en la proporción de 60 % *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y 40 % *A. thiooxidans* con un porcentaje de 83% que corresponde a  $6.66 \times 10^7$  células/mL adheridas en aproximadamente 240 min.

Comparando con el estudio de Florian (2011) partiendo con un inóculo inicial de  $1 \times 10^8$  cel/mL donde obtuvo mayor adherencia a la proporción de 50% de cada especie respectivamente,

con un porcentaje del 63% que correspondiente a  $5 \times 10^7$  cel/mL durante 7 horas de ensayo. Por lo tanto, en este estudio se logró obtener con una concentración inicial de células similar al de Florian mayor adherencia microbiana en un tiempo de 4 horas que corresponde al 83% de células adheridas.

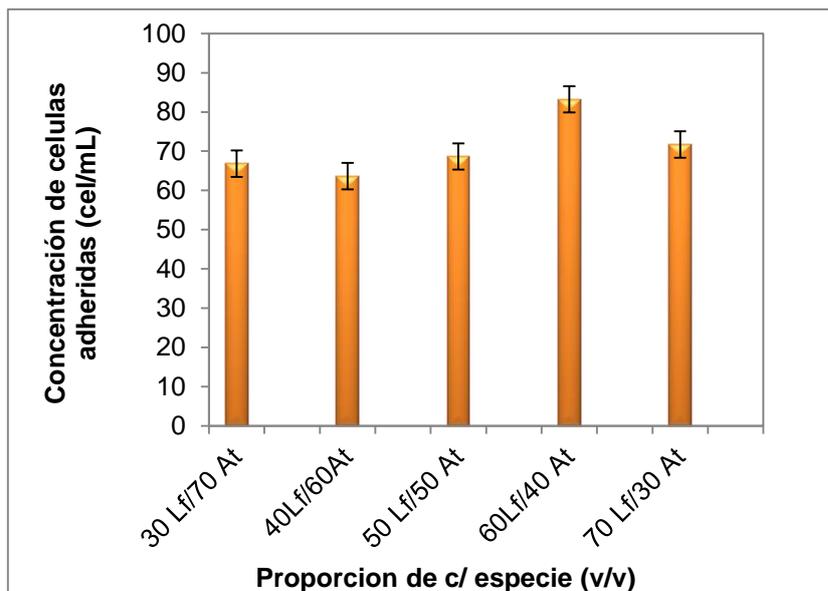


**Figura 3.11.** Adherencia celular en el tiempo del consorcio microbiano formado por los microorganismos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

En la Figura 3.12 se muestra el porcentaje de adherencia del consorcio microbiano en el tiempo a diferente concentración de inductores (hierro y galactosa), donde se comprueba su mayor adherencia a la proporción de (60 *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y 40 *A. thiooxidans* % v/v) con un 83% de adherencia. En la actualidad el uso de cultivos mixtos se está considerando como el futuro de los procesos de biolixiviación ya que las reacciones de extracciones de metales con impulsadas por la generación de ion férrico como indica (Ehrlich 2001; Mousavi et al., 2008).



**Figura 3.12.** Porcentaje de adherencia celular del consorcio microbiano formado por *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>.

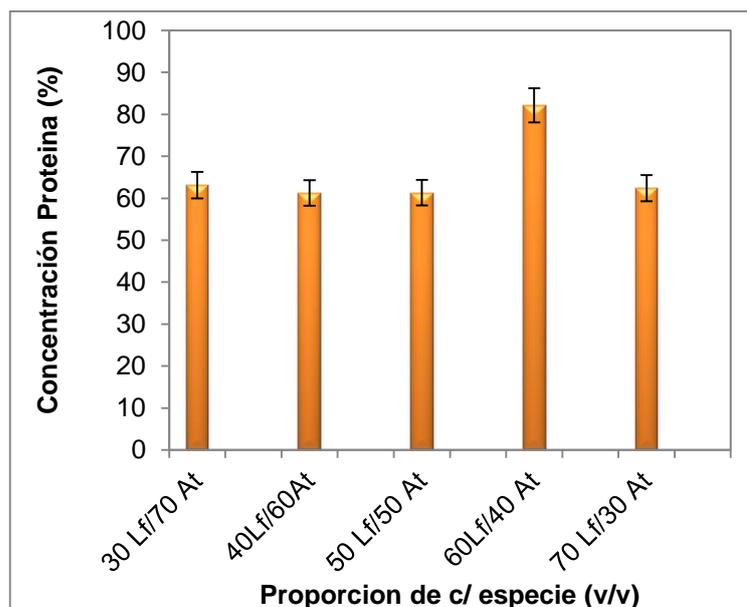
**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

#### **3.4.1. Proteína Adherida del consorcio microorganismo formado por *A. thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup> y *L. ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> en el mineral aurífero refractario.**

En la figura 3.13 se muestra el porcentaje de proteína con respecto a las diferentes proporciones del consorcio microbiano formado por *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*, en la cual se comprobó la mayor adherencia en la mejor proporción siendo a 60 % *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y 40 % *A. thiooxidans*.

Por lo tanto, al fijarnos en la figura 3.12 y 3.13 se puede apreciar que existe gran relación entre la proteína y el número células adheridas en el consorcio, especialmente a la misma concentración de inductores (hierro y galactosa).



**Figura 3.13.** Porcentaje de proteína adherida del consorcio formado por *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup> y *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>.

**Fuente:** Rebeca Curipoma

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

### 3.5. Análisis de la varianza de un factor (ANOVA).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron analizados mediante el uso del programa estadístico IBM SPSS Statistics 21, con el análisis ANOVA de un factor, método de HSD de Tukey para cada uno de los ensayos planteados. Con nivel de confianza del 0.95%, significancia 0.05%.

#### 3.5.1. Análisis estadísticos de la adherencia celular y proteínas del microorganismo *Acidothiobacillus thiooxidans* DSM1487<sup>T</sup> adaptada a galactosa.

Se realizó un análisis ANOVA de un factor con la finalidad de verificar el efecto de galactosa como inductor en la adherencia celular sobre el mineral.

La tabla 3.1 se puede apreciar el análisis de comparativo de medias junto con el error del efecto de las diferentes concentraciones de galactosa sobre el número de células y proteína adherida al mineral, se ve que tiene un efecto positivo sobre la unión de las células sobre la superficie del mineral con un valor de significancia  $p < 0.05$ .

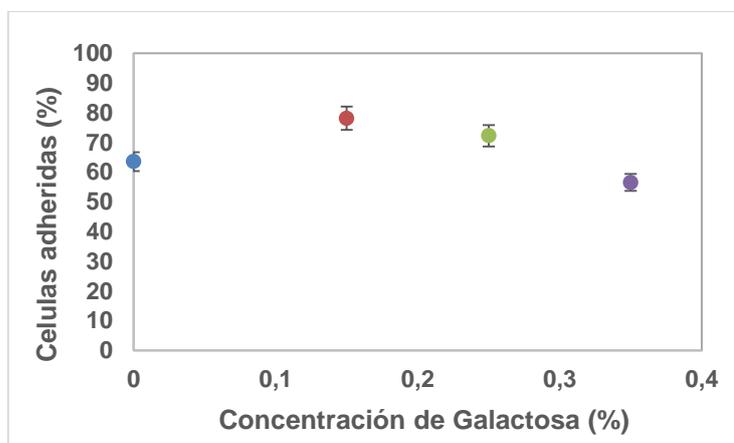
**Tabla 3.1.** Análisis ANOVA de un factor para la adherencia celular y proteína sobre el mineral del microorganismo *A. thiooxidans* DSM14887<sup>T</sup>.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F <sub>0</sub>	P-valor
Proteína	Tratamiento	1330,244	3	443,415	815,475	,000
	Error	2,175	4	,544		
	Total	1332,419	7			
Células	Tratamiento	539,830	3	179,943	186,954	,000
	Error	3,850	4	,963		
	Total	543,680	7			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Rebeca Curipoma

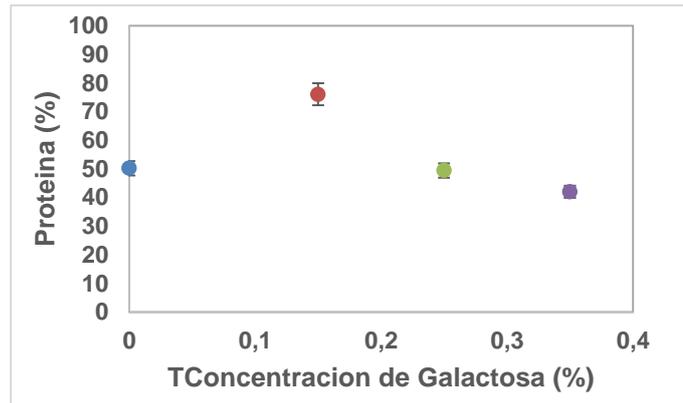
La Figura 3.14 y 3.15 muestra la comparación de medias tanto de células adheridas como proteínas del microorganismo *Acidothiobacillus thiooxidans* en función a la concentración de galactosa, donde se puede observar que la adherencia celular es mayor con la concentración de 0.15%, aunque el cultivo adaptado a 0.25% de galactosa presenta un porcentaje de adherencia similar al 0,15%; al comprar estos valores con el control podemos observar que la galactosa favorece a la adhesión celular sobre el mineral.



**Figura 3.14.** Comparación de medias del porcentaje de células adheridas en función de las concentraciones de galactosa (0, 0.15, 0.25, 0.35%).

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Rebeca Curipoma



**Figura 3.15.** Comparación de medias del porcentaje de proteína adheridas en función de las concentraciones de galactosa (0, 0.15, 0.25, 0.35%).

**Fuente:** Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

### 3.5.2. Análisis estadísticos del microorganismo *Leptospirillum ferrooxidans* DSM2705T adaptadas a ion férrico.

Se realizó un análisis ANOVA de un factor en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21, con la finalidad de comprobar el efecto de ion férrico en la adherencia celular, y conocer la mejor concentración del mismo para obtener una mayor adherencia sobre el mineral.

La Tabla 3.2 se puede observar el análisis de comparativo de medias junto con el error del efecto de las diferentes concentraciones de hierro sobre el número de células y proteína adherida al mineral, demostrando un efecto positivo en la unión de las células sobre la superficie del mineral con valores de significancia  $p < 0.05$ .

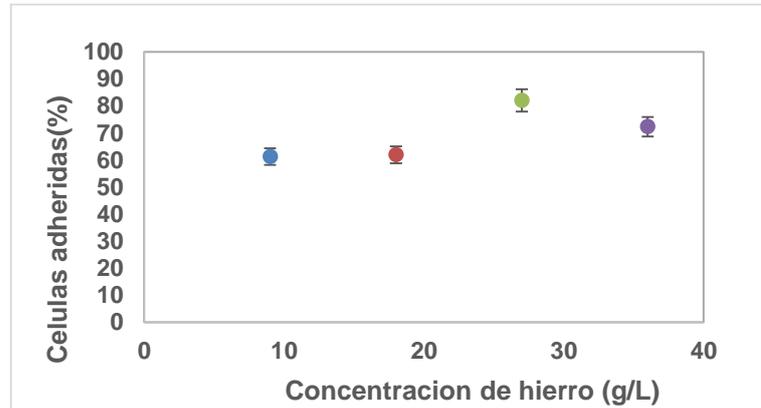
**Tabla 3.2.** Análisis ANOVA de un factor para la adherencia sobre el mineral del microorganismo *L. ferrooxidans* DSM2705<sup>T</sup>.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F <sub>0</sub>	P-valor
Proteína Tratamiento	494,125	3	164,708	82,872	,000
Proteína Error	7,950	4	1,988		
Proteína Total	502,075	7			
Células Tratamiento	581,300	3	193,767	399,519	,000
Células Error	1,940	4	,485		
Células Total	583,240	7			

**Fuente:** Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

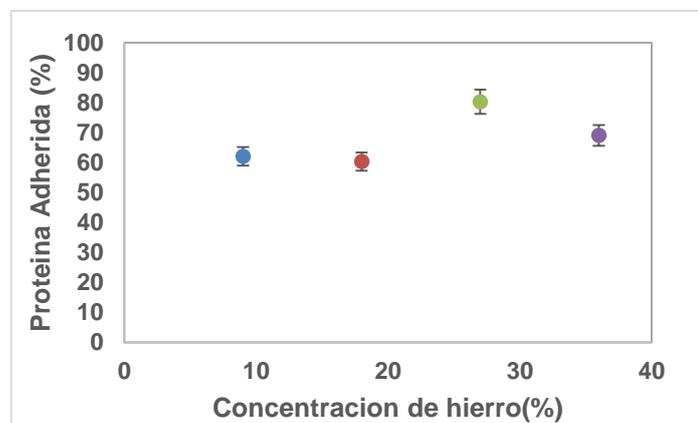
La Figura 3.16 y 3.17 se muestra la comparación de medias de células y proteína adherida del microorganismo *L. ferroxidans* en función de las diferentes concentraciones hierro, donde se observa que a la concentración de 27 g/L existe mayor adherencia celular que en las correspondientes a (9, 18 y 36 g/L), donde se puede decir que dicho inductor favorece a una mejor adhesión.



**Figura 3.16.** Comparación de medias del porcentaje de células adheridas en función a las concentraciones de ion férrico (9, 18,27,36 g/L).

**Fuente:** Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma



**Figura 3.17.** Comparación de medias del porcentaje de proteína adheridas en función a las concentraciones de ion férrico (9, 18,27,36 g/L).

**Fuente:** Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma

### 3.5.3. Análisis estadísticos del consorcio microorganismo formado por *A. thiooxidans* DSM14887T y *L. ferrooxidans* DSM2705T en el mineral aurífero refractario

Se realizó un análisis ANOVA de un factor en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21, con la finalidad de conocer la mejor proporción de los microorganismos *A. thiooxidans* DSM14887T y *L. ferrooxidans* DSM2705T y su efecto en la adherencia sobre el mineral.

La Tabla 3.3 indica el análisis comparativo de medias junto con el error del efecto de las diferentes concentraciones de hierro y galactosa sobre el número de células y proteína adherida al mineral, con valores de significancia  $p < 0.05$  por lo tanto, nos indica que existe diferencia significativa entre las diferentes proporciones del consorcio probado.

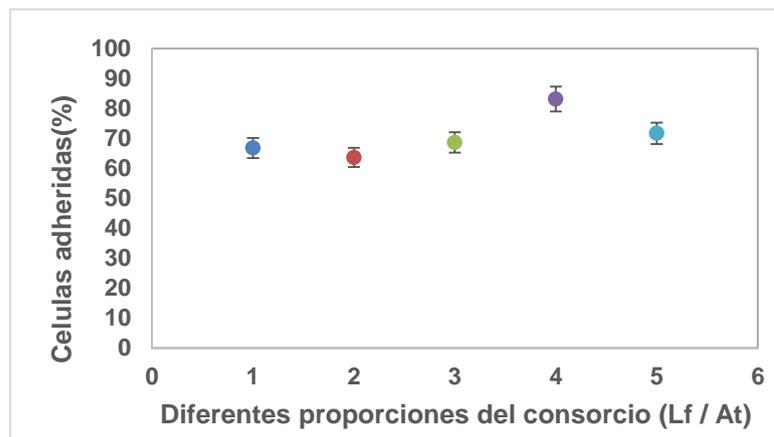
**Tabla 3.3.** Análisis ANOVA de un factor para la adherencia sobre el mineral del consorcio microbiano formado por *A. thiooxidans* DSM14887T *L. ferrooxidans* DSM2705T Donde: 30 Lf/70At (1), 40Lf/60At (2), 50Lf/50At (3), 60Lf/40At (4), 70Lf/30At (5) % v/v.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F <sub>0</sub>	P-valor
Proteína Tratamiento	652,730	4	163,183	55,073	,000
Proteína Error	14,815	5	2,963		
Proteína Total	667,545	9			
Células Tratamiento	452,630	4	113,158	55,633	,000
Células Error	10,170	5	2,034		
Células Total	462,800	9			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Rebeca Curipoma

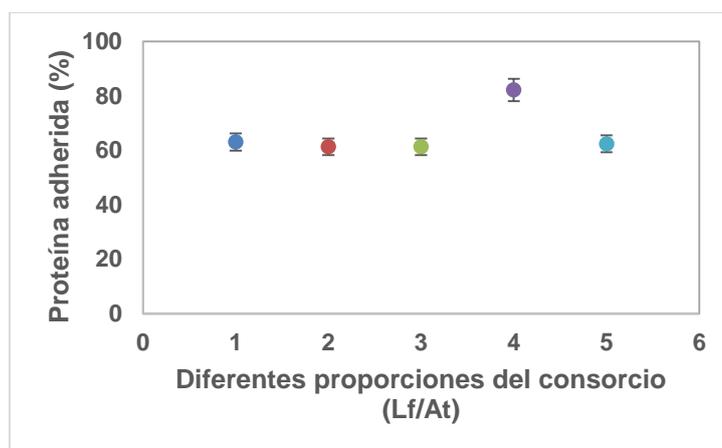
La Figura 3.18 y 3.19 muestra la comparación de medias del consorcio microbiano formado por *A. thiooxidans* DSM1487T *L. ferrooxidans* DSM2705T en función de las diferentes concentraciones hierro y galactosa.



**Figura 3.18.** Comparación de medias de células del consorcio microbiano en función a las concentraciones de inductores (hierro y galactosa). 30 Lf/70At (1), 40Lf/60At (2), 50Lf/50At (3), 60Lf/40At (4), 70Lf/30At (5) % v/v.

**Fuente:** Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma



**Figura 3.19.** Comparación de medias de proteína del consorcio microbiano en función a las concentraciones de inductores (hierro y galactosa). 30 Lf/70At (1), 40Lf/60At (2), 50Lf/50At (3), 60Lf/40At (4), 70Lf/30At (5) % v/v.

**Fuente:** Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma.

## CONCLUSIONES

Para el cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* se determinó que la mejor adherencia fue a la concentración de 0,15% de galactosa sobre el mineral aurífero refractario con un 78% de adherencia celular.

Para el cultivo de *Leptospirillum ferrooxidans* se determinó que la mejor adherencia fue a la concentración de 27 g/L de ion férrico sobre el mineral aurífero refractario con un 82% de adherencia celular.

En el consorcio microbiano formado por *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* se determinó que la mejor adherencia se dio en la proporción de 60% *L. ferrooxidans* y 40% *A. thiooxidans* con un porcentaje de adherencia celular del 83%.

El uso de inductores como hierro y galactosa afectan la adherencia microbiana sobre el mineral, ya que en presencia de estos el porcentaje de células adheridas fue mayor.

Se cumplió los objetivos planteados en la investigación y con ello se pudo aportar con una estrategia de cultivo microbiano con mayor adherencia al mineral aurífero refractario de tal manera que permita disminuir el tiempo en un proceso de biooxidación.

## RECOMENDACIONES

Realizar estudios de adherencia en consorcios microbianos a proporciones distintas a las mencionadas en este estudio, con el fin de verificar que tipo de microorganismo tiene una mayor influencia en este proceso.

Posterior a la presente investigación se recomienda realizar un proceso de biooxidación mediante el uso de biorreactores ya que son característicos para los tratamientos de minerales refractarios con soluciones de bacterias del tipo acidófilas.

En la determinación de proteínas es importante mantener la temperatura en ebullición cuando se lleva a baño maría, con la finalidad de evitar cambios en la medición final.

Se recomienda preparar los cultivos en cámara de flujo laminar para evitar contaminación con otro tipo de microorganismos no deseado.

Se recomienda realizar más estudios utilizando el microorganismo *Acidothiobacillus thiooxidans* ya que actualmente no existe variedad de información sobre dicho microorganismo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adriana, I., Liberona, J., Guía, P., Escobar, B., De, M. M., Comisión, L., Al, O. (2012.). Estudio de la biolixiviación de pirita por un cultivo de *Sulfobacillus acidophilus* A 45°C.
- Arroyave, D. (2008). Evaluación del proceso de biooxidación a escala de laboratorio del mineral aurífero de la mina el Zancudo, Titiribí, Antioquia. Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Colombia. Colombia.
- Arroyave D; Márquez M; Gallego D; Pacheco G. (2010). Evaluación y caracterización mineralógica del proceso de biooxidación en un reactor continuo de tanque agitado. *Dyna*. 77, 164, 18-28
- Brenner, K, You, L & Arnold, F. (2008). Engineering Microbial Consortia: a new frontier in synthetic biology. En: *Trends in Biotechnology*, 26 (9): 483-489.
- Cuevas, R. (2013). Ingeniería de reactores. Obtenido de:  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Balancemateria\\_10657.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Balancemateria_10657.pdf) (Consultado 27 de Junio de 2016).
- Crundwell, F. K.,(1995) *Matemactical Modelling and Optimization of leaching plants. Biohydrometallurgical Processing* 437-446.
- Díaz, E. (2012). Optimización de parámetros para la biooxidación de minerales polimetálicos del distrito minero Portovelo. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Donati, E. *Biominería: Una tecnología alternativa.*  
<http://www.fundamin.com.arles/publicaciones/81-mineria-y-medio-ambiente/105-biomineria-una-tecnologia-alternativa.html> (Consultado 30 de junio del 2016).
- Ehrich, H L. (2001). Past, present and future of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*. 59: 127-134.
- Gehrke T., Hallmann R., Sand. W. (1995). *Importance of exopolymers from Thiobacillus ferrooxidans and Leptospirillum ferrooxidans for bioleaching*, in: T. Vargas, C.A. Jerez, J.V. Wiertz, H. Toledo (Eds.), in: *Biohydrometallurgical Processing* 1:1–11.

- Gómez, J. y Cantero, D. (2005). Biooxidación del ión ferroso. Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras. 25-43.
- González, R. (1999). Oxidación de un mineral concentrado refractario de oro en sistema continuo. Tesis de Maestría .Universidad católica de Valparaíso, Chile.
- Goutam ,k; Natarajan, K; Modak, J. (1995) Estimation of mineral-adhered biomass of *Thiobacillus ferrooxidans* by protein assay-some problems and remedies. Paper. Institute of Science, Bangalore.
- Harneit, K; Goksel, A; Kock, D;Gehrke T; Sand, W.(2006) Adhesion to metal sulfide surfaces by cells *Acithiobacillus ferroxidans*, *Acidithiobacillus thioxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. University Harmburg, Germany.
- Herrera, L; Ruiz, P; Agillon, JC., Fehrmann, A. (1989). A new spectrophotometric method for the determination of Ferrous iron in the presence of ferric iron, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 44, 171-181.
- Iniguez, H. (2016). Aislamiento y caracterización molecular de bacterias acidófilas nativas del sector minero Tundayme perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe. Tesis de Biología. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Jaramillo, K. (2014). Influencia del tiempo de residencia sobre la solubilización de un mineral aurífero refractario del distrito minero Portovelo en un sistema continuo de biooxidación en reactores de tanque agitado a escala laboratorio. Tesis de Ingeniería Química. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Jones, C., Kelly D. (1983) Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of product and substrate inhibition. Journal Chemical Technology Biotechnology 33(B):241-261.
- Kim T.W., Kim C.J., Chang Y.K., Ryu H.W., Cho K. (2002). Development of an optimal medium for continuous ferrous iron oxidation by immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells. Biotechnoly. Prog. 18(4): 752-759.
- Lacey, D & Lawson, F. (1970). Kinetics of liquid-phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotechnol. Bioeng. 29-50.

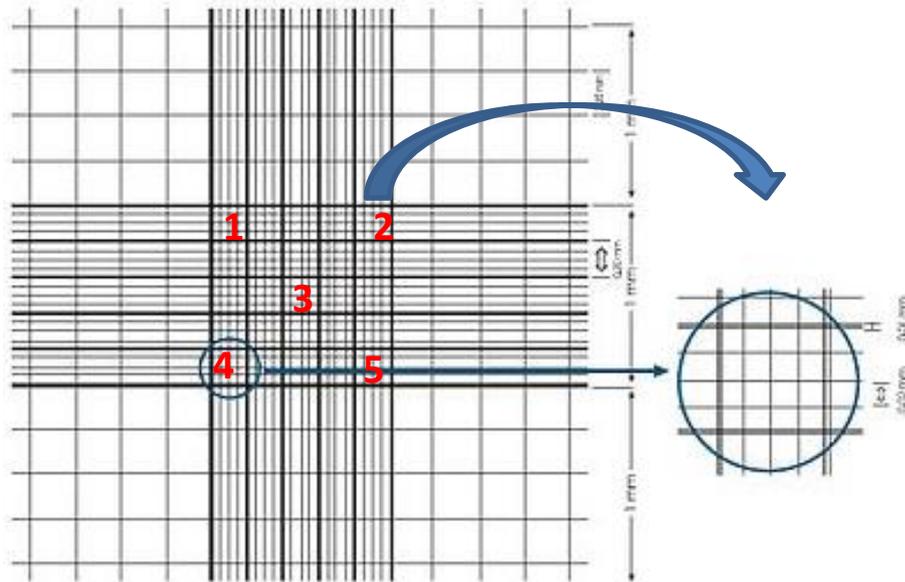
- López, T, Domínguez, L & García, J. (2007). Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre. Trabajo presentado en el octavo Congreso Nacional de Microscopía, Octubre, México.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
- Mejía, E. (2010). Mineralogía del proceso de lixiviación bacteriana de calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Colombia, Colombia.
- Morris, S., Blackwood, C. (2007). *The Ecology of Soil Organisms*. En: Paul, E. (Ed), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, Oxford: Elsevier
- Mousavi, S.M., Yaghmaei, S., Vossoughi, M., Roostaazad, R., Jafari, A., Ebrahimi, M., Chabok, O.H., Turunen, I., 2008. The effects of Fe(II) and Fe(III) concentration and initial pH on microbial leaching of low-grade sphalerite ore in a column reactor. *Bioresour. Technol.* 99, 2840–2845
- Muir M.K, and T.N Andersen, 1977. Determination of Ferrous Iron in Copper-Process Metallurgical Solutions by the o-Phenanthroline Colorimetric Method. *Metallurgical Transactions B* 8 (2): 517 – 518.
- Natarajan K.A., Sudeesha K., Rao G.R. (1994). Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 66: 303–306.
- Natarajan, K.A. (2013) Course Title: Metals Biotechnology. NPTEL Web Course. <http://nptel.ac.in/courses/113108055/8>
- N. Noël, B. Florian, W. Sand. (2009) AFM & EFM study on attachment of acidophilic Leaching organisms, *Hydrometallurgy* 104 (2010) 370–375.
- Ospina, J.; Mejía, E.; Osorno, L.; Márquez, M. y Morales, A. (2012). Biooxidación de concentrados de arsenopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en erlenmeyer agitados. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 135-145.

- Ochoa, D. & Montoya, A. (2010) Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. En: Revista de la Facultad de Ciencias Económicas de la Universidad Militar Nueva Granada. rev.fac.cienc.econ, XVIII (2)
- Paladines, A. (2010). Zonificación geotectónica y metalogenia del Ecuador.
- Quin, W., Ynag, C., Lai, S., Wang, J., Liu, K., Zhang, B. (2013) Bioleaching of chalcopyrite by moderately thermophilic microorganisms. *Bioresource Technology*. 129. 200-208.
- Qiu M., Xiong S., Zhang W., Wang, G. ( 2005). A comparison of bioleaching of chalcopyrite using pure culture or a mixed culture. *Minerals Engineering*, 18, 987–990
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., Muñoz, J. A. (2003). Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite, and sphalerite. *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 131-141.
- Rossi, G. (1990). *Biohydrometallurgy*; McGraw- Hill Book Company GmbH: Hamburgo.
- Sánchez, I. (2013). Diversidad microbiana y taxonomía: Crecimiento microbiano. Enlace disponible en:  
[http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=182&Itemid=225](http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=182&Itemid=225) (consultado 5 de Enero de 2015).
- Shahroz, K., Faizul, H., Fariha, H., Kausar, S., Rahat, U. (2012) Growth and Biochemical Activities of *Acidithiobacillus thiooxidans* Collected from Black Shale.
- Vásquez Pérez, Luz. (1997). “Diversidad de los microorganismos quimiolitotróficos presentes en sistemas de biolixiviación”. Tesis (Doctor en Ciencias con mención en Biología). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 1-21.
- Vera, M., Schippers, A., & Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(17), 7529-7541.
- Vilinska, A., Rao, K. (2009). Surface Thermodynamics and Extended DLVO Theory of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cells Adhesion on Pyrite and Chalcopyrite. *The Open Colloid Science Journal*, 2, 1–14.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.- CONTEO CELULAR

Se colocó aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  de muestra entre la cámara Neubauer y el cubre-objeto, fue observado en el microscopio con lente de 100X, en la siguiente figura se puede observar que el conteo celular se realizó de forma cuadrangular 1, 2, 4 y 5 tomando en cuenta el cuadrante central cuadrantes 3. (Figura 3.20).



**Figura 3.20.** Cámara Neubauer

**Fuente:** Rebeca Curipoma

Para determinar el número de bacterias por mL fue necesario aplicar la siguiente ecuación:

$$\frac{\# \text{ bact}}{\text{ml}} = (\# \text{ bacterias} / \text{FD} * \text{Área} * \text{Profundidad}) * 1000$$

**ANEXO 2.- DETERMINACIÓN DE IÓN FERROSO ( $\text{Fe}^{2+}$ ), HIERRO TOTAL EN SOLUCION.**  
(Herrera, Ruiz y Fehrmann 1989; Muir y Andersen, 1997).

### **METODO IÓN FERROSO**

- a. Agregar 0,1 mL de la muestra con una concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  en el rango 10-100 mg/L (preparar blanco con Agua pH 2. Para muestras más concentradas diluir con Agua pH 2.
- b. Agregar 1 mL del Reactivo NaF y agitar.
- c. Agregar 1 mL del Reactivo de Trabajo.
- d. Agregar 1 mL de Agua pH 2.
- e. Esperar 5 minutos y medir absorbancia a 510 nm ( $\text{Abs} < 0,800$ ) contra blanco de Agua pH 2. Determinar concentración por comparación con curva de calibrado de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

### **METODO HIERRO TOTAL**

- a. Agregar 0,1 mL de la muestra con una concentración de  $\text{Fe}_{\text{Total}}$  en el rango 10-100 mg/L (preparar blanco con Agua pH 2. Para muestras más concentradas diluir con Agua pH 2.
- b. Agregar 0,1 mL del Reactivo Hidroxilamina.
- c. Agregar 1 mL del Reactivo NaF y agitar.
- d. Agregar 1 mL del Reactivo de Trabajo.
- e. Agregar 1 mL de Agua pH 2.
- f. Esperar 5 minutos y medir absorbancia a 510 nm ( $\text{Abs} < 0,800$ ) contra blanco de Agua pH 2. Determinar concentración por comparación con curva de calibrado de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

El blanco contiene todos los reactivos excepto la muestra que se reemplazar por agua destilada.

### **ANEXO 3.- DETERMINACIÓN DE SULFATOS (González, 1999)**

#### **PROCEDIMIENTO:**

- a.** Tomar una muestra y realizar un factor de dilución a un aforo de 2mL
- b.** Colocar la muestra diluida en un tubo de ensayo y añadir 0.1 mL de reactivo condicionante.
- c.** Agitar continuamente durante 3 minutos.
- d.** Añadir cloruro de bario con la ayuda de una espátula y agitar por un minuto.
- e.** Medir absorbancia a 520 nm durante 4 minutos, tomando como el valor máximo.
- f.** Se toma como blanco a una muestra que no se añade cloruro de bario.
- g.** Para la curva de calibrado se realizó soluciones estándares de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro en un rango de 10 - 100 ppm. Estas soluciones se procesan y se leen de manera idéntica a la solución problema.

### ANEXO 3.- ANÁLISIS POST-HOC DE TUKEY

La Tabla 3.1 nos indica que existen diferencias significativas entre las concentraciones de galactosa de: 0, 0.15, 0.25 y 0.35 %, con valores de  $p < 0.05$ .

**Tabla 3.1.** Análisis post-hoc de Tukey para la adherencia del cultivo de *A. thiooxidans* adaptadas a galactosa

Variable dependiente	(I) Galactosa	(J) Galactosa	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Proteína		,15	-25,85000*	,73739	,000	-28,8518	-22,8482
	,00	,25	,80000	,73739	,716	-2,2018	3,8018
		,35	8,20000*	,73739	,001	5,1982	11,2018
		,00	25,85000*	,73739	,000	22,8482	28,8518
	,15	,25	26,65000*	,73739	,000	23,6482	29,6518
		,35	34,05000*	,73739	,000	31,0482	37,0518
		,00	-,80000	,73739	,716	-3,8018	2,2018
	,25	,15	-26,65000*	,73739	,000	-29,6518	-23,6482
		,35	7,40000*	,73739	,002	4,3982	10,4018
		,00	-8,20000*	,73739	,001	-11,2018	-5,1982
	,35	,15	-34,05000*	,73739	,000	-37,0518	-31,0482
		,25	-7,40000*	,73739	,002	-10,4018	-4,3982
Células		,15	-14,55000*	,98107	,000	-18,5438	-10,5562
	,00	,25	-8,65000*	,98107	,003	-12,6438	-4,6562
		,35	7,00000*	,98107	,007	3,0062	10,9938
		,00	14,55000*	,98107	,000	10,5562	18,5438
	,15	,25	5,90000*	,98107	,013	1,9062	9,8938
		,35	21,55000*	,98107	,000	17,5562	25,5438
		,00	8,65000*	,98107	,003	4,6562	12,6438
	,25	,15	-5,90000*	,98107	,013	-9,8938	-1,9062
		,35	15,65000*	,98107	,000	11,6562	19,6438
		,00	-7,00000*	,98107	,007	-10,9938	-3,0062
	,35	,15	-21,55000*	,98107	,000	-25,5438	-17,5562
		,25	-15,65000*	,98107	,000	-19,6438	-11,6562

**Fuente:** Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

**Elaborado por:** Rebeca Curipoma.

La tabla 3.2 nos indica que existen diferencias significativas entre las con concentraciones de hierro de: 9, 18, 27 y 36 g/L, con valores de significancia menores a 0.05.

**Tabla 3.2.** Análisis post-hoc de Tukey para la adherencia del cultivo de *L. ferrooxidans* adaptadas a hierro

Variable dependiente	(I) Hierro	(J) Hierro	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Proteína		18,00	1,75000	1,40979	,637	-3,9890	7,4890
	9,00	27,00	-18,25000*	1,40979	,001	-23,9890	-12,5110
		36,00	-7,00000*	1,40979	,026	-12,7390	-1,2610
		9,00	-1,75000	1,40979	,637	-7,4890	3,9890
	18,00	27,00	-20,00000*	1,40979	,001	-25,7390	-14,2610
		36,00	-8,75000*	1,40979	,012	-14,4890	-3,0110
		9,00	18,25000*	1,40979	,001	12,5110	23,9890
	27,00	18,00	20,00000*	1,40979	,001	14,2610	25,7390
		36,00	11,25000*	1,40979	,005	5,5110	16,9890
		9,00	7,00000*	1,40979	,026	1,2610	12,7390
	36,00	18,00	8,75000*	1,40979	,012	3,0110	14,4890
		27,00	-11,25000*	1,40979	,005	-16,9890	-5,5110
Células		18,00	-,70000	,69642	,756	-3,5350	2,1350
	9,00	27,00	-20,80000*	,69642	,000	-23,6350	-17,9650
		36,00	-11,10000*	,69642	,000	-13,9350	-8,2650
		9,00	,70000	,69642	,756	-2,1350	3,5350
	18,00	27,00	-20,10000*	,69642	,000	-22,9350	-17,2650
		36,00	-10,40000*	,69642	,000	-13,2350	-7,5650
		9,00	20,80000*	,69642	,000	17,9650	23,6350
	27,00	18,00	20,10000*	,69642	,000	17,2650	22,9350
		36,00	9,70000*	,69642	,001	6,8650	12,5350
		9,00	11,10000*	,69642	,000	8,2650	13,9350
	36,00	18,00	10,40000*	,69642	,000	7,5650	13,2350
		27,00	-9,70000*	,69642	,001	-12,5350	-6,8650

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Rebeca Curipoma

La tabla 3.3 y 3.4 nos indica que existen diferencias significativas entre las concentraciones de hierro de: 9, 18, 27 y 36 g/L, con valores de significancia menores a 0.05.

**Tabla 3.3.** Análisis post-hoc de Tukey para la proteína adherencia del consorcio formado por *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* adaptadas a diferentes inductores (hierro y galactosa). Dónde: 30 Lf/70At (1), 40Lf/60At (2), 50Lf/50At (3), 60Lf/40At (4), 70Lf/30At (5) % v/v.

Variable dependiente	(I) Consorcios	(J) Consorcios	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Proteína	1,00	2,00	1,85000	1,72134	,813	-5,0552	8,7552
		3,00	1,75000	1,72134	,839	-5,1552	8,6552
		4,00	-19,05000*	1,72134	,001	-25,9552	-12,1448
		5,00	,70000	1,72134	,992	-6,2052	7,6052
	2,00	1,00	-1,85000	1,72134	,813	-8,7552	5,0552
		3,00	-,10000	1,72134	1,000	-7,0052	6,8052
		4,00	-20,90000*	1,72134	,000	-27,8052	-13,9948
		5,00	-1,15000	1,72134	,955	-8,0552	5,7552
	3,00	1,00	-1,75000	1,72134	,839	-8,6552	5,1552
		2,00	,10000	1,72134	1,000	-6,8052	7,0052
		4,00	-20,80000*	1,72134	,000	-27,7052	-13,8948
		5,00	-1,05000	1,72134	,967	-7,9552	5,8552
	4,00	1,00	19,05000*	1,72134	,001	12,1448	25,9552
		2,00	20,90000*	1,72134	,000	13,9948	27,8052
		3,00	20,80000*	1,72134	,000	13,8948	27,7052
		5,00	19,75000*	1,72134	,000	12,8448	26,6552
	5,00	1,00	-,70000	1,72134	,992	-7,6052	6,2052
		2,00	1,15000	1,72134	,955	-5,7552	8,0552
		3,00	1,05000	1,72134	,967	-5,8552	7,9552
		4,00	-19,75000*	1,72134	,000	-26,6552	-12,8448

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Rebeca Curipoma

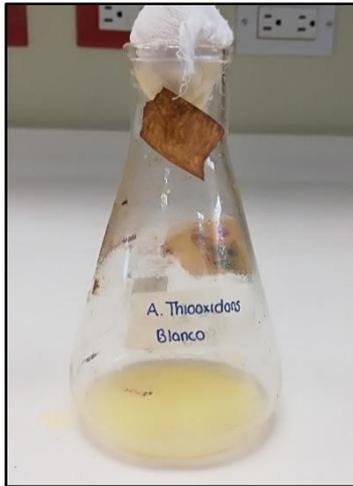
**Tabla 3.4.** Análisis post-hoc de Tukey para las células adheridas del consorcio formado por *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* adaptadas a diferentes inductores (hierro y galactosa). Dónde: 30 Lf/70At (1), 40Lf/60At (2), 50Lf/50At (3), 60Lf/40At (4), 70Lf/30At (5) % v/v.

Variable dependiente	(I) Consorcios	(J) Consorcios	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Células	1,00	2,00	3,15000	1,42618	,308	-2,5711	8,8711
		3,00	-1,85000	1,42618	,705	-7,5711	3,8711
		4,00	-16,40000*	1,42618	,000	-22,1211	-10,6789
		5,00	-4,90000	1,42618	,087	-10,6211	,8211
		1,00	-3,15000	1,42618	,308	-8,8711	2,5711
	2,00	3,00	-5,00000	1,42618	,081	-10,7211	,7211
		4,00	-19,55000*	1,42618	,000	-25,2711	-13,8289
		5,00	-8,05000*	1,42618	,013	-13,7711	-2,3289
		1,00	1,85000	1,42618	,705	-3,8711	7,5711
		2,00	5,00000	1,42618	,081	-,7211	10,7211
	3,00	4,00	-14,55000*	1,42618	,001	-20,2711	-8,8289
		5,00	-3,05000	1,42618	,331	-8,7711	2,6711
		1,00	16,40000*	1,42618	,000	10,6789	22,1211
		2,00	19,55000*	1,42618	,000	13,8289	25,2711
		3,00	14,55000*	1,42618	,001	8,8289	20,2711
	4,00	5,00	11,50000*	1,42618	,003	5,7789	17,2211
		1,00	4,90000	1,42618	,087	-,8211	10,6211
		2,00	8,05000*	1,42618	,013	2,3289	13,7711
		3,00	3,05000	1,42618	,331	-2,6711	8,7711
		4,00	-11,50000*	1,42618	,003	-17,2211	-5,7789

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Rebeca Curipoma

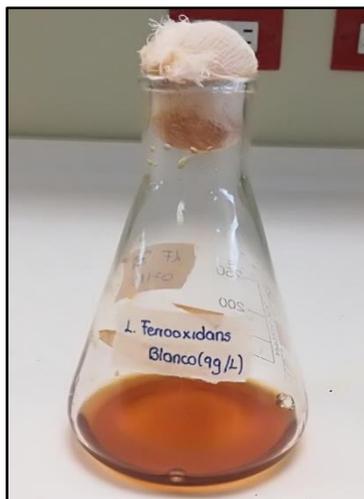
#### ANEXO 4.- FOTOS



**Figura 3.21** Cultivo del microorganismo *A.thiooxidans*.



**Figura 3.22.** Adaptación del microorganismo *A.thiooxidans* a galactosa.



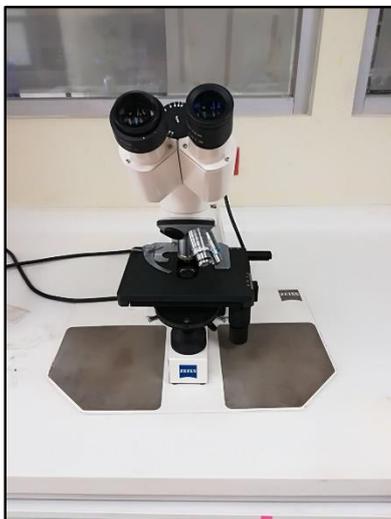
**Figura 3.23.** Cultivo del microorganismo *L. ferroxidans*.



**Figura 3.24.** Adaptación del cultivo del microorganismo *L. ferroxidans* a hierro.



**Figura 3.25.** Inoculación de proporción de cada especie microbiana sobre el mineral aurífero refractario.



**Figura 3.26.** Microscopio para conteo celular.



**Figura 3.27.** Cámara de Petroff-Hausser



Figura 3.28. Control de pH



Figura 3.29. Determinación de proteína



Figura 3.30. Centrifugación de determinar proteína.



Figura 3.31. Espectro UV visible.