



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULO DE BIÓLOGO

Aislamiento y caracterización molecular de bacterias acidófilas nativas del sector minero Tundayme perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe.

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Iñiguez Jiménez, Hugo Vicente

DIRECTOR: Paulina Isabel Aguirre Chamba., Ing.

LOJA – ECUADOR

2016



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>

Septiembre, 2016

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniera.

Paulina Isabel Aguirre Chamba

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Aislamiento y caracterización molecular de bacterias acidófilas nativas del sector minero Tundayme perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe** realizado por **Hugo Vicente Iñiguez Jiménez**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Febrero de 2016

F.....

C.I.: 1104265226

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Hugo Vicente Iñiguez Jiménez declaro ser el autor del presente trabajo de titulación: **Aislamiento y caracterización molecular de bacterias acidófilas nativas del sector minero Tundayme perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe** de la Titulación de **Biología**, 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 de posibles reclamos o acciones 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

F.....

Hugo Vicente Iñiguez Jiménez

1104668866

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios, por haber sido mi guía, en especial en los momentos más importantes de mi vida y de mi formación profesional.

A mis padres Hugo y Piedad quienes me han dado la vida y supieron guiarme por el buen camino, dándome fuerzas para seguir adelante y consejos para no desmayar en los problemas, sin desfallecer en el intento.

A mis hermanos Diana y Juan Carlos por estar siempre presentes, acompañándome hasta en los momentos más difíciles.

A mis abuelos, tíos y primos que con paciencia y ejemplo me han enseñado el verdadero sentido de la unión, apoyo, amor y superación.

Dedico en especial a mi esposa Karen por ser el pilar fundamental para seguir adelante y crecer, a mi hijo José Francisco quien me da mi motivación, inspiración, felicidad, los mismos con su presencia me da fuerzas suficientes para conseguir mis metas y seguir adelante.

A todas las personas que me han apoyado y han sido parte durante el transcurso de mi formación: Profesores, docentes, compañeros de clases y de laboratorio, amigos (as), Gracias full...!!

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por guiarme durante todo mi camino dándome fuerzas para superar obstáculos y seguir superándome.

A mis profesores a quienes les debo la gran parte de mis conocimientos, gracias por su paciencia y enseñanza.

A la Ing. Paulina Aguirre por darme oportunidad de realizar este proyecto y apoyarme, a Mg. Diego Nieto y Bq. Oscar Vivanco por toda la colaboración y guía brindada durante el inicio hasta el final de este proyecto. Al igual por el apoyo constante de mis compañeros del departamento.

A mis amigos y compañeros: Carlos, Cesar, Diego, David, Cristian, Anabel, por su gran amistad y apoyo durante todo este periodo de formación.

Especialmente Agradezco al Ing. José Ochoa y Dra. Kathy Ordoñez por todo el apoyo que me han podido brindar durante todo este tiempo.

A los amores de mi vida Pipito Iñiguez y Karen Ochoa quienes me han alentado, ayudado durante toda esta formación.

Gracias a todos los que han brindado su ayuda durante este proyecto..

Hugo V. Iñiguez Jiménez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO 1 MARCO TEÓRICO.....	5
1.1Biominería.....	6
1.2 Biominería en el Ecuador.....	7
1.3 Aislamiento de bacterias acidófilas en medios sólidos y líquidos.....	7
1.4 Mecanismo de biolixiviación y biooxidación.....	8
1.4.1 Mecanismo de cooperación.....	8
1.5 Microorganismos involucrados en el proceso de biolixiviación.....	9
1.6 Técnicas de identificación microbiana.....	11
1.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
1.6.2 Región 16S rADN.....	12
1.6.3 Electroforesis.....	12
1.7 Objetivos.....	13
1.7.1 Objetivo general.....	13
1.7.2 Objetivos específicos.....	13
 CAPITULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	 14
2.1 Muestreo en el sector minero Tundayme.....	15
2.2 Diseño experimental.....	15
2.2.1 Preparación de los matraces para aislamiento de cada microorganismo.....	16
2.2.2 Análisis de laboratorio.....	16
2.2.2.1 Cuantificación de microorganismos.....	16
2.2.2.2 Determinación de la velocidad de crecimiento.....	16
2.2.2.3 Determinación de pH.....	17
2.2.3 Análisis de datos para determinar los mejores aislados.....	17
2.2.4 Evaluación de los mejores aislados.....	17

2.2.4.1 Determinación del ion ferroso y sulfato.....	17
2.3 Identificación de los microorganismos.....	18
2.3.1 Características morfológicas.....	18
2.3.1.1 Tinción Gram.....	18
2.3.2 Amplificación de la región 16S rADN.....	18
2.3.2.1 Extracción de ADN genómico.....	18
2.3.2.2 Cuantificación de ADN total.....	18
2.3.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	19
2.3.2.4 Visualización de amplicones.....	19
 CAPITULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 20
3.1 Aislamiento de los microorganismos.....	21
3.1.1 Cuantificación de microorganismos.....	22
3.1.2 Determinación de la velocidad de crecimiento.....	24
3.1.3 Determinación de pH.....	25
3.2 Análisis de datos para determinar los mejores aislados.....	27
3.2.1 Análisis factorial en medio 9k para el aislado 1.....	27
3.2.2 Análisis factorial en medio 9k para el aislado 2.....	29
3.2.3 Análisis factorial en medio 9k para el aislado 3.....	30
3.3 Evaluación de las mejores cepas aisladas.....	32
3.3.1 Productividad volumétrica de hierro y sulfatos de microorganismos aislados.....	32
3.3.1.1 Análisis de la oxidación de ion ferroso y producción de ion férrico para el aislado 1.....	33
3.3.1.2 Cinética de crecimiento en medio 9k para el aislado 1.....	34
3.3.1.3 Análisis de sulfatos en medio 9k del aislado 2.....	35
3.3.1.4 Cinética de crecimiento en medio 9k para el aislado 2.....	36
3.3.1.5 Análisis de oxidación de ion ferroso y producción de ion férrico para el aislado 3.....	37
3.3.1.6 Cinética de crecimiento en medio 9k para el aislado 3.....	38
3.3.2 Determinación del pH en los medios de cultivo seleccionados.....	39
3.3.2.1 Concentración de Fe^{2+} en función de la acidez del medio (pH) en medio 9k para el aislado 1.....	39
3.3.2.2 Concentración de sulfatos en función de la acidez del medio (pH) en medio 9k para el aislado 2.....	40
3.3.2.3 Concentración de Fe^{2+} en función de la acidez del medio (pH) en medio 9k para el aislado 3.....	41

3.4 Identificación de los microorganismos.....	43
3.4.1 Caracterización morfológica de los aislados.....	43
3.4.1.1 Tinción Gram.....	43
3.4.2 Amplificación de la región 16S rADN.....	44
3.4.2.1 Detección por PCR de los 3 matraces seleccionados.....	44
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXOS.....	55

RESUMEN

En el presente estudio se realizó el aislamiento y caracterización de microorganismos nativos del sector minero Tundayme con capacidad de oxidar sulfuros metálicos; útiles para posteriores aplicaciones en la biominería. Se utilizó el medio de cultivo 9k para aislar los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* con valores de pH (6.5, 1.2, 2.4, 1.8) y temperaturas (20 y 30°C). Se obtuvieron 48 ensayos iniciales de los cuales se seleccionó los 6 mejores cultivos (M1, M3, M5, M7, M9, M11), posterior, se determinó sus capacidades oxidativas a través de la cuantificación del consumo de Fe^{2+} , producción de Fe^{3+} y sulfatos.

Finalmente se logró obtener microorganismos gram-negativos que presentan la región 16S rADN, con tamaños de banda aproximados a 1500pb; de igual manera presentaron buena capacidad para oxidar hierro y azufre; las condiciones óptimas de crecimiento para el aislado 1 fue de pH1.8 a 30°C el cual presento (Qp)=0.530 g/Ldía de Fe^{3+} (M7), para el aislado 2 fue pH6.5 a 30°C con (Qp)=0.116 g/Ldía de sulfatos (M9) y para el aislado 3 fue pH1.2 a 30°C con (Qp)=0.340 g/Ldía de Fe^{3+} (M11).

Palabras Claves: Medio 9K, pH, temperatura, gen 16S rADN.

ABSTRACT

In the present study it was realized the isolation and characterization of native microorganisms of the mining sector Tundayme with capacity to oxidize metallic sulfides; useful for later applications in the biominería. Used medium of cultivate 9k to isolate the genre *Acidithiobacillus* and *Leptospirillum* with values of pH (6,5, 1.2, 2.4, 1,8) and temperatures (20 and 30°C). Were obtained 48 initial tests of which it selected the 6 better cultivies (M1, M3, M5, M7, M9, M11), later determined their oxidating capacities through quantification of the consumption of Fe^{2+} , production of Fe^{3+} and sulfates.

Finally it was managed to obtain gram-negative microorganisms, that present the region 16S rADN with sizes of band approximated to 1500pb; of equal way they presented good capacity to oxidize iron and sulfur; the optimal conditions in culture medium for isolated 1 was pH 1.8 and 30 °C which had volumetric productivity (Qp) of 0.530 g/Lday ferric ion (M7), for isolated 2 were pH 6.5 and 30 °C with volumetric productivity (Qp) was 0.116 g/Lday sulfate (M9) and for isolated 3 were pH 1.2 and 30 °C with volumetric productivity (Qp) of 0.340 g/L ion ferric.

Keywords: Medium 9k, pH, temperature, gen 16S rADN.

INTRODUCCIÓN

Por mucho tiempo se pensó que el proceso de extracción de metales era un proceso netamente físico-químico, sin embargo el descubrimiento de bacterias acidófilas ferro y sulfo-oxidantes ha sido primordial para definir a la biominería como una tecnología que comprende distintos procesos los cuales son catalizados por microorganismos, teniendo como objetivo principal la recuperación de metales de interés comercial (Donati, 2006; Guerrero, 2004).

Dichos procesos pueden presentarse en dos distintas formas, la primera es la biolixiviación, esta ocurre cuando los microorganismos solubilizan los componentes de una matriz sulfurada para poder extraer un metal presente en las minas o en un concentrado mineral, teniendo como producto final una solución ácida la cual contiene el metal en forma soluble, por ejemplo el cobre (Guerrero, 1998). La segunda es la biooxidación, esta ocurre cuando el elemento a recuperar no puede ser solubilizado por los microorganismos, pero su presencia beneficia la recuperación del mismo, a través de la degradación de la matriz mineral en la que está ocluido el elemento de interés, por ejemplo la recuperación del oro. En ambos procesos el ataque de los microorganismos al mineral se puede dar de dos diferentes maneras; la primera hace referencia a que el microorganismo genera un compuesto extra polimérico (EPS) la cual ayuda a adherirse directamente a la matriz sulfurada, mientras que la segunda comprende a microorganismos suspendidos en el medio los cuales atacan al mineral de una forma indirecta (Donati, 2006).

Con el advenimiento de nuevas técnicas de la biología molecular y celular, se ha comprobado que existen varias decenas de microorganismos que actúan en estos procesos, siendo generalmente bacterias y arqueas la cuales se encuentran asociados a sulfuros metálicos y habitan en los más variados lugares del planeta, siendo los depósitos minerales uno más de estos hábitats (Muqing et al., 2006; Pronk, 1991). Las especies más estudiadas debido a su interés en estos procesos son el género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*; estos microorganismos son quimiolitotóxicas, acidófilas y aerobias obligadas, no son patógenas, gram-negativas, se reproducen por fisión binaria, tienen forma de bastón, cilíndricas o en espiral, su tamaño promedio es de 0.5 a 0.6 μm de ancho y 1 a 2 μm de largo (Bosecker, 2001).

El aislamiento de estos microorganismos se lo realiza combinando las técnicas de enriquecimiento y separación de especies por siembras sucesivas de crecimiento bacteriano en medio líquido siendo el medio de cultivo 9k el que presenta mejores resultados (Silverman y Lundgren, 1959).

La aplicación de la biotecnología en actividades mineras metalúrgicas se ha convertido en una alternativa viable para la extracción y recuperación de metales presentes en las minas o en soluciones acuosas contaminantes, reduciendo el impacto ambiental causado por los subproductos de las operaciones mineras tradicionales (Benítez, 2009).

Por tal motivo el presente estudio se enfoca en la comprensión de dichas aplicaciones las cuales describe de manera organizada los siguientes apartados: el capítulo 1 corresponde al marco teórico, en la cual se describen las bases teóricas para la comprensión de esta investigación, también se mencionan los tipos de bacterias acidófilas que intervienen, sus mecanismos de acción bacteriana y sus medios de cultivo, al igual que los distintos factores que son herramientas importantes para un buen desarrollo en el crecimiento microbiano que deben ser considerados antes y durante la biooxidación.

En el capítulo 2 se describe la metodología empleada en la presente investigación: la selección de la zona muestreada, el diseño experimental utilizado, las distintas técnicas de control para llevar a cabo el aislamiento y los análisis para el proceso de biooxidación. El capítulo 3 muestra los resultados del estudio como son: la selección de los mejores aislados, los métodos estadísticos para el análisis de resultados, el consumo y producción de hierros y sulfatos, tinción gram, análisis de la región 16S rADN.

La aplicación de bacterias nativas es un proceso muy ventajoso para las zonas mineras del Ecuador debido a q posee yacimientos de cobre, oro y molibdeno, en especial en la provincia de Zamora Chinchipe, en el sector minero Tundayme, los cuáles son de interés para el estado ecuatoriano, razón por la cual se deben enfocar esfuerzos en investigaciones que permitan el desarrollo de la biominería (Paladines, 1989).

El objetivo del presente estudio fue el aislamiento de microorganismos presentes en el sector Tundayme a partir de muestras de sedimento y drenajes ácidos, para continuar con su adaptación y estudio en los laboratorios de la UTPL y así poder establecer factores ideales de crecimiento, las distintas características morfológica y el análisis de la región 16S rADN; y finalmente establecer su posible aplicación en la minería para el aprovechamiento de los recursos mineros.

CAPITULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Biominería.

La biominería tiene sus raíces en la hidrometalurgia, ciencia que se remonta de 177–122 AC (Rossi, 2001). El inicio de la hidrometalurgia se dio con el proceso de cementación del cobre, el cual tiene como objetivo la recuperación del ion Cu^{2+} a partir de soluciones ácidas de sulfato de cobre, mediante tratamiento con iones metálicos como el hierro (Ehrlich, 1998). Años después a mediados de la década del cuarenta se inicia el advenimiento de la biominería con el descubrimiento de bacterias sulfo-hierro-oxidantes (Temple y Colmer, 1951; Acevedo, 2000). Estudios han demostrado que dichas bacterias fueron eficaces en la biooxidación de la pirita y la biolixiviación de sulfuros de cobre como la calcopirita (Brierley, 2008; Brierley y Brierley, 2001). En las últimas décadas se llegó al consenso de que la biominería descende de la unión de la biotecnología y la hidrometalurgia, donde el desarrollo de estos procesos se da como resultado de la interacción de los microorganismos en un sustrato mineral (Morin *et al.*, 2006).

La biominería se puede dividir en dos ramas: la primera es la biolixiviación, se basa en la recuperación de metales base como (cobre, cobalto, níquel, zinc, uranio entre otros), la bacteria cataliza el proceso poniendo en solución el metal de interés para finalmente recuperar el metal de la solución y el residuo sólido se desecha. La segunda, biooxidación, es un proceso de pre-tratamiento donde el empleo de bacterias tiene como objetivo eliminar la interferencia del sulfuro, generalmente es pirita o arsenopirita, que contiene oculto el oro y/o plata, donde el valor metálico permanece en fase sólida para su posterior recuperación (Rohwerder y Sand, 2003).

En los últimos años debido a la creciente resistencia a la explotación minera y, en especial, a aquella dirigida a la recuperación de metales. La biominería constituye una alternativa sustentable debido a que ciertos microorganismos catalizan a temperaturas altas o moderadas en la disolución de sulfuros metálicos; estos microorganismos son usualmente oxidantes de hierro y azufre, además son resistentes a altas concentraciones de metales pesados y a pHs muy ácidos. Esta tecnología se aplica con éxito a nivel comercial para la recuperación de oro, cobre, cobalto, entre otros. (Donati, 2006).

El impacto ambiental producido por la actividad minera se puede definir como el cambio que se produce en el medio ambiente, desde que comienza esta actividad, el período de desarrollo y hasta el momento que termina, provocando daño debido a la liberación de sustancias tóxicas, drenaje ácido de minas, emisión de polvo, ruido, contaminación de ríos, etc (Andrews *et al.*, 2004), por lo que se hace frecuente la búsqueda de métodos menos contaminantes en la extracción de metales, ya que se ha visto que los métodos tradicionales generan altos costos económicos y ambientales, debido a la utilización de procesos químicos que producen alto índice de contaminación (Agudelo *et al.*, 2002). La biominería es

una alternativa económicamente más viable y ambientalmente más amigable que metodologías tradicionales; debido a que requiere poca inversión de capital, puede operar en áreas remotas ya que su proceso es fácil de controlar, poca contaminación ambiental, siendo esta técnica aplicada con éxito en la gran minería (Saavedra, 2014).

1.1 Biominería en el Ecuador.

Las provincias de Zamora Chinchipe y Morona Santiago se encuentran atravesadas por los cinturones de oro-plata y de cobre-molibdeno. Debido a esto se emprenden proyectos de exploración que cuantifican hasta la fecha reservas de alrededor de 20 millones de onzas de oro, 40 millones de onzas de plata y 30 mil millones de libras de cobre (Paladines, 2010).

Algunas de las reservas de metales preciosos en el territorio nacional y en especial los ubicados en la provincia de Zamora Chinchipe, están asociados a sulfuros, sulfatos y óxidos. Por lo que el país debe enfocar sus esfuerzos en investigaciones y desarrollar la biominería, iniciando con el conocimiento de la geobiodiversidad, un término que busca la ventaja comparativa y competitiva con las técnicas convencionales arraigadas especialmente en la pequeña minería y minería artesanal (Acevedo, 2002).

A nivel nacional no se realiza pre-tratamiento a las minas refractarias, ni se ha efectuado la biooxidación de minerales de baja ley de manera comercial. Por este motivo se cree que ocurren grandes pérdidas de ellos, en especial en las minas menos tecnificadas (Muñoz, 2003). De ahí se debe desarrollar investigaciones en geo-microbiología y aplicarlas a los diferentes sectores mineros como una herramienta biotecnológica que busca favorecer la recuperación de recursos naturales del Ecuador, además es considerada una alternativa de remediación ambiental.

1.2 Aislamiento de bacterias acidófilas en medios sólidos y líquidos.

Una alternativa biológica para el problema de la industria minera es la utilización de microorganismos biolixiviadores, los cuales se encuentran presentes en los micro ambientes ricos en metales, convirtiéndose en una buena opción para su lixiviación (Agudelo *et al.*, 2002). El aislamiento de las bacterias acidófilas sulfo hierro oxidantes se encuentran en muestras heterogéneas de microorganismos, o cultivos mixtos, se lo realiza combinando técnicas de enriquecimiento y separación de especies por crecimiento en medio sólido o líquido (Butler y Kempton, 1978).

Han sido muchos los medios propuestos para el cultivo de estas bacterias por diluciones de sales inorgánicas con las que aportan N, P y K como nutrientes y una fuente de energía que puede ser hierro (II) o una de las formas reducidas de azufre. Entre los medios líquidos con

ion ferroso como fuente de energía, cabe destacar los conocidos como “9K” (Silverman y Lundgren, 1959), medio de Temple y Colmer (Temple y Colmer, 1951) medio de Leathen y col. (Leathen *et al.*, 1956) y el medio propuesto por Tuovinen y Kelly (Tuovinen y Kelly, 1973). Pero el más empleado es el medio “9K” de Silverman y Lundgren, debido a que presenta mejores resultados de crecimiento para el aislamiento de bacterias acidófilas.

Los medios con alguna forma reducida de azufre son el medio tiosulfato (Colmer *et al.*, 1950) y sales básicas del medio 9k con azufre elemental, tiosulfato o sulfuros metálicos como fuente de energía (Carranza *et al.*, 1983).

Debido a la tendencia que presentan estas bacterias para adherirse a sustratos sólidos, el crecimiento bacteriano se mide de manera indirecta. Es por esto que en los medios de cultivo con hierro (II) se valora además la concentración de hierro (III) como resultado de la biooxidación del ion ferroso. En medios con formas reducidas de azufre se emplea el valor del pH como medida indirecta del crecimiento y empleo de dichos sustratos como fuente de energía y producción de sulfatos.

1.3 Mecanismo de biolixiviación y biooxidación.

La biolixiviación se expresa como la acción directa o indirecta de microorganismos en una determinada materia prima; por lo tanto en su simple definición ya se contemplan la existencia de mecanismos como el directo (de contacto), el mecanismo indirecto (no contacto) o de ambos simultáneamente (de cooperación) (Acevedo y Gentina, 2005).

Mediante estos mecanismos los microorganismos oxidan y disuelven los sulfuros ya que emplean el hierro y azufre como fuente de energía y como fuente de carbono el CO₂ (González, 1999; Arroyave, 2008).

Es por esto que la lixiviación de la pirita en presencia de cultivos puros de distintas bacterias suministra resultados interesantes. Por ejemplo, bacterias como *A. thiooxidans*, sólo son capaces de oxidar especies reducidas del azufre, es por esto que en la en la disolución de minerales que contienen hierro como la pirita no son efectivos, pero en si su mecanismo directo involucra la acción oxidante de bacterias que se adhieren a la superficie del sulfuro metálico por un sistema enzimático específico (Sand *et al.*, 1999).

1.4.1 Mecanismo de cooperación

En los mecanismos de contacto y no contacto actúan bacterias que se adhieren a la superficie del mineral y las que se encuentran libres en el medio líquido (Figura 1). Así, durante la biolixiviación de estos sulfuros se detectan tres etapas: una inicial con una alta adherencia de las bacterias al mineral, la cual es necesaria para alcanzar altas velocidades

de disolución debido a la liberación de iones ferrosos por lixiviación por contacto. La segunda etapa corresponde a que el número de células suspendidas en medio líquido aumenta, debido tanto a la saturación de la superficie del mineral en cuanto a células adheridas, como a la presencia de Fe^{2+} en disolución. Esto favorece al incremento de células hierro-oxidantes generando una mayor concentración de Fe^{3+} y, por tanto, un mejor ataque del mineral. Y, finalmente, hay una tercera etapa en la cual se alcanza un equilibrio entre las células adheridas y las libres dando lugar a un mecanismo de lixiviación cooperativa, esta consta de microorganismos que se encuentran adheridos a la superficie mineral y lixivian pirita y azufre, por tanto, liberan especies químicas portadoras de energía que alimentan a las bacterias que se encuentran suspendidas en el líquido de los alrededores. Este comportamiento puede favorecer la supervivencia de las bacterias al estar produciendo un suministro óptimo de energía química a partir de una superficie limitada de sulfuros. (Acevedo y Getina, 2005).

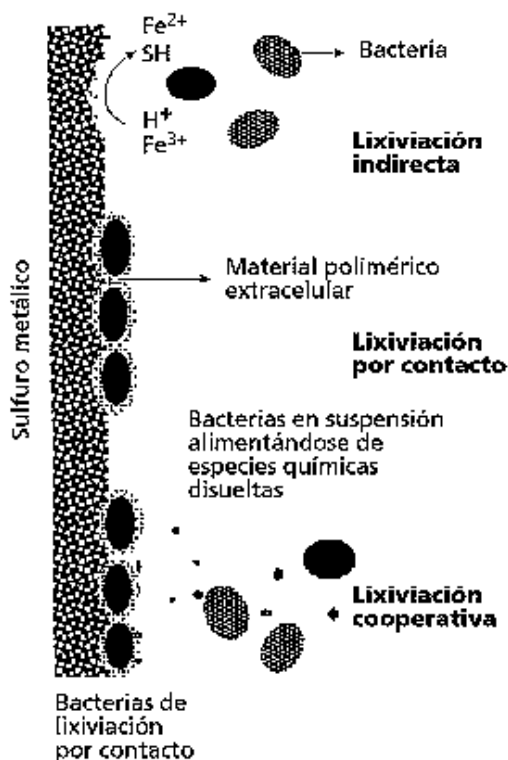


Figura 1. Diferentes tipos de lixiviación según (Tributsch, 2001).

1.4 Microorganismos involucrados en el proceso de biolixiviación.

Los microorganismos que actúan en estos procesos son bacterias de diversos géneros y especies, principalmente acidófilas, crecen en ambientes ácidos y a su vez tienen la capacidad de generar ambientes ácidos ($\text{pH} < 3$) por la producción de ácido sulfúrico que es producto de su metabolismo. Además, son quimiolitotrófos, capaces de oxidar compuestos inorgánicos como azufre y/o hierro ferroso, siendo esta una de las principales razones para

que los minerales se conviertan en fuente de energía para las bacterias (Rohwerder y Sand, 2003). A estos microorganismos también se los clasifican dependiendo a su resistencia a la temperatura, es decir, a microorganismos que soporten altas temperaturas por encima de los 45 °C se los denomina termófilos, uno de los más estudiados es la arquea *Sulfolobus*, a microorganismos que crecen a temperaturas entre 25 y 35 °C se los denomina mesófilos, entre los géneros microbianos que más destacan son *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* que han sido utilizados en procesos de biooxidación a nivel industrial. Estas características de los microorganismos han jugado un papel importante para la industria de la minería y la metalurgia en la oxidación de sulfuros (Tabla 1) (Donati, 2006; Suzuki, 2001).

Tabla 1. Características de los microorganismos involucrados en el proceso de biolixiviación

Microorganismo	Aislamiento	Características y diámetro	Respiración celular, Temp y pH	Fuente de energía
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Primera bacteria que se descubrió y fue aislada de drenajes ácidos en minas de carbón (Colmer y Hinkle, 1947)	No patógenas, gram-negativas, forma bacilar (algunas tienen flagelo), diámetro entre 0.4 - 0.8µm y long. 0.9 - 2.0 µm, extremos redondeados (Mejía, 2010; Ospina <i>et al.</i> , 2011).	Son aerobios, su aceptor final de electrones es el oxígeno, (se desarrolla a valores de pH entre 1.5 y 3) y mesófilos (requieren de temperaturas que oscilan entre 25 - 35 °C) (Rosales <i>et al.</i> , 2001).	Son quimiolitotróficas, obtienen energía para su crecimiento de la oxidación de ion ferroso y compuestos reducidos del azufre, y su fuente de carbono es el CO ₂ atmosférico (Mejía, 2010; Rossi, 1990).
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Se lo puede encontrar en depósitos de azufre y sulfurosos, donde es fácil aislarlos. Fue aislada por Waksman y Joffe en 1992.	Tiene forma de barra con extremos redondeados, área total de 0.90 a 3.00 - 0.30 a 0.60 µm. Gram negativas	Adapta a un pH de 2.0, es decir, es un microorganismo acidófilo. Son aerobios su aceptor final de electrones es el oxígeno. Temp de 20 – 30 °C.	Es autótrofa y quimiolitótrofa (la energía que la obtiene a partir del sustrato inorgánico el azufre elemental (S), sulfuro de hidrogeno (H ₂ S), tiosulfato (H ₂ S ₂ O ₃) y otros compuestos reducidos de azufre.

<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Encontrada en un medio mineral de sulfuros de cobre en Armenia, por Markosyan en 1972 (Rossi, 1990). Pertenecce a la división Nitrospira (Donati, 2006).	Gram negativas, con forma espiral, ancho de 0.3 - 0.5 μm y longitud de 0.9 a 3.0 μm	Tolerantes a (pH óptimo 1.5 - 1.8) (López, 2007; Rosales <i>et al.</i> , 2001). Crecen a Temp entre 20 a 40 °C, (Rossi, 1990). Son aerobios estrictos (requiere oxígeno gaseoso).	Quimiolitotróficos, solo pueden utilizar Fe^{2+} como donador de electrones, no se ve inhibida por el Fe^{3+} , razón por la cual es de gran aplicación en procesos de biooxidación (López, 2007; Rosales <i>et al.</i> , 2001).
---	--	---	---	--

1.5 Técnicas en la identificación microbiana.

Las técnicas morfológicas y fisiológicas tradicionales para identificar microorganismos son lentas, requieren mucho trabajo y no son concluyentes (Chen *et al.*, 2008). Por esto para lograr la identificación de los microorganismos aislados se realiza su análisis moleculares para comprobar con certeza a que genero pertenecen (García-Fraile, 2008). Entre estas técnicas tenemos; extracción de ADN, reacción de PCR, análisis de la región 16S rADN, entre otras (Hallin, 2009; Martin-Laurent *et al.*, 2001).

1.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular, debido a que permite obtener in vitro millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula.

La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias proteínas para sintetizar nuevas hebras de ADN a partir de la hebra molde (Bolívar, 2014; Medina *et al.*, 2010).

En procariontes se han encontrado al menos 12 proteínas involucradas en la replicación, es originalmente descrita por Mullis y Faloona (1987), posteriormente se le dio varias aplicaciones que permitieron establecerla como una técnica de rutina en laboratorios clínicos, forenses y de investigación debido a que puede generar una gran cantidad de copias ($>10^7$) de un fragmento molde o diana de ADN, que está limitado por secuencias conocidas en cadenas opuestas como los cebadores (Ramírez, 2000).

La PCR amplifica una secuencia de ADN en grandes cantidades mediante el uso de una polimerasa termoestable, la Taq ADN polimerasa, aislada originalmente del microorganismo *Thermus aquaticus* (Ramírez, 2000), en su proceso se necesita el uso de primers apropiados para dirigir la amplificación de la región de DNA deseada y temperaturas optimas (Herrera, 2007).

1.6.2 Región 16S rADN

Dentro de la caracterización molecular de bacterias, la secuenciación y el análisis del gen 16S que codifica el ADN ribosómico (rADN) es la región de identificación más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía de bacterias (Lane *et al.*, 1985). El 16S rADN, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500bp, de una región genómica altamente conservada, es decir, que es poco afectado por las presiones ambientales, las secuencias más conservadas son útiles en la unión de cebadores universales para la amplificación del gen de interés y su variación en los fragmentos a partir de cuya secuenciación da información que permite diferenciar filogenéticamente grupos taxonómicos y obtener información filogenética (Rodicio y Mendoza, 2004).

1.6.3 Electroforesis.

La concentración e integridad de distintos fragmentos de PCR pueden ser verificadas mediante electroforesis en geles de agarosa, que consiste en la separación de los productos por tamaño (peso molecular) a través de una matriz tamponada de agar en un campo eléctrico, dependiendo de la cantidad del producto y el tamaño del fragmento amplificado, (Herrera, 2007). La electroforesis de ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas del ADN recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizar la técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a Vin Thorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se obtenían de partículas purificadas de polyomavirus (Cann, 1989).

1.7 Objetivos.

1.7.1 Objetivo general.

Aislar, optimizar condiciones de crecimiento y determinar fragmento 16S rDNA amplificados de microorganismos acidófilos nativos provenientes de sedimentos y drenajes ácidos de yacimientos cupríferos de la provincia de Zamora en el sector Tundayme, que puedan ser útiles en el proceso de biolixiviación de minerales de interés.

1.7.2 Objetivos específicos.

- Aislar microorganismos acidófilos para género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*) en medios sintéticos a partir de drenajes ácidos y sedimentos.
- Determinar la cinética de crecimiento de los microorganismos aislados en medio sintético y establecer los mejores ensayos.
- Cuantificar el consumo de Fe^{2+} , la producción de Fe^{3+} y sulfatos de los matraces seleccionados.
- Determinar el pH del medio de cultivo donde se da el crecimiento microbiano de los matraces seleccionados.
- Caracterizar la diversidad genética del gen 16S de los consorcios microbianos seleccionados.

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo en el sector minero Tundayme.

En base a la información geológica manejada por el estado en función de los proyectos estratégicos de minería del Ecuador se estableció la zona de muestreo, la cual se caracterizó por presentar altos grados de meteorización de rocas mineralizadas y presencia de drenajes ácidos de mina (DRAM). El sector escogido fue geo-referenciado con coordenadas UTM hemisferio Sur, zona 17, X=779947m, Y=9604276m, altura de 911m.s.n.m.

Las muestras recolectadas fueron de drenajes ácidos y sedimentos, a las cuales se les midió el pH y temperatura, se los colocaron en frascos estériles y fueron transportados al Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad Técnica Particular de Loja para proceder con el aislamiento.

2.2 Diseño experimental.

Para el análisis de las muestras recolectadas se estableció un diseño factorial 2^2 , para cada muestra, obteniendo 24 ensayos iniciales, los cuales se realizaron por duplicado teniendo un total de 48 ensayos (Anexo 1). En el diseño factorial se combina condiciones de pH y temperatura óptimos para que los microorganismos se puedan desarrollar y así establecer qué combinación en las condiciones están influyendo en el crecimiento de los microorganismos y el más adecuado; el diseño esta descrito en la Tabla 2.

Tabla 2. Diseño factorial para aislamiento de microorganismos acidófilos del sector minero Tundayme.

Medio sintético "9K" para el aislamiento de	Muestras	Factores	Unidad	Alto	Bajo
Género <i>Acidithiobacillus</i> (Aislado 1)	Muestra 1	Temperatura	°C	30	24
		PH		6.5	2.4
	Muestra 2	Temperatura	°C	30	24
		PH		6.5	2.4
Género <i>Acidithiobacillus</i> (Aislado 2)	Muestra 1	Temperatura	°C	30	24
		PH		6.5	1.8
	Muestra 2	Temperatura	°C	30	24
		PH		6.5	1.8
Género <i>Leptospirillum</i> (Aislado 3)	Muestra 1	Temperatura	°C	30	24
		PH		6.5	1.2
	Muestra 2	Temperatura	°C	30	24
		PH		6.5	1.2

Fuente: Minitab 17.

Elaborado por: Hugo Iñiguez

2.2.1 Preparación de los matraces para aislamiento de cada microorganismo.

Para establecer el aislamiento de cada microorganismo se tomó 10 mL de la muestra recolectada previamente de sedimento (M1) o drenaje ácido (M2) y se lo adicionó a un matraz de 250 mL, el cual contenía 88mL de agua desionizada estéril y 2mL de medio 9K (X50) (Anexo 2). El pH del medio se reguló de acuerdo al valor encontrado del sitio muestreado (6.5) y al de referencia bibliográfica para cada microorganismo (1.8, 2.4, 1.2 respectivamente), ya que en los medios de cultivo diferencia uno de otro con sus fuentes de energía y su acidez. Las muestras se incubaron a temperaturas de 20 y 30°C y a 220 rpm en un agitador orbital Max^Q 3000 (Anexo 3).

2.2.2 Análisis de laboratorio.

2.2.2.1 Cuantificación de microorganismos.

Se realizó conteo celular utilizando la cámara de Neubauer con el fin de determinar la cantidad de microorganismos presentes en cada uno de los matraces. Se calculó a través de la (ecuación 1), la cual que indica el número de microorganismos presentes por mL, considerando que en la cámara la rejilla central tiene un área = 0.0025 mm² y volumen = 2.5 x 10⁻⁷ mL (Anexo 4).

$$\frac{\text{Nro.de microorganismos}}{\text{mL}} = \frac{(\text{Nro.de microorganismos contados}) \times (4000000)}{\text{Nro.de cuadrados contados (20)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

2.2.2.2 Determinación de la velocidad de crecimiento.

La velocidad con la que las bacterias se duplican, es directamente proporcional a la densidad bacteriana y sigue una cinética de primer orden indicado en la (Ecuación 2), la misma que fue utilizada por (Manzuelo, 1998; Jaramillo, 2014).

$$\frac{Dx}{Dt} = ctte \cdot x = \mu \cdot x \quad (\text{Ecuación 2})$$

Despejando μ se logra obtener la ecuación de velocidad de crecimiento en función de la concentración celular en función del tiempo.

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

Dónde:

μ = Tasa específica de crecimiento

x = Densidad bacteriana

t = tiempo

2.2.2.3 Determinación del pH.

Se lo realizó midiendo directamente sobre los matraces inoculados con un potenciómetro marca Hanna modelo HI8424.

2.2.3 Análisis de datos para determinar los mejores aislados.

Se efectuó un análisis estadístico con el fin de establecer cuáles fueron las mejores condiciones de cultivo de acuerdo a las diferentes condiciones del diseño experimental establecido. Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de regresión multivariada con el software Minitab 17.

2.2.4 Evaluación de los mejores aislados.

Con el fin de evaluar la eficacia de los mejores aislados para posteriores procesos de biooxidación se efectuaron determinaciones analíticas cada dos horas en un periodo de tres días y obtener valores de: conteo microbiano, determinación de la velocidad de crecimiento y pH, consumo de Fe^{2+} , producción de Fe^{3+} , y producción de sulfatos (González, 1999; Toma *et al.*, 1991).

2.2.4.1 Determinación del ion ferroso y sulfato.

La determinación del ion ferroso se utilizó mediante el método de Muir y Andersen (1977), basado en la formación de un complejo coloreado entre Fe^{2+} y 1.10-fenantrolina cuantificado espectrofotométricamente a 510 nm y se comparó con una curva de calibrado expresado en el (Anexo 6). El hierro total se evaluó por reducción del Fe^{3+} con clorhidrato de hidroxilamina y midiendo el Fe^{2+} resultante de la forma ya descrita. El ión férrico se determinó por diferencia entre ión-ferroso y hierro total. El ion sulfato se determinó por método turbidimétrico, en el cual su precipitación en un medio ácido con cloruro de bario forma cristales uniformes de sulfato de bario, la absorbancia de la suspensión es una medida de

la concentración de iones sulfato, las cuales fueron medidas a 520nm y comparadas con una curva de calibrado (Anexo 7).

2.3 Identificación de los microorganismos.

Se realizó la identificación de los microorganismos de los ensayos escogidos durante el aislamiento, a partir de una nueva resiembra en medios de cultivo cumplidas las 30 horas.

2.3.1 Características morfológicas.

2.3.1.1 Tinción gram.

Se realizaron tinciones gram de las colonias obtenidas durante el proceso de aislamiento con el fin de determinar a qué tipo de microorganismos pertenecen nuestros cultivos de acuerdo a la coloración obtenida; además las observaciones por microscopia óptica nos da una comprensión de las distintas morfologías que puede presentar el consorcio microbiano durante el aislamiento y así poder obtener una aproximación de los microorganismos presentes en los medios, el proceso de tinción gram se explica en el (Anexo 8).

2.3.2 Amplificación de la región 16S rADN.

2.3.2.1 Extracción de ADN genómico.

Una de las técnicas iniciales e importantes para el análisis de la región 16s rADN es la extracción de ADN. A las muestras seleccionadas (M7, M9, M11 y tres muestras control) se les extrajo el ADN genómico usando el Kit de Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, usando el protocolo establecido por la marca para bacterias Gram negativas debido a los resultados obtenidos en las tinciones antes realizadas (Anexo 9).

2.3.2.2 Cuantificación de ADN total.

Se determinó la calidad y cantidad del ADN extraído mediante espectrofotometría, a 260 nm, empleando un Nanodrop (Thermo scientific, Nanodrop 2000c) (Anexo 10). Se colocó 1µL de cada muestra y se midió su absorbancia frente a un blanco de agua estéril.

2.3.2.3 Reacción de la cadena de polimerasa (PCR).

De las muestras obtenidas se extrajo el ADN genómico, posterior se amplificó la región 16S rADN bacteriano mediante PCR, utilizando la combinación de primers universales bacterianos 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3) (Macalady *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2005).

Se colocó el mix de PCR (Anexo 11) de 25 µL para cada muestra y se añadió 2.5 µL de muestra de ADN. Las condiciones térmicas para el proceso de PCR se describen en el (Anexo 12).

2.3.2.4 Visualización de amplicones.

Para la visualización de los amplicones se prepararon geles de agarosa al 2%. En un matraz de 100 mL se mezcló 50mL TBE 1X con 1 g de Agar (UltraPure TM Agarose, Invitrogen), se homogenizó en el microondas por 3 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente por 3 minutos, se adicionó 5 µL de SYBR® Safe - DNA Gel Stain y se vertió en la cubeta de electroforesis con una peinetas hasta que se solidificó (Anexo 13). Seguido se adicionó en cada posillo 3 µL de productos de PCR que se mezclaron con 3 µL de buffer de carga (SYBR Green), y en otro 2 µL de marcador de peso molecular de 1 kb. Posteriormente el gel se corrió a 128 V, 30 mA por 45 minutos. Finalmente se tomó la foto del gel en la cámara de UV marca Enduro GDS Touch (Anexo 14).

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de microorganismos.

Características como el color de las muestras sólidas y líquidas dieron información importante de que la acción de los microorganismos ya habían iniciado un proceso de oxidación del ion ferroso en el sitio muestreado (Anexo 15). Lo que fue útil para la inoculación en los nuevos medios definidos.

El cambio de coloración de los medios de cultivo definidos, debido al proceso de oxidación mediado por microorganismos, fue un indicativo de la adaptación de los mismos, en donde la actividad microbiana inicia el proceso de oxidación del ion ferroso a ion férrico. Este comportamiento en el medio de cultivo, ocurre de la misma manera descrito en el estudio de (Arias *et al.*, 2012) donde los medios de cultivo con adaptación de microorganismos tienen un color rojizo por el cambio de ion ferroso a ion férrico.

En la Tabla 4 se presentan los sub-cultivos realizados en distintos días para el aislamiento en respuesta al cambio de coloración del medio de cultivo (Anexo 15). El resultado de este estudio es similar al estudio obtenido por (Arias *et al.*, 2012) donde el procedimiento se repite hasta obtener organismos completamente adaptados al medio y con la finalidad de reducir el tiempo de viraje al mínimo.

Tabla 4 Resiembras sucesivas de adaptación en el tiempo.

Resiembra	Tiempo de crecimiento (días)
Siembra	18
1. ^a resiembra	14
2. ^a resiembra	10
3. ^a resiembra	8
4. ^a resiembra	6
5. ^a resiembra	4
6. ^a resiembra	2

Elaborado por: Hugo Iñiguez

3.1.1 Cuantificación de microorganismos.

Para los 8 matraces inoculados de cada medio de cultivo en el proceso de adaptación se obtuvieron los siguientes resultados en cuanto a la cuantificación microbiana. La muestra M1 se refiere a una muestra de sedimento, mientras que M2 se refiere a una muestra de drenaje ácido; se realizó un promedio debido a que el análisis se lo realizó por duplicado.

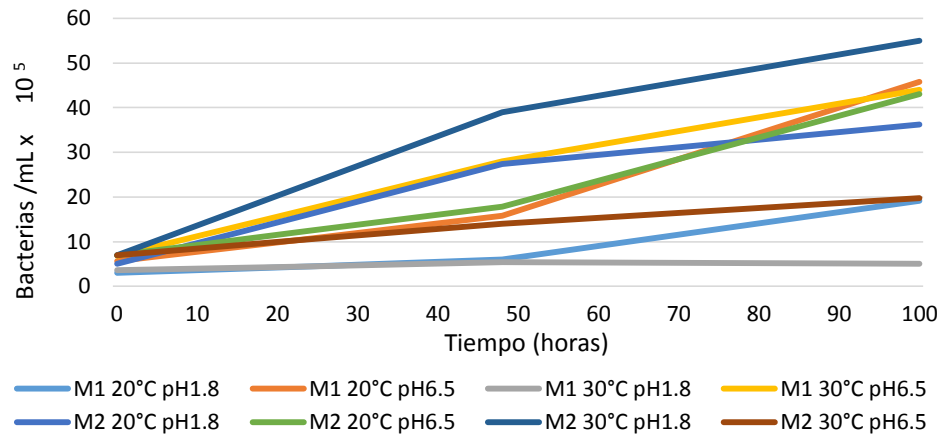


Figura 2. Cinética de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 1).

En la Figura 2 se observa la cinética de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 1) en función del tiempo y de distintas condiciones de crecimiento establecidas de temperatura y pH. Se puede observar que durante las primeras 45 horas aproximadamente los microorganismos crecen exponencialmente, a partir de este tiempo y hasta las 100 horas se puede observar que su crecimiento es más lento y pasara a una fase de declive debido a que su fuente de energía es limitante (Makita *et al.*, 2004).

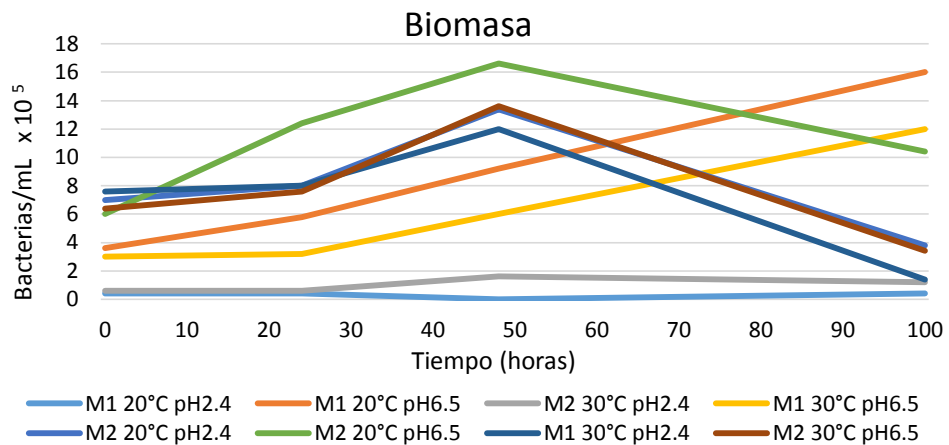


Figura 3. Cinética de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 2).

En la Figura 3 se determina la cinética de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 2) en un periodo de 100 horas y con distintas condiciones de crecimiento; el medio de cultivo utiliza azufre como fuente energética. En la figura también se observan diferencias en las etapas del crecimiento bacteriano de cada uno de los ensayos realizados; se distingue la fase de latencia hasta las 25 horas e inmediatamente se da la fase exponencial y estacionaria a las 50 horas aproximadamente, a partir de este tiempo el crecimiento se detiene en la mayoría de los ensayos y finalmente se comienza la etapa de declive donde la densidad bacteriana disminuye debido a que el recurso es limitando (Osaa y Márquez, 2005). Las bacterias que muestran un crecimiento menor a $2 \text{ mL} \cdot 10^6$ presentan baja adaptación frente a condiciones descritas e indica que dichas condiciones no son adecuadas.

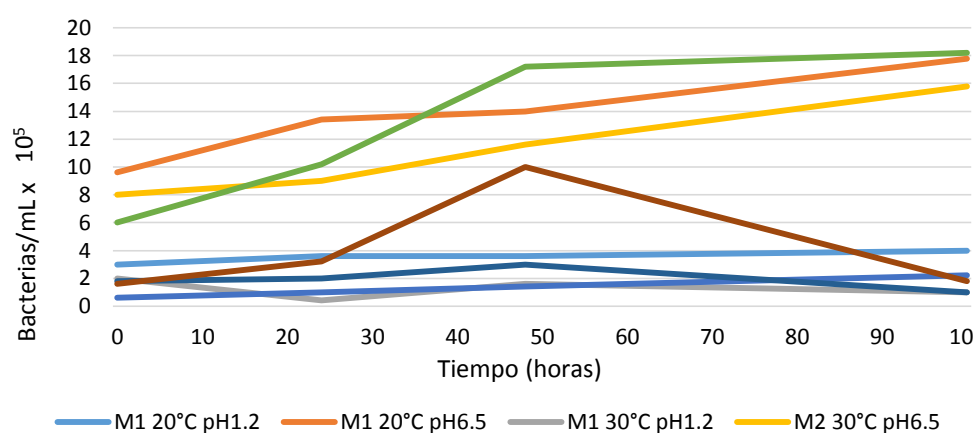


Figura 4. Cinética de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Leptospirillum* (Aislado 3)

En la figura 4 se observa la cinética de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Leptospirillum* (Aislado 3) con diferentes condiciones de crecimiento de pH y temperatura, en la gráfica se puede diferenciar las etapas adecuadas de una cinética de crecimiento bacteriano en medio de cultivo definido, en el cual duraron 100 horas. Se distinguen las fases: de latencia aproximadamente hasta las 24 horas, en las muestras que presentan alto crecimiento y posterior la fase exponencial aproximadamente hasta las 50 horas y seguido se da la fase estacionaria donde se detiene y comienza a estabilizarse el crecimiento de algunas muestras (Juárez y Alcazar, 2004). Las bacterias que muestran un crecimiento menor a $4 \text{ mL} \cdot 10^6$ tienen una baja adaptación a las condiciones descritas; en estudios anteriores de aislamiento se usan condiciones similares y el crecimiento se mantiene en fase exponencial aproximadamente hasta las 48 horas (Rawlings, 2005; Hallmann *et al.*, 1992; Rozas *et al.*, 2007), también explican que existen factores que pueden inhibir el crecimiento bacteriano como es la variación de la disponibilidad de nutrientes, iones férrico y ferroso, pH, Eh, al igual la capacidad metabólica de los microorganismos, y si son nativos pueden ser o no ser tolerantes a contaminantes o a la toxicidad.

3.1.2 Determinación de la velocidad de crecimiento.

Las figuras 5, 6 y 7 que se presentan a continuación nos indican las velocidades de crecimiento en medio de cultivo para el aislamiento de los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* (Aislados 1,2,3) a diferentes condiciones de pH y temperatura; se puede observar que los microorganismos crecen tanto en las condiciones de laboratorio como en las condiciones de ambiente encontradas, siendo este parámetro muy importante debido a que va en función de la cantidad de microorganismos que aumentan en el tiempo. El número de bacterias detuvo su crecimiento cuando la fuente de energía se agotó. En las gráficas se presenta como muestra M1 a muestras de sedimento y M2 como muestra de drenaje ácido.

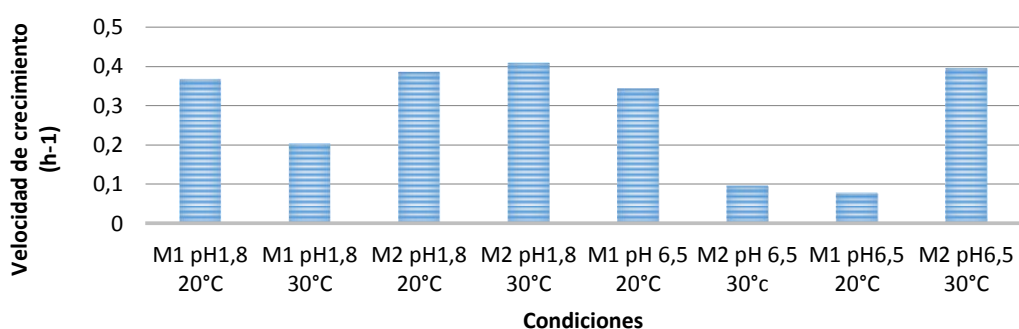


Figura 5 Velocidad de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 1).

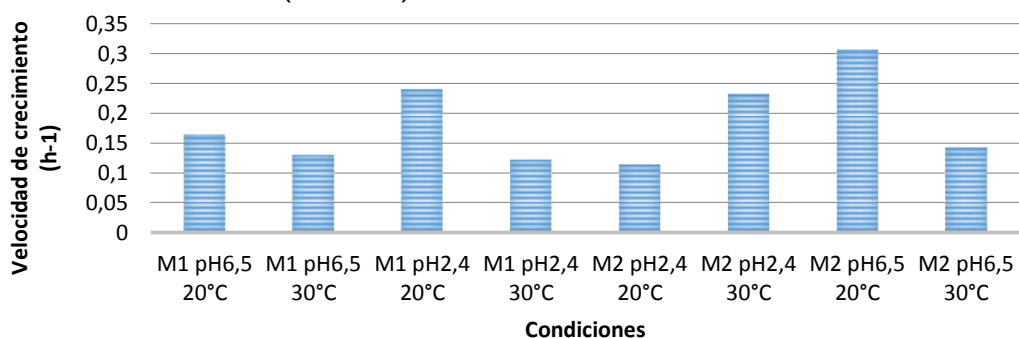


Figura 6 Velocidad de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 2).

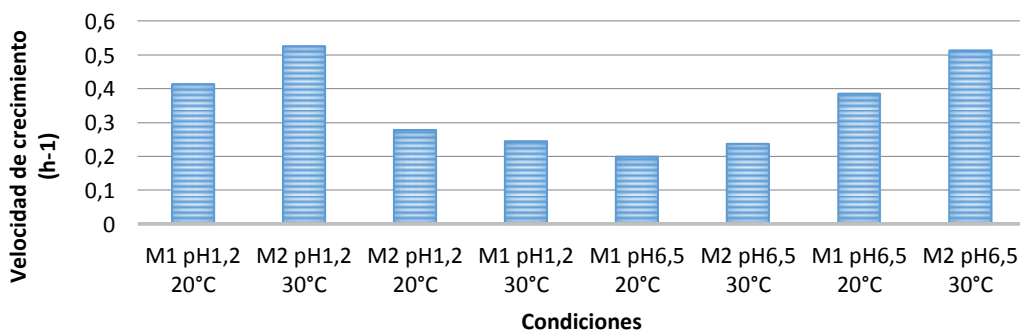


Figura 7 Velocidad de crecimiento en medio 9k para el aislamiento del género *Leptospirillum* (Aislado 3).

Las distintas velocidades de crecimiento causantes por las variaciones en las condiciones en los medios líquidos nos dieron los siguientes resultados: las mejores velocidades para el aislado 1 fueron la muestra M2 a condiciones de pH 1,8 y 6.5 ambas con temperaturas de 30°C con velocidad cerca de 0.4 h⁻¹; para el aislado 3 las mejores velocidades fueron la muestra M2 a pH 1.2 a 30°C con velocidad de 0.5 h⁻¹ y pH 6.5 a 30°C con velocidad de 0.5 h⁻¹, encontrándose estos resultados dentro del rango obtenido por Jaramillo (2014) el cual trabajó con iguales microorganismos y similares condiciones del medio logrando así velocidades de $\mu=0.318$ a 0.260 h⁻¹.

En medio de cultivo para el aislado 2 las mejores velocidades se dieron en la muestra M2 a condiciones de 20°C a pH 6.5 con velocidad 0.3 h⁻¹, también a 20°C a pH 2.4 con velocidad de 0.25 h⁻¹, estos resultados están dentro del rango de los resultados obtenidos en el estudio de (Cancino, 2005) el cual analiza *Thiobacillus* Spp. con resultado en las velocidades de crecimiento de 0.21 y 0.26 h⁻¹. Al igual se concluye que la muestra M2 muestra de drenaje ácido es más adecuada para aislar microorganismos y que las velocidades concuerdan con las muestras que presentaron mejor cinética de crecimiento. Es importante recalcar que los factores pH y temperatura son parámetros que influyen en la velocidad de crecimiento, así como la concentración de los ion ferroso y ion azufre presentes en la solución (Arroyave, 2008; González, 1999).

3.1.3 Determinación de pH.

La determinación del pH es un indicativo de que la bacteria está oxidando la fuente de energía en un determinado tiempo, cuando la medida del pH se hace constante indica que la bacteria ya consumió su fuente de energía y lo oxido por completo.

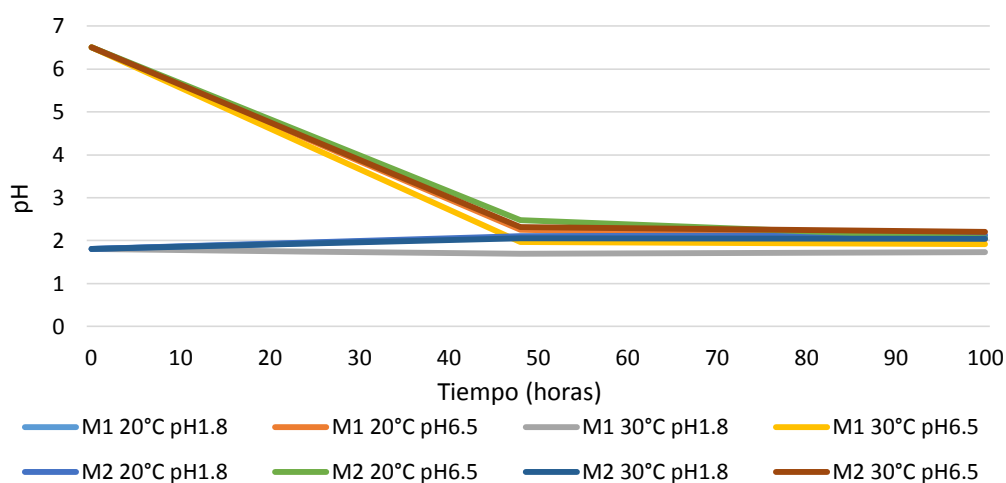


Figura 8. Cambio en el nivel de pH en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 1).

En la figura 8 se observa la disminución del potencial de hidrogeno (pH), el cual llega a estabilizarse en el medio a partir de las 48 horas debido a que la acción bacteriana en el mineral genera ácido sulfúrico y consecuentemente se da el incremento del grado de acidez, en las muestras con pH 6.5 los que sucede en este medio es que se está cediendo los protones causando el aumento acelerado de acidez; mientras que en las muestras más acidas que presentan pH de 1.2, se están captando protones indicándonos así que hay una disminución de la acidez e incremento nímio del pH; sucede lo mismo en el estudio de (Mejía *et al.*, 2011) donde concluye que el pH está influenciado por la presencia de carbonatos, el consumo de protones y la oxidación de Fe^{2+} y así mismo como en este estudio al final en sus procesos de oxidación se observa estabilidad del pH con un valor cercano a 2 como también ha sido reportado por (García *et al.*, 1995; Da Silva, 2004; Mejía *et al.*, 2007).

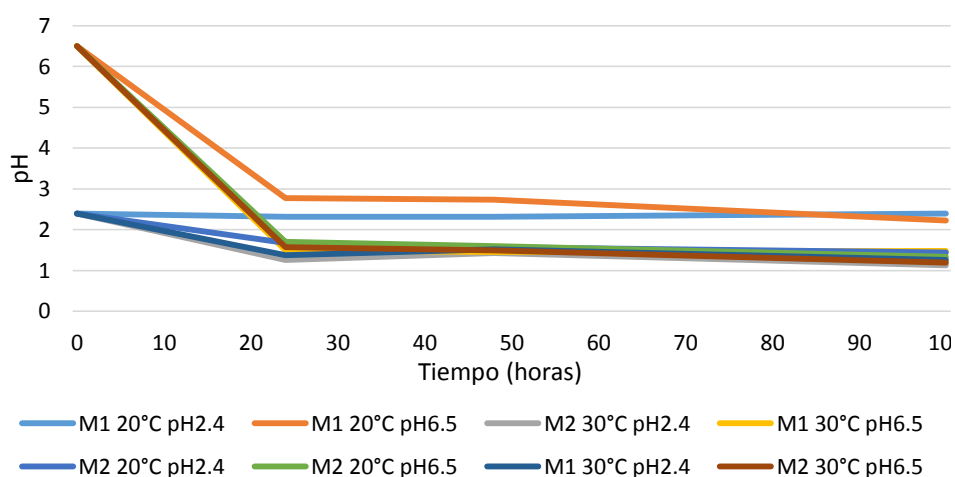


Figura 9. Cambios en el nivel de pH en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 2).

En la figura 9 se observa la disminución del pH, esto se debe a que la actividad bacteriana como producto de su metabolismo oxida el mineral de S a SO_4^{2-} generando ácido sulfúrico, protones de H^+ y como consecuencia de esto se da el incremento del grado de acidez, manteniéndose un pH cercano a 2 constantemente en el medio desde las 24 horas en adelante. En las muestras que presentan un pH de 6.5 aumenta la acidez aceleradamente hasta estabilizarse a las 20 horas con un pH cercano a 2. El resultado de este análisis se obtienen mejores resultados que en otros estudios como es el de (Yousefi *et al.*, 2013) en el cual el pH 4.5 disminuye y estabiliza a partir del segundo día y se mantiene constante con un pH cercano a 2.

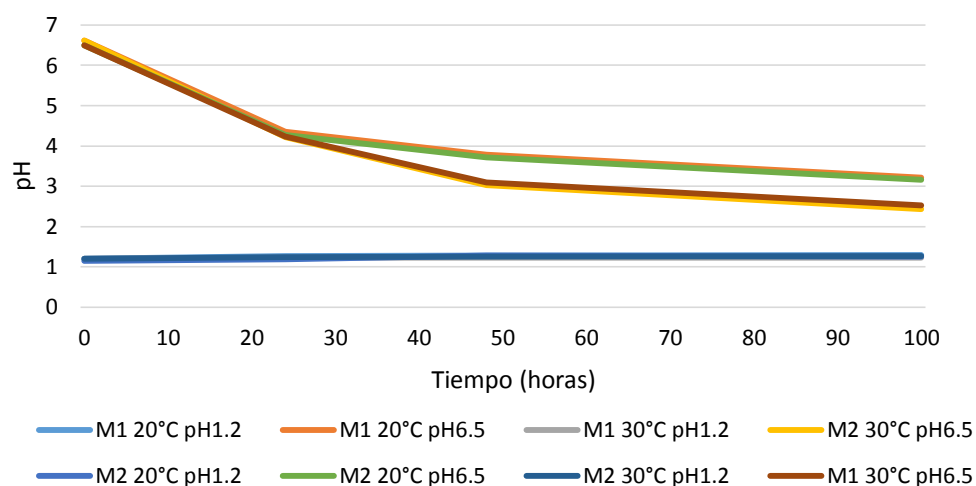


Figura 10. Cambios en el nivel de pH en medio 9k para el aislamiento del género *Leptospirillum* (Aislado 3).

En la figura 10 se observa que en los ensayos con pH de 1.2 sube ligeramente el pH partiendo con un medio muy ácido, esto se debe a que en el medio se está captando protones y consecuentemente se da el aumento del pH y disminución de la acidez; ocurre lo contrario con muestras con pH 6.5 ya que en estos medios en vez de captar protones los ceden, causando en el medio una disminución del pH y un incremento de la acidez. El pH está fuertemente influenciado por las bacterias debido a que tienen la función de generar los iones férricos y protones (Acevedo y Gentina, 2005). También se puede así establecer que el pH está directamente influenciado por la cantidad de inóculo de la réplica anterior y la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} del nuevo medio de cultivo (Jaramillo, 2014).

3.2 Análisis estadístico para determinar los mejores aislados.

Se realizó el análisis factorial con el programa Minitab 17 con el propósito de determinar cuál de las condiciones de pH y temperatura de los matraces aislados son las más adecuadas, en función de la velocidad de crecimiento.

3.2.1 Análisis factorial en medio 9K para el aislado 1.

De acuerdo a la Figura 11, las mejores condiciones de crecimiento microbiano se obtienen a pH 6.5 con temperatura de 30 °C en función a la velocidad de crecimiento. Según (Sato *et al.*, 1989; Cox *et al.*, 1984) en sus estudios explican que la condición de pH en la que se adaptó este mismo aislado, es capaz de mantener el balance de acidez a un pH de 1.8 a 6.5 permitiendo así desde un inicio aumento de potencial redox.

Para determinar cómo influyen las variables pH y temperatura en el crecimiento bacteriano se realizó el análisis estadístico de regresión múltiple (Tabla 4), debido a que este modelo presenta un mayor ajuste de datos experimentales al igual que en los estudios realizados por (Díaz, 2012; Jaramillo, 2014).

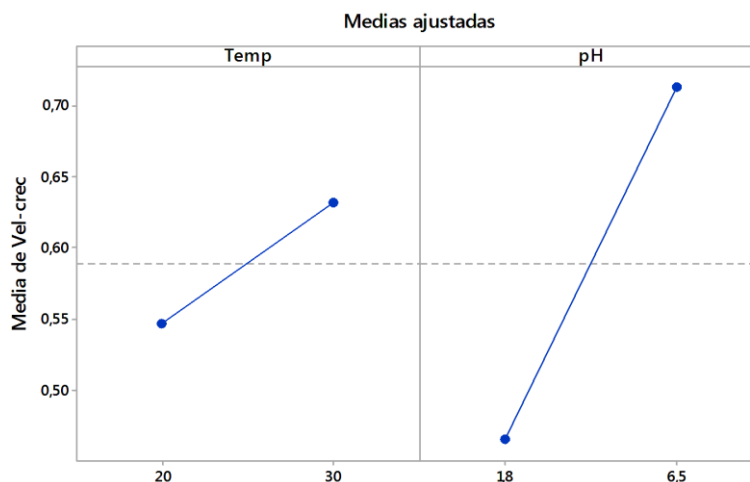


Figura 11. Efectos principales de pH y temperatura con respecto a la velocidad de crecimiento en medio de cultivo para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 1).

Fuente: Minitab 17

Elaborado por: Hugo Iñiguez

Tabla 4. Parámetros del modelo de regresión múltiple.

Modelo		Coeficientes no estandarizados	P	R ²	Error típ. de la estimación
Medio 9k para el Aislado 1	Constante	0.161	4.55E ⁻⁰⁵	75.2%	0.081
	pH	0.247			
	°C	0.085			

En la tabla 4 nos indica que R² en el modelo explica en un 75.2% la varianza de la variable dependiente (velocidad de crecimiento), a través de los predictores pH y temperatura. Por tanto, el modelo planteado se ajusta al 75.2% de los datos.

La regresión nos conduce a la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 + \beta_2 \quad (\text{Donde } \beta \text{ son los parámetros del modelo})$$

Sustituyendo:

$$\text{Velocidad} = 0.161 + 0.085 \text{ Temp} + 0.247 \text{ pH}.$$

La intersección se produce en el coeficiente no estandarizado $\beta_0 = 0.0161$, mientras que se obtuvo un valor de $\beta_1 = 0.085$, lo que indica que si la temperatura aumenta en una unidad, la velocidad de crecimiento aumenta en 0.085 unidades. El coeficiente $\beta_2 = 0.247$ significa que si la acidez (pH) del medio aumenta en una unidad, la velocidad de crecimiento aumenta en 0.247; esto indica que la variable pH si tiene incidencia en la velocidad de crecimiento.

Es decir, entre la velocidad de crecimiento y la temperatura son directamente proporcionales y por ende puede influir en el tiempo de oxidación del mineral y en la cantidad de células (Okereke *et al.*, 1991).

3.2.2 Análisis factorial en medio 9K para el aislado 2.

De acuerdo a la Figura 12, las mejores condiciones de crecimiento microbiano se obtienen en cultivos con pH 6.5 y temperatura de 20 °C, indicándonos que en la muestra de este aislado ya estaban adaptados a condiciones del ambiente que fueron aislados. Estos se asemejan a los estudio realizado por (Masau *et al.*, 2001) que logro crecer a un pH 5 con tiosulfato.

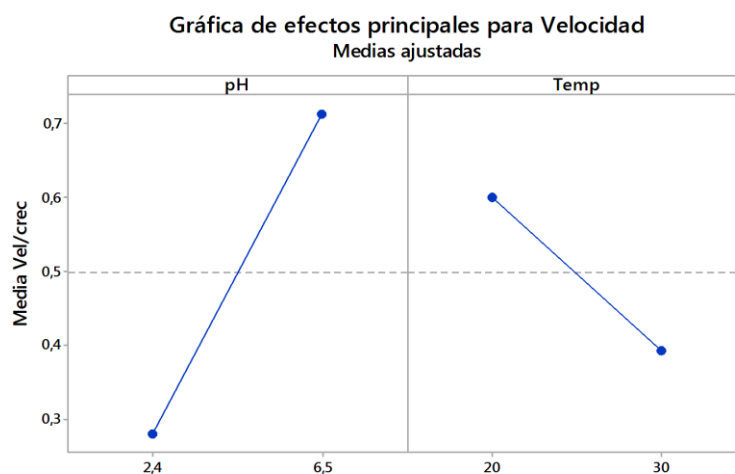


Figura 12. Efectos principales de pH y temperatura con respecto a la velocidad de crecimiento en medio de cultivo para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 2)

Fuente: Minitab 17

Elaborado por: Hugo Iñiguez

En la Tabla 5 se indican los parámetros obtenidos mediante el análisis de regresión múltiple en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 2), donde el R^2 obtenido es igual a 83.61%, lo que indica que el modelo explica el 83.61% de la variable dependiente velocidad de crecimiento a través de los predictores pH y temperatura.

Tabla 5. Parámetros del modelo de regresión múltiple.

Modelo		Coefficientes no estandarizados	P	R ²	Error típ. De la estimación
Medio 9k para el Aislado 2	Constante	0.392	9.45E ⁻¹¹	83.61%	0.122
	pH	0.433			
	°C	-0.208			

La regresión nos conduce al siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 + \beta_2 \quad (\text{Donde } \beta \text{ son los parámetros del modelo})$$

Sustituyendo nos da:

$$\text{Velocidad} = 0.392 + 0.433 \text{ pH} - 0.208 \text{ Temp}$$

La intersección se produce en el coeficiente no estandarizado $\beta_0 = 0.392$. El coeficiente $\beta_1 = 0.433$, pone de manifiesto que si la acidez (pH) aumenta en una unidad, la velocidad de crecimiento aumenta en 0.433, es decir si influye de una manera significativa. El valor del coeficiente $\beta_2 = 0.208$ significa que si la temperatura °C disminuye en una unidad, la velocidad de crecimiento disminuye en 0.208 °C, indicando que la variable temperatura en este medio tiene poca influencia en la velocidad de crecimiento, esto aporta con estudios anteriores donde coincide que el pH y temperatura son factores importantes que pueden influir de manera directa en procesos de biolixiviación en la especie *A. thiooxidans* (Guerrero, 1998).

3.2.3 Análisis factorial en medio 9k para el aislado 3.

La Figura 13 muestra las mejores condiciones de crecimiento microbiano; a pH 1.2 y temperatura de 20 °C son las que presentan mayor velocidad de crecimiento, por lo que se escogió esta muestra para posteriores análisis, las condiciones obtenidas coinciden con los estudios realizados por (López, 2007; Rosales *et al.*, 2001).

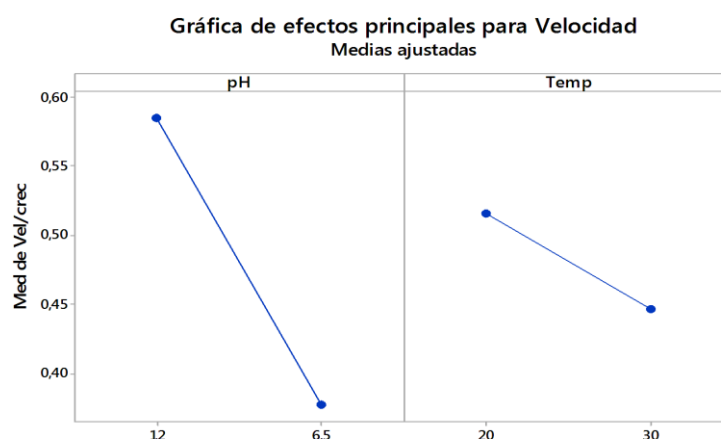


Figura 13. Efectos principales de pH y temperatura con respecto a la velocidad de crecimiento en medio de cultivo para el aislamiento del género *Acidithiobacillus* (Aislado 3)

Fuente: Minitab 17

Elaborado por: Hugo Iñiguez

La Tabla 6 nos indica los parámetros obtenidos mediante el análisis de regresión múltiple en medio 9k para el aislamiento del género *Leptospirillum* (Aislado 3). El valor de R^2 obtenido es de 83.82%, lo que indica que el modelo explica el 84% de la variable dependiente velocidad de crecimiento a través de los predictores pH y temperatura.

Tabla 6. Parámetros del modelo de regresión múltiple.

Modelo		Coefficientes no estandarizados	P	R 2	Error típ. De la estimación
Medio 9k para el Aislado 3	Constante	0.496	$2.83E*10^{-06}$	83.82%	0.059
	pH	-0.1037			
	Temperatura	-0.034			

La regresión nos conduce al siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 + \beta_2 \quad (\text{Donde } \beta \text{ son los parámetros del modelo})$$

Sustituyendo nos da:

$$\text{Velocidad} = 0.496 - 0.034 \text{ Temp} - 0.103 \text{ pH}$$

La intersección se produce en el coeficiente no estandarizado $\beta_0 = 0.496$. El coeficiente $\beta_1 = -0.034$, significa que si la temperatura °C disminuye en una unidad, la velocidad de crecimiento disminuye en 0.034. El coeficiente $\beta_2 = -0.103$, significa que si la acidez (pH) disminuye en una unidad, la velocidad de crecimiento disminuye en 0.103 unidades. También se aprecia que la variable que influye más es el pH en la velocidad de crecimiento, esto se puede observar en los coeficientes β obtenidos, en estos valores. El signo negativo indica que el pH y temperatura son inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento

es decir que el consorcio tiene características acidófilas; en bibliografía se ha demostrado que estos microorganismos pueden vivir en ambientes difíciles debido a su alta capacidad de adaptación (Velásquez, 2014); por ello el pH óptimo de las bacterias acidófilas, en especial de las bacterias de la especie *L. ferrooxidans* es 1.8 y pueden ser susceptibles a altas variaciones de temperatura (Castillo *et al.*, 2005). En el estudio realizado por Liverona (2009) indica también que la temperatura no es tan influyente como el pH durante el aislamiento.

3.3 Evaluación de las mejores cepas aisladas.

3.3.1 Productividades volumétricas de hierro y sulfatos de los microorganismos aislados.

La Tabla 7 muestra los resultados analizados de las 6 muestras seleccionadas en medios de cultivo definidos 9K para el aislamiento de los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*, en las que se describen las productividades volumétricas (Qp) obtenidas a partir de la cuantificación de sulfatos y hierro, así como las velocidades máximas de crecimiento microbiano μ (h^{-1}).

Tabla 7. Determinación de la velocidad máxima de crecimiento, productividad volumétrica (Qp) de Fe^{3+} y Sulfatos de 6 muestras seleccionadas en el aislamiento de los microorganismos.

Muestra	Consorcios microbiana	pH	Temperatura	Fuente de energía	μ (h^{-1})	Qp Sulfato (g/L día)	Qp Hierro (g/L día)
M7	Género <i>Acidithiobacillus</i> (Aislado 1)	1.8	30°	sulfato ferroso	0.109	0.049	0.5730
M3	Género <i>Acidithiobacillus</i> (Aislado 1)	6.5	30°	Sulfato Ferroso	0.104	0.049	0.316
M1	Género <i>Acidithiobacillus</i> (Aislado 2)	2.4	30°	Azufre	0.105	0.057	--
M9	Género <i>Acidithiobacillus</i> (Aislado 2)	6.5	20°	Azufre	0.107	0.116	--
M11	Género <i>Leptospirillum</i> (Aislado 3)	1.2	30°	sulfato ferroso	0.111	--	0.340
M5	Género <i>Leptospirillum</i> (Aislado 3)	6.5	30°	Sulfato Ferroso	0.104	--	0.165

Todas las muestras seleccionadas presentan buena productividad volumétrica de acuerdo a la cuantificación de hierro y sulfatos, siendo estos resultados factibles para posteriores procesos de biolixiviación y similares en comparación con los resultados obtenidos por

(Díaz, 2012; Jaramillo, 2014). Sin embargo hay muestras que presentan mejores resultados en comparación con otras y son las siguientes: Para los cultivos del aislado 1, el mejor fue la muestra (M7) con pH 1.8 y temperatura de 30°C en comparación con la muestra (M3) con pH de 6.5 y temperatura de 30 °C, para los cultivos del aislado 2, la mejor muestra fue (M9) con pH 6.5 y temperatura de 20 °C en comparación con (M1) de pH 6.5 a temperatura de 30°C y finalmente para las muestras del aislado 3, el mejor fue (M11) con pH de 1,2 y temperatura de 30 °C en comparación con la muestra (M5) con las condiciones de pH 6.5 a 30 °C. Los consorcios seleccionados presentaron buenas características acidófilas, esto ha sido comparado y verificado con bibliografía, indicando que estos microorganismos pueden vivir en ambientes difíciles debido a su alta capacidad de adaptación (Velásquez, 2014). La influencia de la temperatura no es tan significativa debido a que se encuentra dentro del rango establecido para bacterias mesófilas que es 20-35°C (Muzzio, 2002).

Estos resultados se confirman mediante análisis estadísticos en donde se investigaron las variables establecidas para así obtener una mejor comprensión sobre la actividad de los microorganismos en el medio que se desarrolla. A continuación se muestran los resultados de los análisis de oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} y la producción de sulfatos de los distintos matraces seleccionado.

3.3.1.1 Análisis de la oxidación de ion ferroso y producción de ion férrico para el aislado 1.

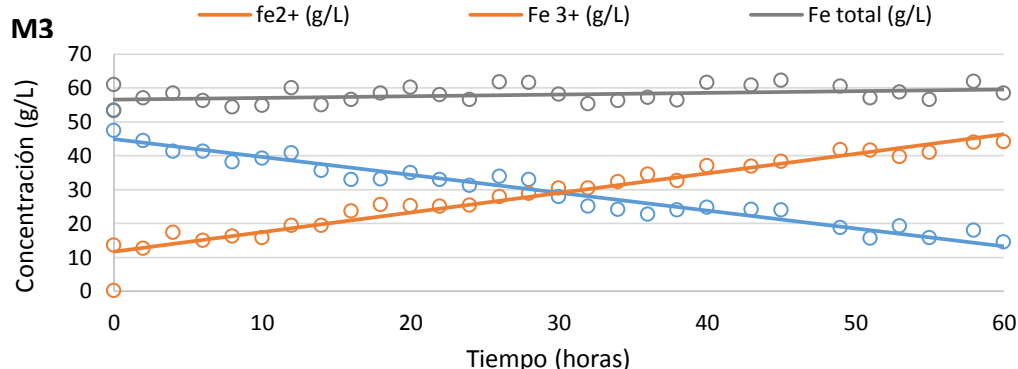
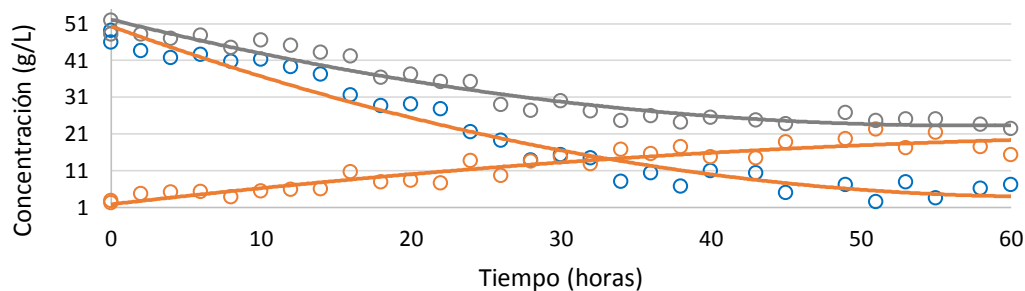


Figura 14. Cuantificación del consumo de Fe^{2+} , Fe total y la producción de Fe^{3+} del aislado M7 con pH de 1.8 a 30°C y M3 pH de 6.5 a temperatura de 30°C , usando medio de cultivo para el aislamiento del género *Acidithiobacillus*.

Fuente: Hugo Iñiguez

En la figura 14, se presentan gráficamente los procesos de oxidación del ion Fe^{2+} a ion Fe^{3+} en medio 9k para el aislamiento del género *Acidithiobacillus*. de las muestra M3 y M7 de los ensayos seleccionados; En estas graficas se observa que el hierro total mantiene un equilibrio durante la oxidación del hierro, al igual se aprecia que a medida que la concentración del ion ferroso disminuye, el ion férrico aumenta en un tiempo de 60 horas, dándonos así un claro indicativo de que las bacterias están catalizando esta reacción, en especial en la muestra M7 la misma presenta mayor oxidación del ion ferroso de 50 a 10 ppm aproximadamente y en menor tiempo de 30 horas en comparación con M3. La concentración de Fe^{3+} aumenta en función del tiempo, este modelo es contrastado en la tesis de Juárez (2004), donde se puede observar claramente que la producción de Fe^{3+} tiende a una relación similar a los del resultado.

3.3.1.2 Cinética de crecimiento en medio 9K para el aislado 1

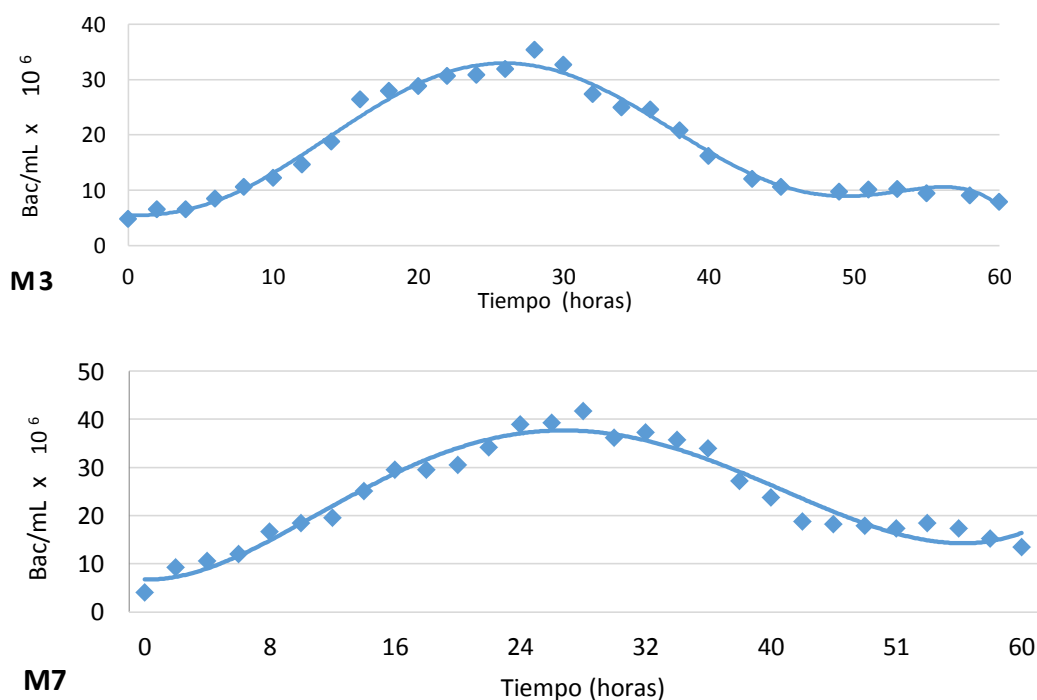


Figura 15. Cinética de crecimiento para las muestras M7 y M3.

Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

En la figura 15, las poblaciones de bacterias crecen con tendencias similares en M3 y M7 hasta alcanzar un máximo número de bacterias por mL durante las 30 horas aproximado,

para luego estabilizarse y decrecer debido a que la fuente de energía (Fe^{2+}) es limitante. Mientras las colonias crecen consumen la fuente de energía en este caso el sulfato ferroso, transformando el Fe^{2+} en Fe^{3+} , tal y como se vio en los modelos de regresión analizados anteriormente, la muestra M7 presenta mayor concentración de bacterias que M3, e Incluso en ambas, cuando la población empieza a disminuir sigue consumiendo el resto de la fuente energética y por tanto, la reacción química en el sentido descrito continúa. Los resultados son los mismos comparando con las conclusiones dadas por (Ossa y Márquez, 2007; Juárez, 2004), que obtienen una tendencia similar de la evolución de los parámetros indicadores de la oxidación de ion ferroso y la producción de ácidos, que resultan de las tres acciones anteriores: disminución en la concentración de Fe^{2+} , aumento de la acidez pH, proliferación celular e incremento de las concentraciones en solución de Fe^{3+} .

3.3.1.3 Análisis de sulfatos en medio 9K para el aislado 2.

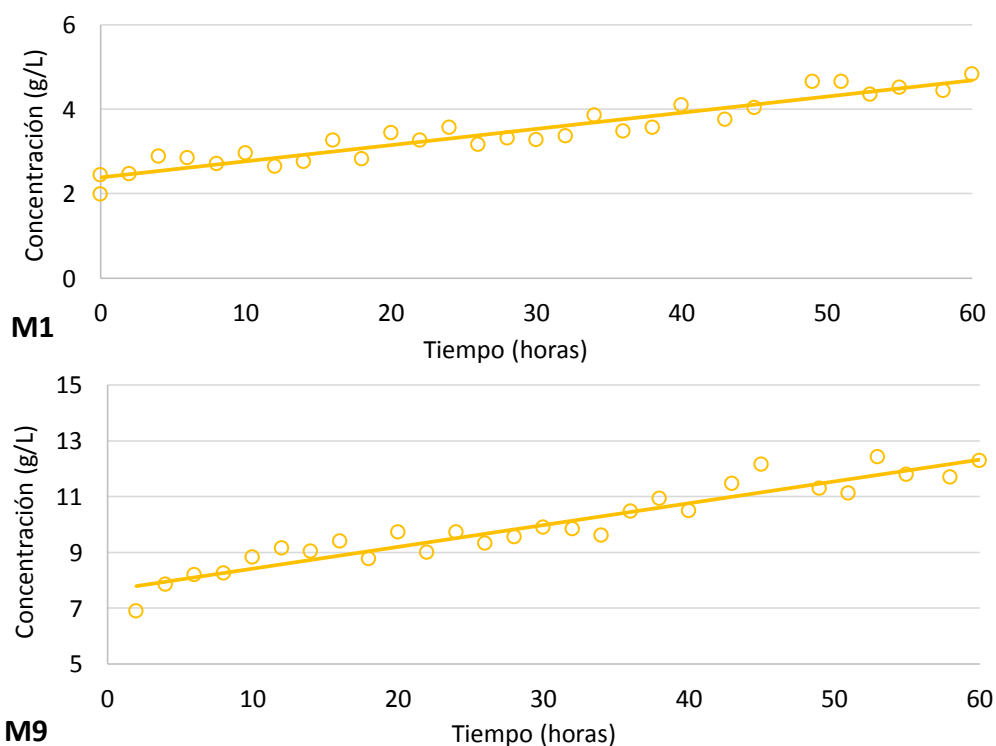


Figura 16. Cuantificación de sulfatos de los aislados M9 con pH de 6.5 a 30 °C y M1 con pH 2.4 a 30°C, usando medio de cultivo 9K para el aislamiento del género *Acidithiobacillus*.

Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

En la figura 16, el diagrama de la dispersión de puntos muestra un aumento de la variable sulfatos en función del tiempo de las muestras seleccionadas M9 y M1. Evidentemente, la colonia de bacterias utiliza el azufre elemental en su metabolismo oxidándolo a sulfatos, es por esto que se aprecia el aumento del mismo; indicando claramente que el azufre se oxida

y en mayor proporción en la muestra M9 de 6 a 12 (g/L) en comparación con la muestra M1 que es de 2 a 5 (g/L) aproximadamente.

Es importante recalcar que para este microorganismo existe información en la cual indican que oxida con más eficiencia a un pH de 2.4 y no tan eficiente a un pH de 6.5 como es el de nuestro aislado, siendo así estos resultados obtenidos pueden ser útiles en posteriores condiciones de procesos de biolixiviación de ataque al mineral (Ossa *et al.*, 2007).

3.3.1.4 Cinética de crecimiento en medio 9K para el aislado 2.

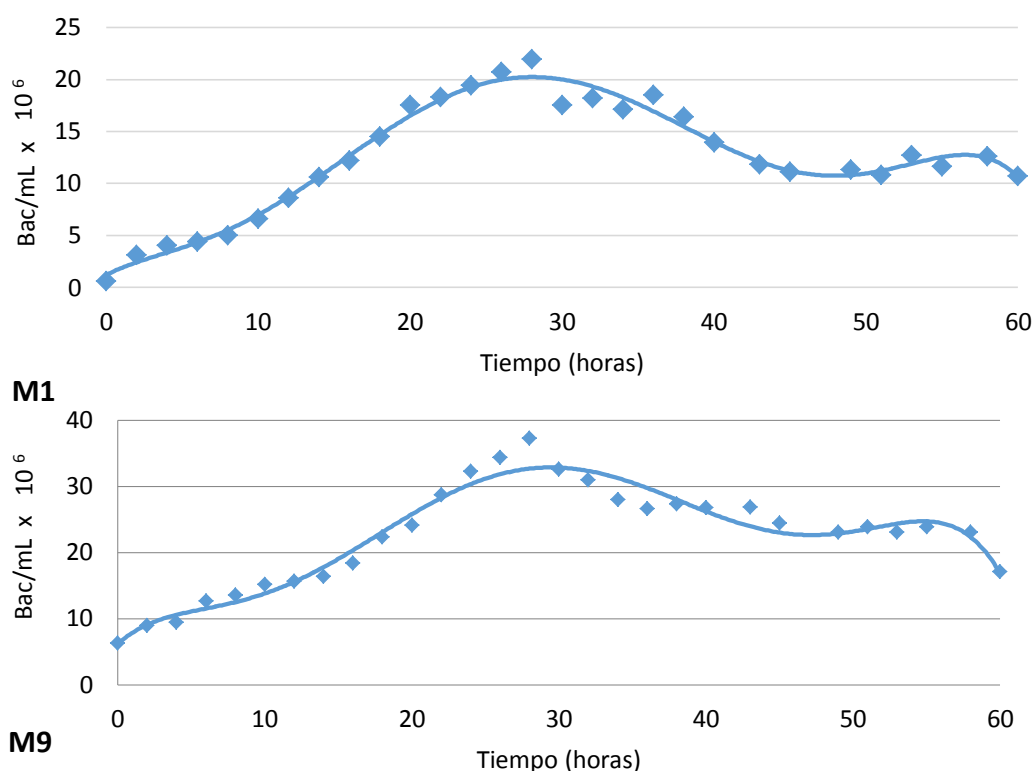


Figura 17. Cinética de Crecimiento para las muestras M1 y M9.

Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

La figura 17 explica que las poblaciones de bacterias de las muestras M1 y M9 crecen hasta alcanzar un máximo a las 28 horas aproximadamente, para luego detenerse y decrecer lentamente. Mientras la colonia crece consume la fuente de energía, transformando el azufre en sulfato, de esta manera que disminuye la concentración de azufre y la del sulfato aumenta, tal y como se vio en los modelos de regresión analizados anteriormente, la muestra M9 presenta mayor cantidad de microorganismos que la muestra M1, Incluso, cuando las poblaciones empiezan a disminuir sigue consumiendo el resto de azufre y por tanto, la reacción química en el sentido descrito continúa, al igual como muestran los resultados obtenidos por (Juárez, 2004).

3.3.1.5 Análisis de oxidación de ion ferroso y producción de ión férrico para el aislado 3.

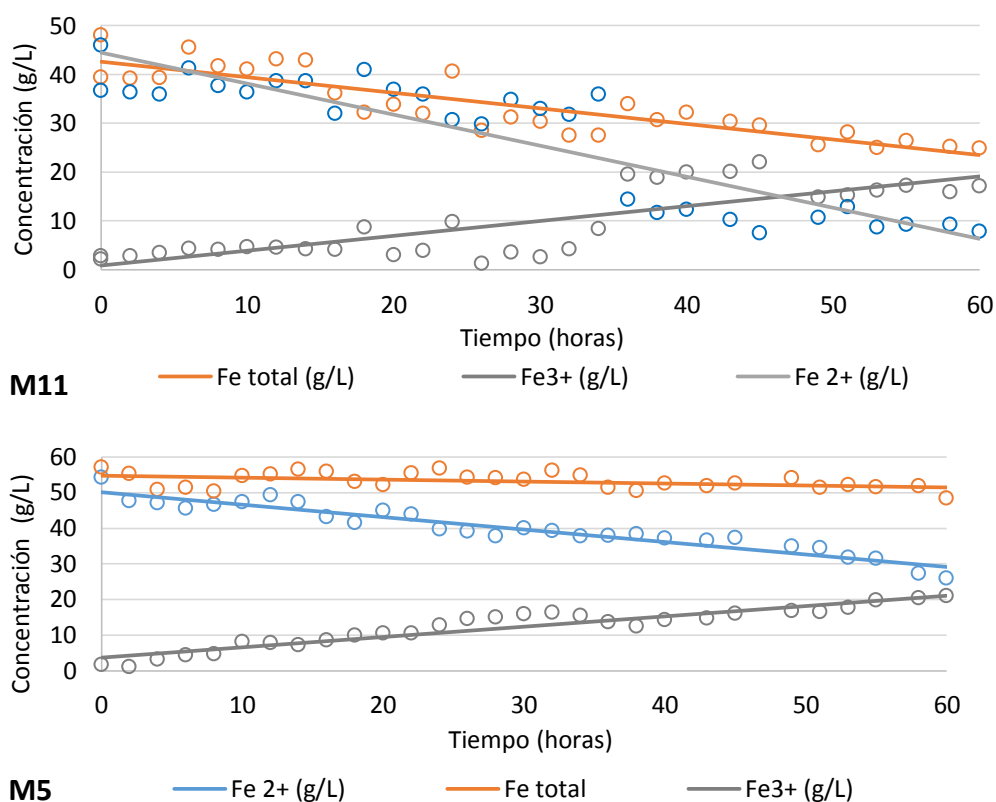


Figura 18. Cuantificación del consumo de Fe^{2+} , Fe total y la producción de Fe^{3+} de los aislados M5 a un pH de 6.5 y temperatura de 30 °C y M11 con pH de 1.2 a temperatura ambiente 20 °C usando medio 9k para el aislamiento del género *Leptospirillum*.

Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

En la figura 18 se observan los resultados de los procesos de biolixiviación de las muestras seleccionadas M5 y M11 usando medio 9K para el aislado 3 donde el hierro total se mantiene equilibrado durante el proceso. En ambas muestras se puede visualizar la tendencia a disminuir de la concentración de Fe^{2+} de 50 a 30 g/L y el aumento de Fe^{3+} de 0 a 20g/L en la muestra M5 y de una manera más eficiente la muestra M11 con disminución de la concentración de Fe^{2+} de 50 a 10 g/L y el aumento de Fe^{3+} de 0 a 20g/L, siendo este mismo quien oxide en menor tiempo que la muestra M5 ya que se observa que en esta muestra aun continua oxidando, el proceso de oxidación del Fe^{2+} en estos resultados nos indica claramente de que hay bacterias con capacidad de oxidar; así como también se muestran los procesos de oxidación en los estudios de (Sand *et al.*, 1992). También se indica que los resultados obtenidos en este ensayo fueron cortos en relación a los reportados por (Falco *et al.*, 2003) en cuyo cultivo se oxida el ión ferroso en 15 días.

3.3.1.6 Cinética de crecimiento en medio 9k para el aislado 3.

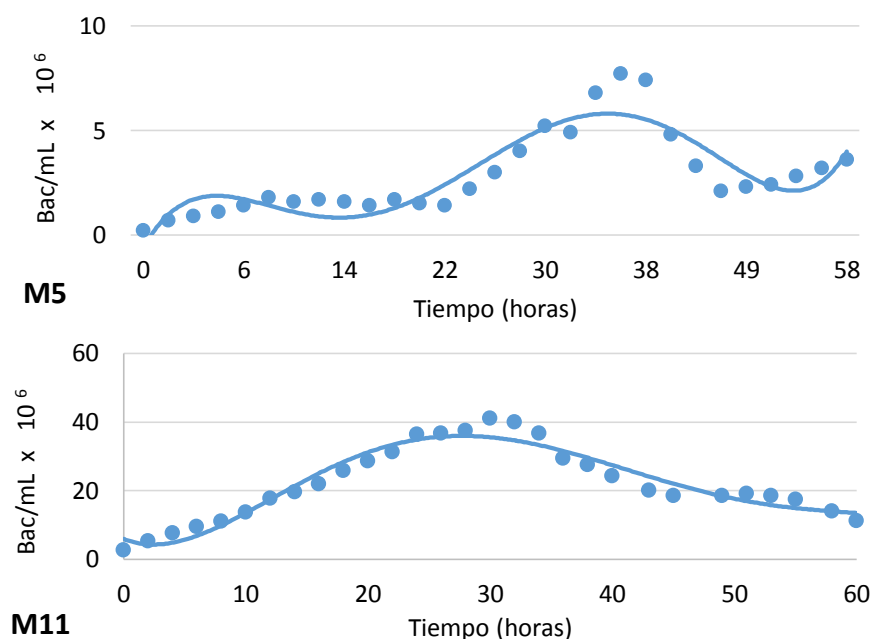


Figura 19. Cinética de Crecimiento para las muestras M5 y M11.

Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

En la figura 19, las poblaciones de bacterias crecen hasta alcanzar un máximo de número de bacterias hasta las 30 horas aproximadamente, para luego detenerse y decrecer. Mientras las colonias crecen, ambas consumen su fuente de energía, transformando el ion Fe^{2+} en ion Fe^{3+} , de esta manera disminuye la concentración del primer ion, y la del segundo aumenta, tal y como se vio en los modelos de regresión analizados anteriormente, al igual la muestra M11 presenta mayor biomasa que la muestra M5, cuando la población empieza a disminuir sigue consumiendo parte del resto de la fuente energética y, por tanto, en contraste con estudios realizados indican que la cantidad de bacterias en el tiempo está relacionado por su propia fuente de energía al igual como el consumo de Fe^{2+} (Sand *et al.*, 1992; Acevedo y Gentina, 2005; Williamson y Rimstidt, 1994).

En sí los datos analizados de las muestras seleccionadas M7 (Aislado 1), M9 (Aislado 2) y M11 (Aislado 3), nos indican que al haber una mayor fuente de Fe^{2+} o azufre para los microorganismos hay una rápida transformación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y de azufre a sulfato, también hay un alto crecimiento de bacterias durante las primeras horas, obteniéndose en fin altas concentraciones de bacterias/mL, esto también expresado en el estudio realizado por (Deveci, 2002) También se establece que en los ensayos realizados alrededor del día 2 se da el máximo incremento de células, indicando que es el tiempo indicado para la siguiente replica y así mantenerlos en un estado de actividad constante.

3.3.2 Determinación del pH de los cultivos seleccionados.

La medición del pH es un factor determinante en el proceso de adaptación de los microorganismos al medio de cultivo definido e influye de forma significativa en la velocidad de crecimiento de los mismos ya que afecta a los grupos ionizables presentes en las enzimas de las células (Das *et al.*, 1999; Gómez y Cantero, 2005). De las muestras realizadas: el aislado 1 y aislado 3 en los medios que presentan pH de 6,5 se da una rápida disminución del pH aumentando su acidez del medio, debido a que se están captando los protones, además en las muestras que presentaban medios más ácidos como pH de 1.8 y 1.2 se observó un ligero aumento de la acidez a causa de que el consorcio necesita protones y consecuentemente aumenta el pH y disminuye la acidez del medio; de una forma diferente ocurre en el aislado 2, ya que las muestras que están a pH de 6.5 o 2.4 solo disminuyen el pH porque se eliminan protones.

En todas las muestras seleccionadas se puede apreciar que cuando su fuente de energía se comienza a terminar, aproximadamente durante las 30 horas, su acidez ligeramente llega a estabilizarse con un pH próximo a 2, este comportamiento de la acidez en el medio de cultivo es también visto en el estudio realizado por (Rivera *et al.*, 2011) donde la determinación de pH en los medios de cultivo se estabiliza al tercer o cuarto día.

3.3.2.1 Concentración de Fe^{2+} en función de la acidez del medio (pH) en medio 9k para el aislado 1.

Para este punto se analizó una de las dos muestras, es decir la muestra M7 ya que en los análisis anteriores presentaba mejor actividad biológica en comparación con la muestra M5, esta se representa en la Figura 20 la cual nos indica que a medida que trasciende el tiempo disminuye tanto el pH como la concentración del ion ferroso lo cual concuerda con lo señalado en estudios anteriores (Jensen y Webb, 1995) el cual indica también que la actividad bacteriana en los sulfuros genera acidez del medio debido a que libera iones de hidrogeno. Tal parece que existe una relación entre estos dos variables pH e ion ferroso en el tiempo.

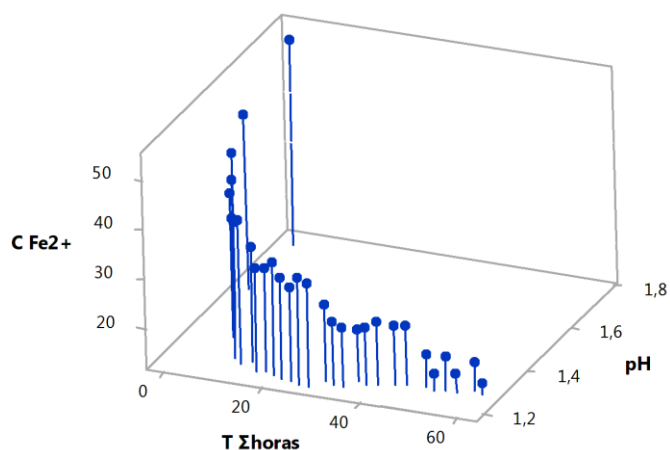


Figura 20. Gráfico de barras 3D, de relación de tres variables continuas; pH, tiempo en horas y concentración del ion ferroso de la muestra seleccionada M7.
Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

Se efectuaron regresiones del pH en función de la concentración de hierro, ajustándose los datos mejor a un modelo polinómico de segundo grado, se obtuvieron los siguientes modelos:

$$[\text{Fe}^{+2}] = 0.2232 \cdot \text{pH}^2 - 7.516 \cdot \text{pH} + 64.466 \quad R^2 = 0.8242$$

De acuerdo al análisis estadístico realizado, el coeficiente de regresión ajustado es 0.82, esto significa que el modelo explica en un 82% la variabilidad del pH en función de la concentración de Fe^{2+} .

3.3.2.2 Concentración de sulfatos en función de la acidez del medio (pH) en medio 9k para el aislado 2.

Se eligió una de las dos mejores muestras para este análisis, se seleccionó la muestra M9 debido a que presentaba mejor actividad en comparación con M1 como muestran los resultados antes realizados, esta se representa en la figura 21 mediante un diagrama 3D de dispersión de las variables tiempo, pH y concentración del sulfato. Se puede observar que a medida que transcurre el tiempo, disminuye el pH y aumenta la concentración de sulfato, como era de esperarse existe una variación entre concentración de sulfato y pH pues a medida que los microorganismos consumen la fuente de energía (azufre), produce sulfatos y protones de H^+ . Esto se coteja con la opinión de (Fernández *et al.*, 2015).

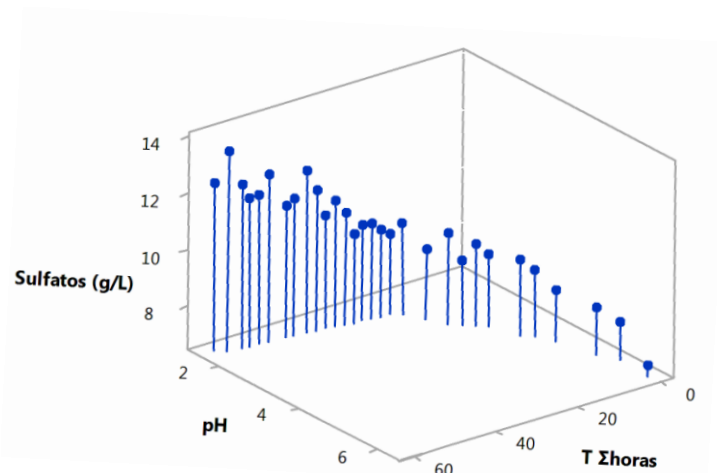


Figura 21. Diagrama de dispersión 3D, en relación de las tres variables: pH, tiempo en horas y concentración del ion ferroso de la muestra seleccionada M9.

Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

Sometiendo estas dos variables a una regresión simple con los regresores pH en función del sulfato, se tienen los siguientes resultados, ajustándose mejor un modelo polinómico.

$$[\text{Sulf}] = 0.2094\text{pH}^2 - 4.967\text{pH} + 30.95 \quad R^2 = 0.8777$$

Para el caso del pH, el modelo explica el 87% de los datos dependientes de la variable pH, a través de la variable predictor concentración de sulfatos.

3.3.2.3 Concentración de Fe^{2+} en función de la acidez del medio (pH) en medio 9K para el aislado 3.

Al igual que en el caso anterior se seleccionó una de las dos mejores muestras para este análisis es decir la que presente mejores resultados (muestra M11) debido a que esta muestra en los análisis anteriores presentaba mejor actividad en el medio de cultivo que en comparación para la muestra M9, esta se representa en la Figura 22 la cual indica que a medida que transcurre el tiempo, aumenta la acidez pH del medio y disminuye la concentración del ion Fe^{2+} , lo cual concuerda con lo señalado en estudios anteriores indicando que hay actividad bacteriana en el medio (Sand *et al.*, 1992).

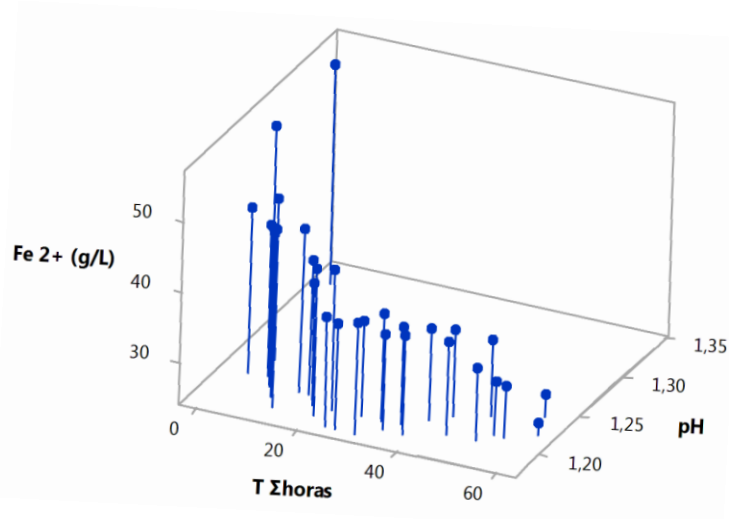


Figura 22. Gráfico de barras 3D, de relación tres variables continuas; pH, tiempo en horas y concentración del ion ferroso de la muestra seleccionada M11,
Fuente: Hugo Iñiguez Jiménez

Sometiendo estas dos variables a una regresión, ajustándose mejor a un modelo polinómico se obtiene.

$$[\text{Fe}^{2+}] = 0.0002 \cdot \text{pH}^2 - 0.0069 \cdot \text{pH} + 1.2548 \quad R^2 = 0.8199$$

El coeficiente de regresión presenta un error ajustado de 0.82; esto expresa que el modelo explica en un 82% la variabilidad de la concentración de ión ferroso en función del pH.

La importancia del pH durante el período de biooxidación es un factor determinante e influye de forma significativa en la velocidad de crecimiento de los mismos, debido a que afecta a los grupos ionizables presentes en las enzimas situadas en el citoplasma y periplasma de las células presentes en el medio (Das *et al.*, 1999; Gómez y Cantero, 2005). En todos los cultivos hay una disminución del pH y se observa estabilidad hacia el final de proceso. En general, la disminución de pH fue mayor para las muestras con pH encontradas del sitio muestreado que con las de pH de referencia, estos resultados están de acuerdo con lo observado por (Silverman, 1961; Deveci, 2004; Haghshenas *et al.*, 2009). El aumento en el pH puede deberse a varios factores: El consumo de protones generado principalmente en los sulfuros (García *et al.*, 1995; Da Silva, 2004; Ballester, 2005), y la oxidación del Fe^{2+} (Bevilaqua *et al.*, 2002; Meruane y Vargas, 2003). La tolerancia y desarrollo del microorganismo en el medio de cultivo, como su acidez o nutrientes se ve reflejada durante el periodo de la fase Lag, lo cual puede ser observado en la fase estacionaria de crecimiento por el aumento acelerado de la acidez (pH) y oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} similares a los estudios realizados por (Ossa y Márquez, 2007; Touvinen *et al.*, 1971).

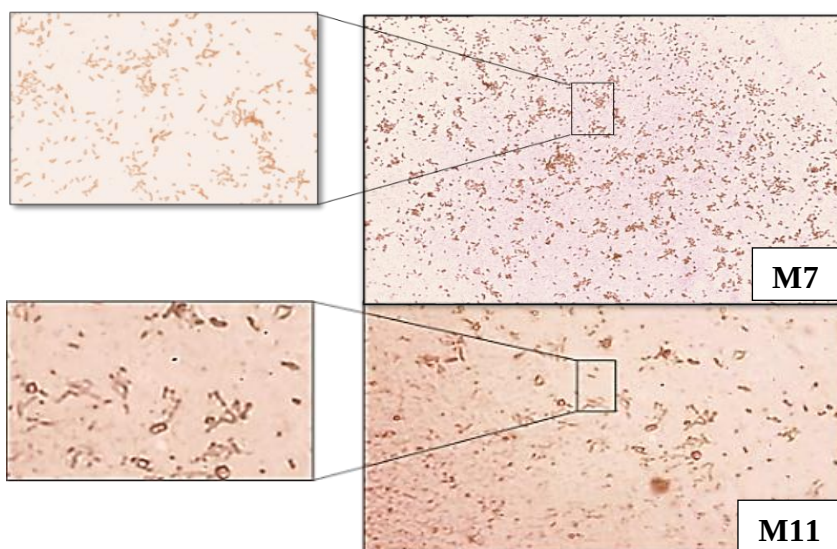
3.4 Identificación de los microorganismos.

Para los análisis de identificación de los microorganismos, se seleccionaron uno de los dos matraces obtenidos del diseño experimental y con ayuda de los análisis de sulfatos, hierro, pH y de crecimiento microbiano antes realizados, se seleccionó para el aislado 1, la muestra M7, la cual presentaba las condiciones de pH 1.8 a temperatura de 30 °C; para el aislado 2, la muestra M9 con las condiciones de pH 6,5 a temperatura de 20 °C y finalmente para el aislado 3, la muestra M11 con las condiciones de pH 1.2 a temperatura de 30 °C.

3.4.1 Caracterización morfológica de los aislados.

3.4.1.1 Tinción Gram.

Los consorcios seleccionados sometidos a tinción gram fueron posteriormente observados a microscopio con un lente de 4000x, en el cual se vieron bacterias teñidas con color rosado (gram negativos) con distintas formas bacilares como se muestra en la (Figura 23). En el aislado 1 (M7), las bacterias presentan aspecto de bacilos con extremos redondeados (Rossi, 1990; Rosales *et al.*, 2001; Jerez, 2009; Mejia, 2010); en el aislado 3 (M11), presentan cierta similitud en la forma de barra con extremos redondeados, (Kelly y Wood, 2000; Bergamo *et al.*, 2004) y finalmente para el aislado 2 (M9), las células se asemejan a una forma de espiral como describen en estudios (Rawlings *et al.*, 1999; López, 2007; Rosales *et al.*, 2001). Estas tinciones, morfología, propiedades para oxidar azufre o hierro y soportar ambientes ácidos, dan una aproximación importante para su posterior caracterización así como en los aislados realizados por (Arias *et al.*, 2012; Corrales *et al.*, 2006), su proceso de tinción se explica en el (Anexo 8).



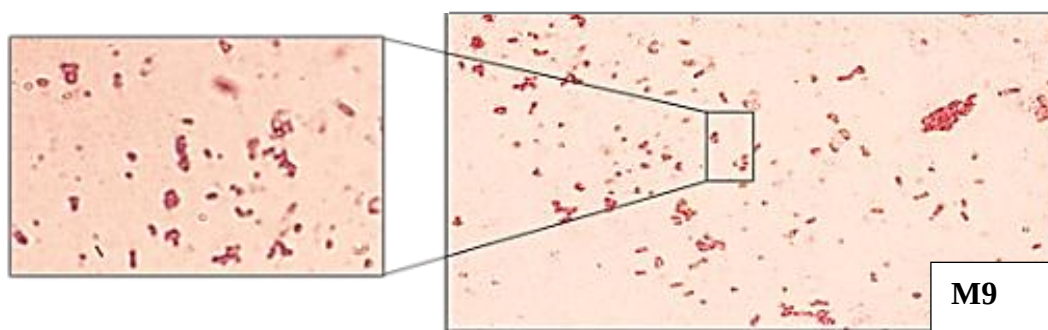


Figura 23. Tinción gram de los consorcios seleccionados gram (-) muestran: aislado 1 (M7), aislado 2 (M9) y aislado 3 (M11).

Fuente: Microscopio óptico a 100X.

Elaborado por: Hugo Iñiguez

3.4.2 Amplificación de la región 16S rADN.

3.4.2.1 Detección por PCR de los 3 matraces seleccionados.

Se analizaron los productos de PCR de los matraces seleccionados (M7, M9, M11) por geles de agarosa al 2% en donde se separaron las bandas por tamaño. Todas las muestras se amplificaron usando los primers universales 27F y 1492R, la elección de este par de primers son para bacterias, y genera fragmentos de aproximadamente 1500 pb de la región 16S rDNA (Figura 24), los tamaños de banda son similares en estudios antes realizados por (Benítez, 2009). El protocolo en el que se probó y vario los tiempos y temperaturas para amplificar la región 16S se presentan en el (Anexo 16) con el fin de estandarizar el proceso de PCR.

A continuación se muestran los resultados de la amplificación del ADN mediante PCR de las cepas aisladas del sector minero Tundayme: aislado 1 (M7), aislado 2(M9) y aislado 3 (M11) y las muestras control que son cepas puras obtenidas del Laboratorio de Biominería de la Universidad de Antofagasta- Chile: seleccionadas *A. ferrooxidans* C1, *A. thiooxidans* C3 y *L. ferrooxidans* C2. Los productos de amplificación se caracterizaron por su gran intensidad y nitidez.

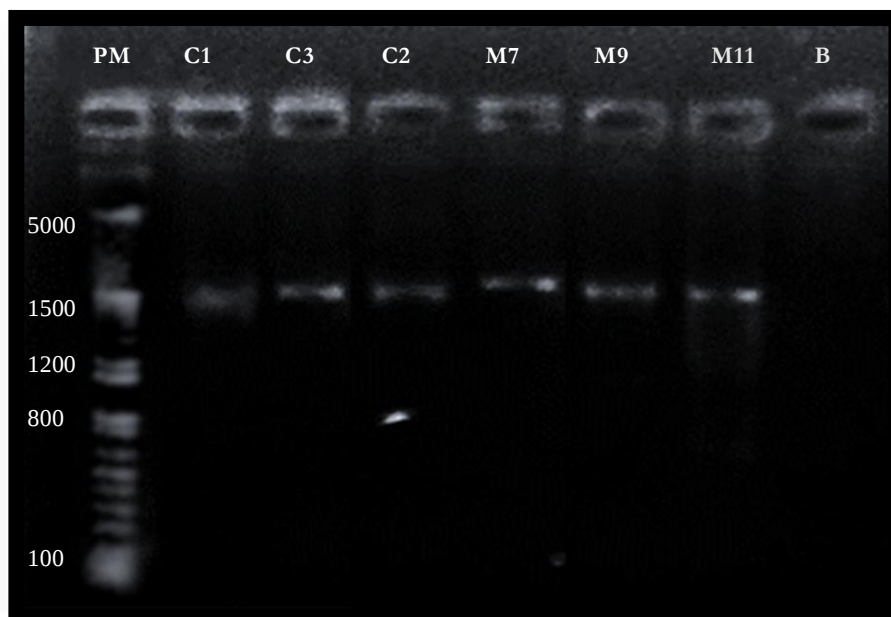


Figura 24 Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Resultados de la amplificación de la región 16S rADN bacteriano. (PM) 1 Kb ADN Ladder; (C1) Muestras control *Acidithiobacillus ferrooxidans*; (C2) Muestras control *Leptospirillum ferrooxidans*; (C3) Muestras control *Acidithiobacillus thiooxidans*; (M7) muestra aislado 1; (M9) muestra aislado 2; (M11) muestra aislado 3; (B) Blanco.

La identidad de las cepas bacterianas acidófilas aisladas puede ser confirmada mediante PCR por la amplificación que presentan en la región 16S las cuales presentan tamaños aproximados a 1500 pb, una muestra de otra presenta poca variación en el peso molecular (pm) y tienen relación con el tamaño de banda de las muestras controles obtenidos de cepas puras donadas por la Universidad de Antofagasta en Chile. Esto sugiere que uno de los componentes taxonómicos principales de los cultivos es del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*.

Estas bandas representadas de los cultivos aislados a partir de drenajes acidos y sedimento del sector Tundayme, es señal clara para determinar la identidad de las bacterias, estos resultados son muy similares al estudio de (Benítez, 2009).

CONCLUSIONES

- El sector minero Tundayme presenta un ambiente interesante para posteriores procesos de biolixiviación y comprensión sobre el funcionamiento de microorganismos de este ecosistema y sus procesos de adaptación a las condiciones del medio ambiente.
- Los microorganismos aislados disminuyen la capacidad de lixiviar después de períodos prolongados de tiempo debido a que la fuente de alimento es limitada, por lo que fue preciso mantenerlos replicando cada 48 horas con un nuevo medio y fuente de energía tratando de mantenerlos en crecimiento exponencial.
- Las mejores producciones (Q_p) se dieron en la muestra M7: con producción de hierro 0.126 y azufre de 0.605, M9: con productividad de 0.116 y M11: las producciones de hierro fueron de 0.446.
- Las mejores condiciones de crecimiento para el aislado 1 fueron pH 1.8 a 30 °C, para el aislado 2 fueron pH 6.5 a 30°C, para el aislado 3 fueron pH 1.2 a 30°C. Para las bacterias aisladas el pH óptimo de crecimiento fue por debajo de 6.5, por lo que se clasifican como acidófilas extremas.

RECOMENDACIONES

- En el estudio sería importante realizar el siguiente paso como la identificación mediante el análisis de nucleótidos dada por la secuenciación genómica de los microorganismos aislados.
- Con importantes cultivos oxidadores de azufre y de hierro se sugiere probar su capacidad oxidativa de estos organismos en minerales refractarios y sulfurados.
- Seguir con el aislamiento de nuevos microorganismos nativos que tengan la capacidad de ser oxidadores de hierro – azufre y que puedan llevar a cabo su aplicación en procesos de biolixiviación y biooxidación ya sea con condiciones diferentes a las reportadas en bibliografía.
- Mejorar los métodos de identificación de microorganismos, a través de programas específicos y equipos como microscopia de fluorescencia, entre otros que nos arrojen datos más precisos tanto en su identificación de microorganismos de interés como en su análisis de actividad para la recuperación de minerales de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, F. (2000). The use of reactor in biominig processes. *Electric Journal of Biotechnology*, 3, 184-190.
- Acevedo, F. (2002). Present and Future of Bioleaching in Developing Countries. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, 196-199.
- Acevedo, F., Gentina, J. (2005). Mecanismos de la biolixiviación, Fundamentos y perspectivas de las Tecnologías Biomineras. Valparaíso. Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Agudelo, J., Betancur, U., Largo, M. (2002). Biolixiviación de minerales sulfurosos. *Revista Facultad de Ingeniería*, 27.
- Andrews, J., Brimblecombe, P., Jickells, T., Liss, P., Reid, B. (2004). An Introduction to Environmental Chemistry. *Malden*.
- Arias, V., Rodríguez, C., Ramírez, P. (2012). Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. *Rev. Inst. Investig. Fac*, 15(30), 59-66.
- 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.
- Ballester, A. (2005). Mecanismos de Biolixiviación. En Acevedo F. y Gentina J.
- Benítez, A. (2009). Caracterización molecular de bacterias acidófilas de las zonas mineras Portovelo- Bella Rica- San Gerardo. Tesis de bioquímico farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador
- Bevilaqua, D., Leite, A., García, Jr O., Touvinen, O. (2002). Oxidation of Chalcopryrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry*, 38, 587-592.
- Bolívar, A., Rojas, A., García, P. (2014) PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3 (1), 25-33.
- Bosecker, K. (2001). Microbial leaching in environmental clean up programmes. *Hydrometallurgy*, 59, 245-248.
- Brierley, A., Brierley, C. (2001). Present and future commercial applications of biohidrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 59, 233-239.
- Brierley, C. (2008). Biominig extracting metals whit microorganisms.
- Butler, B., Kempton, A. (1978). Growth of *T. ferroxidans* on solid media containing heterotrophic bacteria. *J. Ind. Microbiol*, 2, 41-45.

- Carranza, F., Iglesias, N., Romero, R., Palencia, Y. (1983). Kinetics improvement of high grade sulphides bioleaching by effect separation. *FEMS Microbiology Reviews*, 1, 129-138.
- Cancio, M. (2005). Estudio del crecimiento y respiración de *Thiobacillus sp.* Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Cann J. (1989). Phenomenological theory of gel electrophoresis of protein-nucleic acid complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 17032-17040.
- Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C., Martínez, M. (2005). *Biotecnología Ambiental*. 250-253.
- Chen, Y., Barker, J., Gui, L. (2008). A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: a microcosm study. *J Contam Hydrol*, 96, 17-31.
- Colmer, A., Hinkle, M. (1947). The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: Preliminary Report. Agricultural y Engineering Experiment Stations
- Colmer, A., Temple, K., Hinckle, M. (1950). An iron- oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol*, 59, 317-328.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cortes, P., León, A., Quintero, V., Díaz, J. (2006). Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del Departamento de Boyaca. *Nova*, 4(5).
- Cox, J. Brand, M. (1984). Iron oxidation and energy conservation in the chemoautotroph *Thiobacillus ferrooxidans*, 31-46.
- Da Silva, G. (2004). Kinetics and mechanism of the bacterial and ferric sulphate oxidation of galena. *Hydrometallurgy*, 75, 99-110.
- Das, T., Ayyappan, S., Chaudhury, G. (1999). Factors Affecting Bioleaching Kinetics of Sulfide Ores Using Acidophilic Microorganisms. *BioMetals*, 12, 1-10.
- Deveci, H. (2002). Effect of solids on viability of acidophilic bacteria. *Minerals Engineering*, 15, 1181-1189.
- Deveci, H. (2004). Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. *Hydrometallurgy*, 71, 385-396.
- 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., (2006). Biominería: Una tecnología alternativa - Fundamin. Disponible en <http://www.fundamin.com.ar/es/publicaciones/61-mineria-y-medio-ambiente/105-biomineriauna-tecnologia-alternativa.html>.
- Donati, E. (2011). Biominería: una tecnología alternativa.

- Ehrlich, H. (1998). Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews*, 45, 45–60.
- Falco, L., Pogliani, C., Cruchet, G., Donati, E. (2003). A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy*, 71, 31-36.
- Fernández, A., Rojas, L., Dominguez, E., Coto, O., Casanovas, A., Alonso, J., Padilla, M., Álvarez, N. (2015). Biolixiviación de colas del proceso carbonato amoniacal empleando microorganismos autótrofos.
- García-Fraile. (2008). Identificación y caracterización de cepas que *Nodular phaseolus* en diferentes regiones de España. Tesis Doctoral, Salamanca.
- Garcia, J., Bigham, J., Tuovinen, O. (1995). Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal Microbiology*, 41, 508-514.
- Gómez, J., Cantero, D. (2005). Biooxidación del ión ferroso. Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras. 25-43.
- González, R. (1999). Biooxidación de un mineral concentrado refractario de oro en sistema continuo. Tesis de Maestría. Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Groudev, S., Lawrence, R., Branion, B., Ebner, H. (1986). Process Metallurgy 4. Fundamental and Applied Biohidrometallurgy. *Elsevier*, 355.
- Guerrero, J. (1998). Biotecnología en la disolución y recuperación de metales.
- Guerrero, J. (2004). Biotecnología en la disolución y recuperación de metales: Lixiviación bacteriana. *Revista Ciencias*.
- Hallin, S. (2009). Comparison of T-RFLP ADN DGGE techniques to assess denitrified community in soil. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 145-148.
- Hallmann, R., Friedrich, A., Koops, H., Pommerening, P., Röser, A., Rohde, K., Zenneck, C., Sand, W. (1992). Características fisiológicas de *Thiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* y factores físico-químicas que influyen en la lixiviación del metal. *Geomicrobiol J*, 10, 193-206.
- Haghshenas, D., Keshavarz, E., Bonakdarpour, B. Darvishi, D., Nasernejad, B. (2009). Cinética de biolixiviación esfalerita por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Elsevier*, 99, 202-208.
- Herrera, P. (2007). Aislamiento de *Tulasnella* spp. (Basidiomycota) a partir de raíces de cuatro especies de orquídeas epífitas. Tesis de Bioquímico-Farmacéutico. 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.
- Jaramillo, K., Chamba, P. (2014). Influencia de los parámetros de agitación y aireación en la biooxidación de un mineral aurífero refractario. Latin American and Caribbean Conference for Engineering and Technology.
- Jensen, A., Webb, D. (1995). Ferrous Sulphate Oxidation Using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Process Biochemistry*, 225-236.
- Juárez, A., Alcaraz, A. (2004). Biolixiviación de minerales sulfuro-ferrosos en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados.
- Leathen, W., Kinsel, N., Braley, S. (1956). *J. Bacteriol*, 72, 700-704.
- Liberona, I. (2009). Estudio de la biolixiviación de pirita por un cultivo de *Sulfobacillus acidophilus* a 45° C.
- Lane et al. (1985). Phylogenetic Analysis of the Genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira* by 5S rRNA Sequences. *Journal of Bacteriology*, 75-81.
- López, C. (2007). Biominería. http://personal.us.es/evpolo/pdf/trab_dirig/Carmen%20opezlopezcorregido.pdf
- Macalady, J., et al. (2006). Dominant Microbial Populations in Limestone-Corroding Stream Biofilms, Frasassi Cave System, Italy. *Applied and environmental microbiology*. 72.
- Makita, M., Esperón, M., Pereyra, B., López, A., Orrantía, E., (2004). Reduction of arsenic content in a complex galena concentrate by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology*, 4,1-22.
- Markosyan, G. (1972). A new Iron-Oxidizing Bacteria: *Leptospirillum ferrooxidans* gen. et sp. *Biol. ZL. Armenii*, 25-26.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J., Soulas, G. (2001). ADN Extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol*, 67(5), 2354-2359.
- Manzuelo, A. (1998) Biooxidación en continuo del ión ferroso en disolución en reactores de lecho fijo inundado. Tesis de Ciencias Químicas. Universidad Sevilla, España.
- Masau, R., Oh, J., Suzuki, I. (2001). Mechanism of oxidation of inorganic sulfur compounds by thiosulfate-grown *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(4), 348-358.
- Medina, M., Merino, L. (2010). Identificación de bacterias periodontopatógenas mediante métodos diagnósticos moleculares, 12(1), 4-13.
- Mejía, E. (2010). Mineralogía del proceso de lixiviación bacteriana de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Colombia, Colombia.

- Mejía, E., Ospina, J., Osorno, B., Márquez, M., Morales, A. (2011). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS_2), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 132-143.
- Mejía, R., Ospina, C., Márquez, M. (2007). Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de la galena (PbS) por *Acidithiobacillus ferrooxidans*, mediante análisis de microscopía electrónica de barrido, FTIR y DRX. *Scientia et Technica*, 36, 549-554.
- Meruane, G., Vargas, T. (2003). Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH 2.5-7.0. *Hidrometallurgy*, 71, 149-158.
- Midence, R., García, J. (2013). Evaluación del potencial de bio-lixiviación fungal autóctona e inoculada de metales en suelos sedimentos contaminados en la región minera de Santo Domingo-Chontales. Tesis de grado. Universidad Centroamericana, Nicaragua.
- Miyoshi, T., Iwatsuki, T., Naganuma, T. (2005). Phylogenetic Characterization of 16S rRNA Gene Clones from Deep-Groundwater Microorganisms That Pass through 0.2-Micrometer-Pore-Size Filters. *Applied and environmental microbiology*, 71, 1084-1088.
- Morin, D., Lips, A., Pinches, T., Huisman, J., Frias, C., Norberg, A., Forssberg, E. (2006). BioMinE—Integrated project for the development of biotechnology for metal-bearing materials in Europe. *Hydrometallurgy*, 83, 69-76.
- Muir, M., Andersen, T. (1977). Determination of ferrous iron in copper-process metallurgical solutions by the o-phenanthroline colorimetric method. *Metallurgical Transaction*, (8), 517- 518.
- Muqing, Q., Genxuan, W., et al. (2006). Optimizing conditions for bacterial leaching of copper from discarded mines. *Journal of University of Science and Technology Beijing*, 13, 108-112.
- Mullis, K., Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth Enzymol*, 55, 335-350.
- Muñoz, A., Márquez, M., Montoya, O., Ruiz, O. (2003). Lemehsko, V. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 5, 73-81.
- Okereke, A., Stevens, S. (1991). Cinética de la oxidación del hierro por *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57 (4), 1.052-1.056.
- Ospina, J., Mejía, E., Osorno, L., Márquez, M., Morales, A. (2011). *Rev. Colomb. Biotecnol*, 14, 135-145.
- Ossa, D., Márquez, M. (2007). Biooxidación de sulfuros mediante cepas nativas de acidófilos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *thiooxidans*, mina de oro el Zancudo. *Revista Colombiana de biotecnología*, 7(2), 55-66.

- Paladines, A. (2010). Zonificación geotectónica y metalogenia del Ecuador.
- Pronk, J., Lien, K., Bos, P., Kuenen, J. (1991). Energy transduction by anaerobic ferric respiration in *T. ferrooxidans*. *Appl. Environ Microbiol*, 57, 2063-2068.
- Ramírez, H. (2000). Detección y Tipificación de Actinomicetos Patógenos Basadas en Técnicas Moleculares, 9, 205.
- Rawlings, D. (2005). Characteristics and adaptability of iron–and sulfur–oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*, 4, 13.
- Rivera, R., Camejo, P., Moya, F., López-Méndez, J., Munguía-Bravo, M. (2011). Estudio de biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias tio-y ferro-oxidantes en condiciones termófilas. *Revista de la Facultad de Ingeniería*, 26,
- Rodicio, M., Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Tesis Inédita. Universidad de Oviedo, España.
- Rohwerder, T., Sand, W. (2003). The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology*, 149, 1699-1709.
- Rosales, V., Guerrero, J., Sáez, M. (2001). *Industrial*, 2, 7-10.
- Rossi, G. (1990). Biohidrometallurgy. McGraw- Hill Book Company GmbH. Hamburgo.
- Rossi, G. (2001). The design of bioreactors. *Hidrometallurgy*, 59, 217-231.
- Rozas, P., Valero, T. (2007). Estudio de la actividad oxidativa y crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en la oxidación de ión ferroso en presencia de carbón activado.
- Saavedra, A., Cortón, E., Argentina, A. (2014). Biotecnología microbiana aplicada a la minería. *Química Viva*, 13 (3), 148-163.
- Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., Zenneck, C. (1992). Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (1), 85-92.
- Sand, W., et al. (1999). Direct versus indirect bioleaching. In *Biohydrometallurgy and the Enviroment toward the Mining*, 42, 27- 50.
- Silverman, M., Ehrlich, H. (1959). Microbial formation and degradation of minerals. *Advances in Applied Microbiology*. 6, 153-206.
- Silverman, M., Rogoff, M., Wender, I. (1961). Bacterial oxidation of pyritic materials in coal. *Appl. Microbiol*, 9 (6), 491-496.
- Sato, A., Fukumori, T., Yano, M., Yamanaka, T. (1989). *Thiobacillus ferrooxidans* cytochrome c-552: purification and some of its molecular features. *Biochim. Biophys. Acta*, 976, 129-134.
- Suzuki, I. (2001). *Biotechnol. Adv*, 19, 119-132.

- Temple, K., Colmer, A. (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. Engineering Experiment Station.
- Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59, 177-185.
- Tuovinen, H., Niemela, I., Gyllenberg, G. (1971). Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie van Leewenhoek*, 37, 489-496.
- Williamson, M., Rimstidt, J. (1994). The kinetics and electrochemical rate-determining step of aqueous pyrite oxidation. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 58, 5443- 5454.
- Yousefi, A., Hejazi, P., Allahverdi, A. (2013). Evaluation of Effective Strategies for Cultivation of *Acidithiobacillus thiooxidans* as Cement-Degrading Bacteria. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 10(2).

ANEXOS

Anexo 1. Matraces utilizados durante el aislamiento de los primeros días.



Anexo 2. Composición del medio de cultivo 9k utilizado para el aislamiento de bacterias sulfo-hierro-oxidantes elaborado por (Silverman y Lundgren medio (9K))

Tabla 1: Medio Base para el género *Acidithiobacillus* (aislado 1).

Componentes	g / L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0
KCl	0.1
K_2HPO_4	0.5
MgSO_4	0.5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.01
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44.8
pH ajustado con ácido sulfúrico	1,8

Elaborado por: Hugo Iñiguez

Tabla 2: Medio Base para el género *Acidithiobacillus* (aislado 2).

Componentes	g / L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0
MgSO_4	0.5
K_2HPO_4	0.25
Azufre elemental	10.00
pH ajustado con ácido sulfúrico	2.4

Elaborado por: Hugo Iñiguez

Tabla 3: Medio base para el género *Leptospirillum* (aislado 3).

Componentes	g / L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0
KCl	0.1
K_2HPO_4	0.5
MgSO_4	0.5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.01
pH ajustado con ácido sulfúrico	1.2
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44.8

Elaborado por: Hugo Iñiguez

Anexo 3. Agitador Shaker utilizado durante el proceso de crecimiento bacteriano



Anexo 4. Conteo por cámara de Neubauer

Se colocó un volumen determinado para cada lado en la cámara, hasta cubrir completamente la misma, se cubrió con portaobjetos y finalmente se colocó una gota de aceite de inmersión y luego se observó en el microscopio con lente 100X, seguido se procede a contar a partir del cuadrante central (rejilla central) el conteo celular se realiza en diagonal por los grupos G1, G2, G3, G4 y G5. Como muestra la figura1.

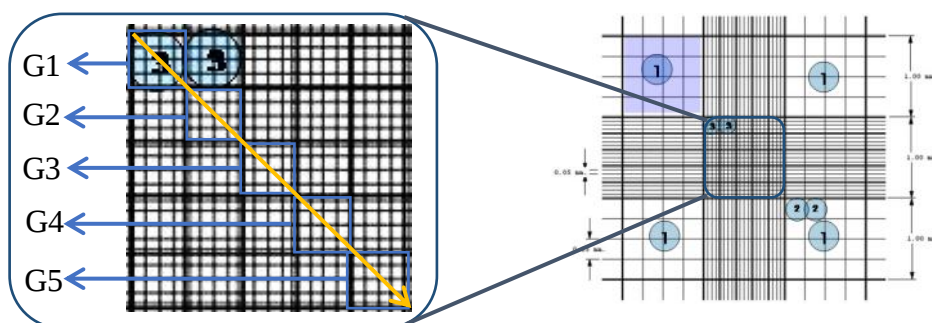


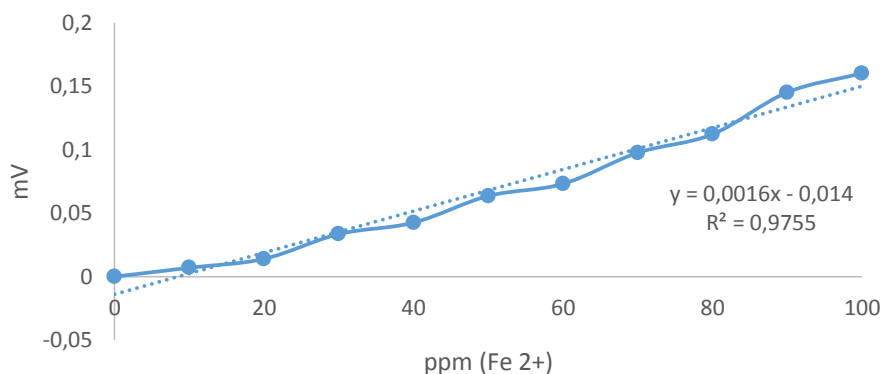
Figura 1. Conteo por grupos en cámara de Neubauer.
Elaborado por: Hugo Iñiguez

Seguido para determinar el número de bacterias/ mL fue necesario aplicar la siguiente ecuación.

$$\frac{\#bac}{ml} = \frac{4.10^6 * FD * \#bac.contadas}{20}$$

Anexo 5. Determinación de ión ferroso y hierro total elaborado por (González, 1999; Muir y Andersen, 1997)

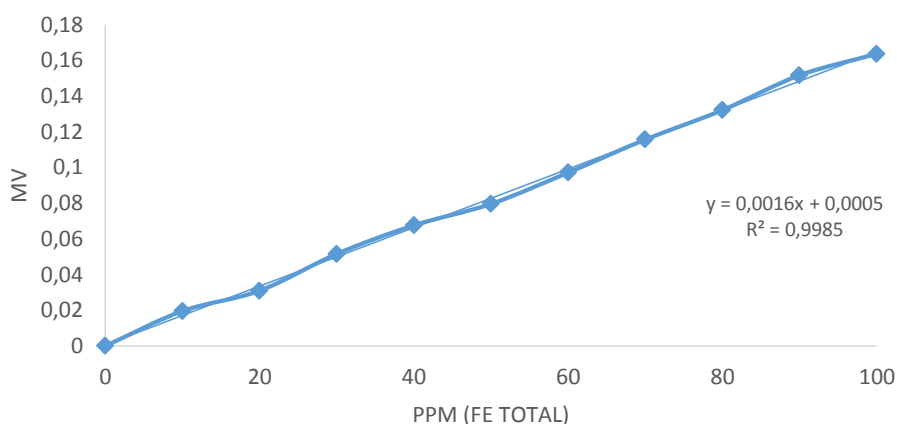
➤ **Procedimiento para determinación de Fe^{2+} y curva de calibración.**



Grafica 1. Curva de calibrado para Fe^{2+} determinada por la sustancia ya conocida.

- La muestra (0.1mL), en el rango de 10 –100 ppm de Fe^{2+} , se colocó en un tubo de 10 mL. Previamente, la muestra se diluyó con agua destilada para que la concentración de Fe^{2+} este dentro del rango señalado.
- Se añadió reactivo fluoruro complejante (1.0 mL), seguido se agitó el tubo por 2 minutos
- Se añadió 0.4 mL del reactivo ortofenantrolina y el tubo se agita vigorosamente por 2 minutos.
- La mezcla se diluyó a 2.5 mL con agua destilada acidulada (pH 1.8) y el tubo se agitó nuevamente.
- Después de 5 minutos y a temperatura ambiente se lee la absorbancia en UV visible a 510 nm

➤ **Curva de calibrado para medición de hierro total en mV y procedimiento para determinarlo.**

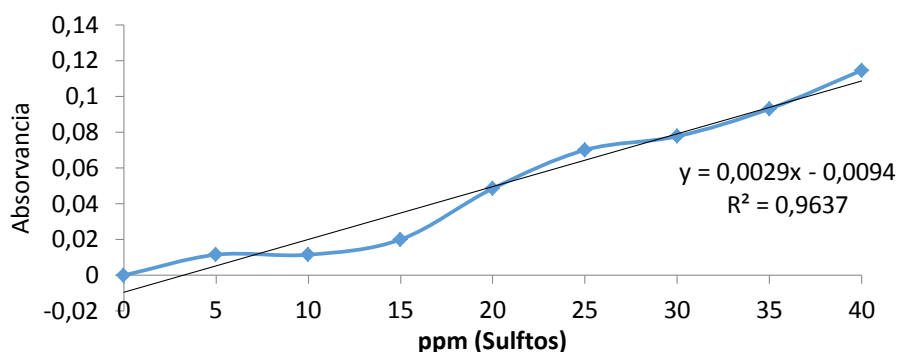


Grafica 2. Curva de calibrado para Fe total determinada por la sustancia ya conocida.

- La muestra (0.1mL), en el rango de 10 –100 ppm de Fe Total se colocó en un tubo de 10 mL. Previamente, la muestra se diluyó con agua destilada para que la concentración de Fe Total este dentro del rango señalado.
- Se agregó 0.1 mL de Agente reductor (Clorhidrato de Hidroxilamina al 10%) y se agitó fuertemente durante 3 minutos aproximadamente.
- Se añadió 0.4 mL del reactivo fenantrolina y el tubo se agitó vigorosamente por 2 minutos.
- La mezcla se diluyó a 2.5 mL con agua destilada acidulada (pH 1.8) y el tubo se agitó nuevamente.
- Después de 5 minutos y a temperatura ambiente se lee la absorbancia en UV visible a 510 nm

El blanco contiene todos los reactivos excepto la muestra, la cual se reemplaza por agua destilada. Para la curva de calibrado se realizó soluciones estándares de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un rango de 10 a 100 ppm. Estas soluciones se procesan y se leen de manera idéntica a la solución problema.

Anexo 7. Curva de calibrado para medición de Sulfatos en mv y determinación de sulfatos por (González, 1999).



Grafica 1. Curva de calibrado para sulfatos determinada por la sustancia ya conocida.

Elaborado por: Hugo Iñiguez

- Se tomó una muestra y se realizó un factor de dilución a un aforo de 2mL
- Se colocó la muestra diluida en un tubo de ensayo y se añadió 0.1 mL de reactivo condicionante.
- Se agitó continuamente durante 3 minutos.
- Se añadió cloruro de bario con la ayuda de una espátula y se agitó por un minuto.
- Se midió la absorbancia a 520 nm durante 4 minutos, tomando como el valor máximo.
- Se tomó como blanco a una muestra que no se añadió cloruro de bario.
- Para la curva de calibrado se realizó soluciones estándares de Na_2SO_4 anhidro en un rango de 10 a 100 ppm. Estas soluciones se procesan y se leen de manera idéntica a la solución problema.

Anexo 8. Procedimiento para realizar la tinción gram

Se procede colocando la muestra en un porta objetos y se flamea cuidadosamente la parte posterior para poder fijar la muestra, seguido realiza la tinción con los siguientes colorantes:

- 1. Cristal Violeta: Se colocan gotas sobre la placa hasta cubrir la muestra y se espera por 1.25 minutos, seguido Lavar cuidadosamente con el agua destilada desde la parte de atrás del portaobjetos con el fin de no perder muestra.
- 2. Lugo: Una vez ya lavada la placa, se deja escurrir por 30 segundos y se coloca la solución del Lugol, igualmente hasta cubrir la muestra de la placa y esperar 1.25 minutos, después lavar cuidadosamente con agua destilada.

- 3. Alcohol Cetona: Se aplica por 1 min sobre la muestra con el fin de sacar el exceso de colorante, seguido se escurre pero no se lava con agua.
- 4. Safranina.: Se coloca por 35 segundos y se lava con agua destilada.
- Finalmente se deja las placas al ambiente o en la estufa para que se seque máximo de 7 a 10 minutos para luego observar en el microscopio.

Anexo 9. Proceso de Aislamiento de ADN Genómico para Bacterias Gram Negativas utilizando el Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

- Se toma 1mL de cultivo en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL posteriormente se centrifuga a 13.000-16.000 rpm durante 2 minutos para formar el pellet y descarta el sobrenadante, este proceso se repite de acuerdo a las muestras deseadas, posteriormente incuba la muestra a 37°C durante 60 minutos y se centrifuga durante 2 minutos a 16,000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante; posteriormente realizar el lisado celular de las bacterias añadiendo 600µl de Solución de Lisis de nucleótidos e incubar a 80 ° C durante 5 minutos; luego enfriar a temperatura ambiente, terminado el tiempo añadir 3µl de la solución de RNasa al lisado celular y se mezclar bien.
- Se incuba a 37 ° C durante 60 minutos y posteriormente se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente. Luego se agrega 200µL de la Solución del precipitado de proteínas al lisado celular tratado con RNasa y se mezclar bien con ayuda del vórtex a alta velocidad durante 20 segundos, finalmente se incuban las muestras en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 16,000 rpm durante 3 minutos.
- Seguido se transfiere el sobrenadante que contiene el ADN a un nuevo tubo de 1.5 mL que contiene 600µL de isopropanol, seguido suavemente se mezclar girando el tubo varias veces y se observar las hebras de ADN.
- Para el proceso de purificación las muestras se centrifuga a 13.000–16.000 rpm por 2 min y eliminar el sobrenadante y secar el tubo con papel absorbente, para lavar el pellet donde contiene ADN; se añadió 600µL de etanol al 70% a temperatura ambiente y centrifugar a 13.000–16.000 rpm por 2 minutos después aspirar cuidadosamente el etanol y drenar cuidadosamente el sobrenadante contenido en el tubo y dejar secar con papel absorbente y aireación de 10–15 minutos. Finalmente añada 100µL de Solución de rehidratación de DNA e incubar a 65°C por 1 hora, el tubo se mescló periódicamente con el fin de re-hidratar completamente el pellet
- Para almacenar las muestras, deje enfriar a temperatura ambiente y conservar en un congelador de 2–8°C.

Anexo 10. Proceso de cuantificación de los productos de ADN por Nanodrop.

Se toma 1 μL de muestras y se midió su absorbancia frente a un blanco de agua estéril, el cálculo de la concentración de ADN utiliza absorbancias de 260nm y para la pureza se estimó por la relación entre la absorbancia a 260nm y 280nm.



Anexo 11. Mix de PCR

Mix de PCR de 25 μL para cada muestra; se añadió 2.5 μL de muestra de ADN en el siguiente orden: agua estéril 20.3 μL , buffer II 2.5 μL , primer 27F (0.5 μL) y 1492R (0.5 μL), 10pM, BSA 10% 1 μL y Taq-polimerasa Acuu prime Hi-Fidelity 0.2 μL .

Anexo 12. Proceso del termociclador para la (PCR).

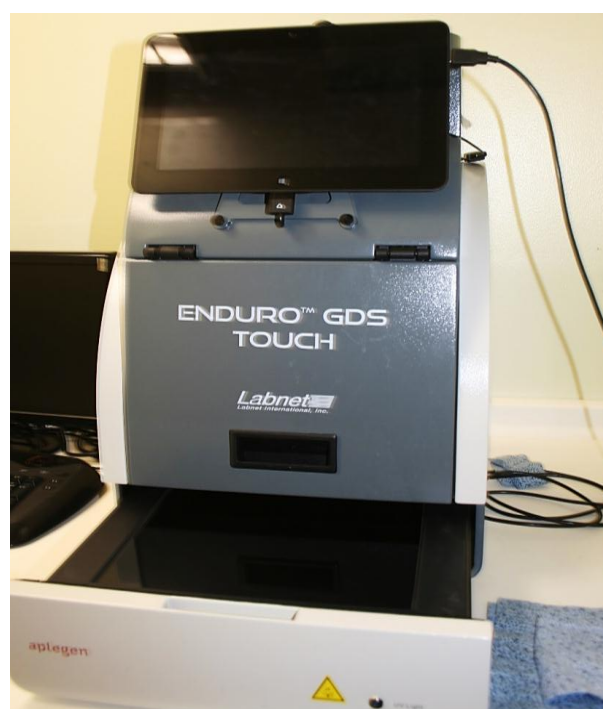
Se colocó la serie de tubos en un termociclador que consta de 3 pasos llevado uno después del otro, en períodos de ciclos con una reacción completa de 35 ciclos. El primer paso es la desnaturalización, ocurre a 94°C por 5min, donde el ADN pierde su estructura de doble cadena a cadenas sencillas. En el segundo paso annealing los cebadores (primers) se acoplan con segmentos específicos de ADN que presenten la secuencia complementaria, la temperatura ocurre a 53°C por 45seg y está determinada por la longitud y constitución nucleotídica de los cebadores. En el tercer paso extensión, la polimerasa utiliza los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) del Buffer II y el ADN como molde, para generar una nueva cadena de ADN complementario a la secuencia diana, ocurre a partir de los

cebadores. La temperatura óptima para el funcionamiento de la enzima Acuu prime polimerasa es de 68°C por 60seg, 1 ciclo de elongación final de 68°C por 10 min y finalmente mantener a 4°C.

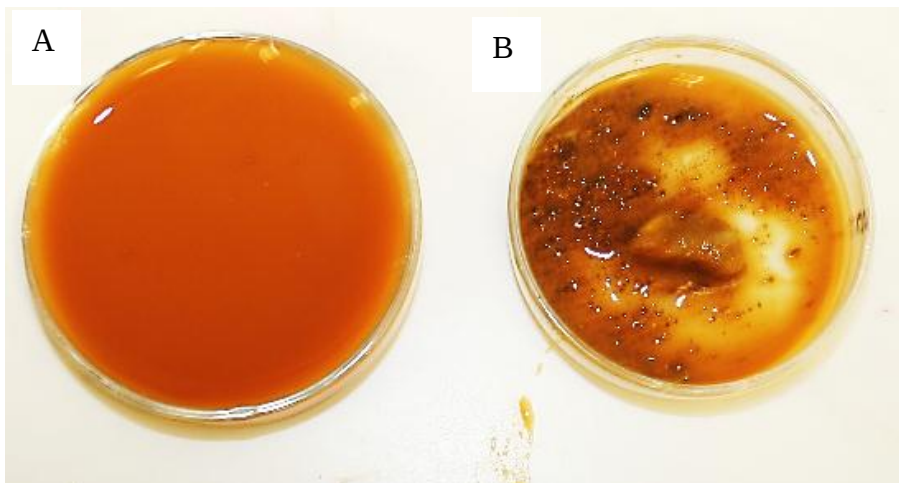
Anexo 13. Equipo utilizado para electroforesis.



Anexo 14. Equipo utilizado para revelar las bandas en geles por uV.



Anexo 15. Muestras del sector Tundayme para el proceso de aislamiento.



Elaborado por: Hugo Iñiguez

Adaptación y oxidación de las cepas microbianas.



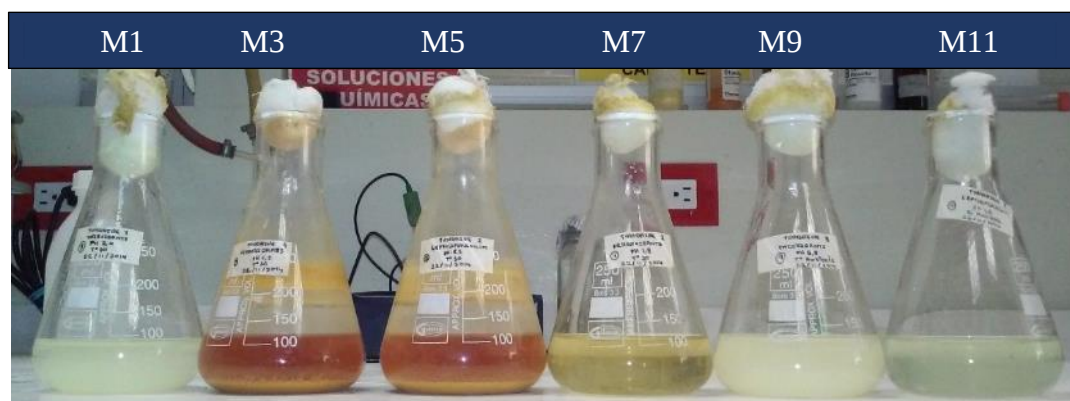
Imagen 1. Matraces muestran coloración del nuevo medio color verdoso y el mismo medio después de 2 días con color rojizo debido a la oxidación del hierro.



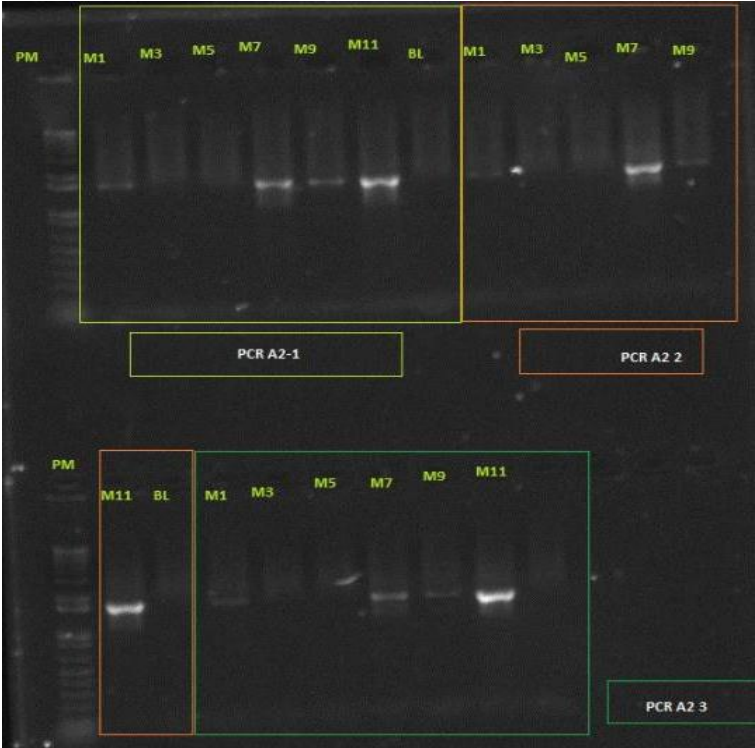
Imagen 2. Matraces muestran coloración del nuevo medio color transparente agua y el mismo medio después de 3 días presenta color lechoso debido a la producción del sulfuros.

Elaborado por: Hugo Iñiguez

Anexo 16. Matraces seleccionados con las mejores condiciones para análisis Químicos.



Anexo 17. Variación de Tiempos y Temperaturas para establecer protocolos.



PCR	Número de ciclos	Actividad	Temperatura (° C)	Tiempo
A2-1	1	Desnaturalización	94	2 min.
	35	Desnaturalización	94	30 seg.
		Alineamiento	53	30 seg.
		Elongación	68	60 seg.
	1	Elongación final	68	2 min.
		Mantener	4	∞
A2-2	1	Desnaturalización	94	2 min.
	35	Desnaturalización	94	30 seg.
		Alineamiento	52	30 seg.
		Elongación	72	60 seg.
	1	Elongación final	72	2 min.
		Mantener	4	∞
	1	Desnaturalización	94	2 min.

A2-3	35	Desnaturalización	94	30 seg.
		Alineamiento	54	30 seg.
		Elongación	68	60 seg.
	1	Elongación final	68	2 min.
		Mantener	4	∞

Tabla 1. Variación de los ciclos térmicos utilizados para la estandarización de la amplificación del gen 16S rADN empleando primers universales para bacterias.