



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO

Producción de sustancias poliméricas extracelulares de los microorganismos acidófilos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* en medio puro y modificado con un mineral aurífero refractario

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Ordóñez Salcedo, Jonathan Alejandro

DIRECTORA: Aguirre Chamba, Paulina Isabel, Ing.

LOJA-ECUADOR

2017



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>

2017

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniera.

Paulina Isabel Aguirre Chamba

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación Producción de sustancias poliméricas extracelulares de los microorganismos acidófilos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* en medio puro y modificado con un mineral aurífero refractario, realizado por Ordóñez Salcedo Jonathan Alejandro ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2017

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Jonathan Alejandro Ordóñez Salcedo declaro ser autor del presente trabajo de fin de titulación: **Producción de sustancias poliméricas extracelulares de los microorganismos acidófilos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* en medio puro y modificado con un mineral aurífero refractario**, de la titulación de Ingeniería Química, siendo Paulina Isabel Aguirre Chamba director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 68 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.

Autor: Jonathan Alejandro Ordóñez Salcedo

Cédula: 1105036022

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado primeramente a Dios, que ha sabido guiar mis pasos y me ha permitido llegar a esta etapa tan importante en mi formación profesional. A mis padres y hermana, quienes son las personas más importantes en mi vida, ellos con su amor y consejos me han ayudado a superar las dificultades y así llegar a culminar exitosamente este trayecto.

Alejandro Ordóñez

AGRADECIMIENTO

Primeramente, el agradecimiento más sincero a Dios, por permitirme celebrar este logro y darme la oportunidad de cumplir una meta más en mi vida.

A mis padres, Mario y Marisol, que a pesar de las dificultades han sabido apoyarme y guiarme hasta alcanzar este sueño, gracias por siempre estar ahí para mí y compartir conmigo este momento tan importante.

A mi hermana, Scarlett, quien a pesar de las peleas y problemas es una de mis más grandes inspiraciones.

A mi tutora de trabajo de titulación, Ingeniera Paulina Aguirre quien ha sido uno de los pilares fundamentales en la realización de este trabajo, gracias por su paciencia y por sus conocimientos, de igual manera gracias por su confianza y la oportunidad de trabajar a su lado.

A mi tribunal, Ph. D Eduardo Valarezo y Ph. D Aminael Sánchez, gracias por guiarme y estar al pendiente de este trabajo.

A Mael y Rebe, quienes han sido mis compañeras de laboratorio y sin su ayuda no hubiese sido posible la realización de este proyecto.

A Mael y Daniel, mis amigos con quienes he pasado los mejores momentos dentro de la universidad, gracias por el apoyo y las experiencias compartidas.

A Mónica, por ser mi pilar fundamental, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por darme ánimos para seguir adelante siempre, porque siempre me apoyaste y estuviste ahí en los momentos buenos y malos.

A todas esas personas que supieron brindarme su apoyo y con las cuales he compartido experiencias a lo largo de este difícil camino.

Alejandro Ordóñez

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I	5
1.MARCO TEÓRICO	6
1.1. Objetivos.....	6
1.2. Biominería.....	7
1.3. Biooxidación.	7
1.4. Microorganismos que intervienen en el proceso de biooxidación.	7
1.4.1. Género <i>Acidithiobacillus</i>	7
1.4.1.2. <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	8
1.4.2. Género <i>Leptospirillum</i>	8
1.5. Mecanismos de biooxidación.	9
1.5.1. Mecanismo vía tiosulfato o de contacto.	9
1.5.2. Mecanismo vía polisulfuro-azufre o de no contacto.	10
1.6. Sustancias poliméricas extracelulares.	11
1.6.1. Inductores en la producción de EPS.	11
CAPÍTULO II	13
2.METODOLOGÍA.....	14
2.1. Análisis de la muestra mineral.	14
2.1.1. Procesamiento del mineral.	14
2.2. Activación y propagación de los microorganismos <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T y <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 ^T	14

2.3. Cinéticas de crecimiento en cultivos de <i>A. thiooxidans</i> DSM 14887 ^T y <i>L. ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T	15
2.4. Producción de EPS en <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 ^T utilizando galactosa como inductor.....	15
2.5. Producción de EPS en <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T utilizando ion férrico como inductor.....	16
2.6. Producción de EPS en <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T y <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 ^T utilizando un mineral como inductor.....	16
2.7. Diseño experimental.....	17
2.8. Análisis estadístico para la producción de EPS en cultivos de <i>A. thiooxidans</i> DSM 14887 ^T y <i>L. ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T	18
2.9. Determinaciones analíticas.....	18
2.9.1. Determinación del número de bacterias.....	18
2.9.2. Medición de pH.....	18
2.9.3. Determinación de Fe ²⁺ , Fe ³⁺ y hierro total.....	19
2.9.4. Determinación de Sulfatos.....	19
2.9.5. Extracción de EPS a partir de los cultivos de <i>A. thiooxidans</i> y <i>L. ferrooxidans</i> ...	19
2.9.6. Determinación de carbohidratos.....	20
2.9.7. Determinación de proteína.....	20
CAPÍTULO III	21
3.RESULTADOS Y ANÁLISIS	22
3.1. Cinéticas de crecimiento microbiano para <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 ^T y <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T	22
3.1.1. Cinética de crecimiento en cultivos de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 ^T adaptadas a galactosa.....	22
3.1.2. Comparación de medias de la velocidad de crecimiento en cultivos de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 ^T	25
3.1.3. Cinética de crecimiento en cultivos de <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T adaptadas a ion férrico.....	26
3.1.4. Comparación de medias de la velocidad de crecimiento en cultivos de <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T	30
3.2. Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).....	31
3.2.1. Extracción de EPS en cultivos de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> adaptadas a galactosa y mineral.....	31

3.2.2. Análisis estadístico de la producción de EPS en cultivos de <i>A. thiooxidans</i> adaptadas a galactosa.....	34
3.2.3. Extracción de EPS en cultivos de <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 ^T adaptadas a ion férrico y mineral.	35
3.2.4. Análisis estadístico de la producción de EPS en cultivos de <i>L. ferrooxidans</i> adaptadas a ion férrico.	37
3.2.5. Extracción de EPS en cultivos de <i>L. ferrooxidans</i> y <i>A. thiooxidans</i> utilizando un mineral refractario como fuente de energía e inductor de EPS.	38
3.2.6. Análisis estadístico de la producción de EPS en cultivos de <i>L. ferrooxidans</i> y <i>A. thiooxidans</i> utilizando mineral como inductor.....	41
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	51

RESUMEN

La biooxidación en la industria se utiliza como un pre-tratamiento para la recuperación de oro. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) están relacionadas con la formación de biopelículas y junto con los iones férricos oxidan el mineral aurífero. Por esta razón el objetivo principal de esta investigación fue inducir la producción de EPS en cultivos microbianos de las especies *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*. Los microorganismos empleados fueron *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, los cuales crecieron a pH 1.8 y 1.3 respectivamente y a una temperatura de 30°C. Además, fueron adaptados a diferentes concentraciones de galactosa (0, 0.15, 0.25 y 0.35%), hierro (9, 18, 27 y 36 g/L) y 2% p/v de mineral. Se determinaron las cinéticas de crecimiento, producción de EPS, oxidación de hierro y sulfatos. Las mayores cantidades de EPS en *Acidithiobacillus thiooxidans* se obtuvieron utilizando 0.25% de galactosa, mientras que para los cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* la mayor producción se obtuvo con una concentración de hierro de 27 g/L. El mineral induce la producción de EPS, pero en menor cantidad a los inductores antes mencionados.

Palabras clave: biooxidación, EPS, galactosa, ion férrico, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*.

ABSTRACT

In the industry biooxidation is used as a pre-treatment for gold recovery. The extracellular polymeric substances (EPS) are related to biofilm formation and, together, with the ferric ions they oxidize the mineral. For this reason the main objective of this research was inducing the production of EPS in microbial cultures of the species *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. The microorganisms used were *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*, which grew at pH = 1.8 and 1.3 respectively and with a temperature of 30 °C. They were also adapted to different galactose concentrations of (0, 0.15, 0.25 and 0.35%), iron (9, 18, 27 and 36 g / L) and 2% p/v of ore. Growth kinetics, EPS production, oxidation of iron and sulphates were determined. The highest amounts of EPS in *Acidithiobacillus thiooxidans* cultures were obtained using 0.25% of galactose, while for the *Leptospirillum ferrooxidans* cultures the highest production of EPS was obtained with an iron concentration of 27 g/L. The mineral induces the production of EPS, but in a fewer extent to the inducers mentioned before.

Key words: biooxidation, EPS, galactose, ferric ion, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*.

INTRODUCCIÓN

La biooxidación es un proceso que se utiliza en la minería como pre-tratamiento de menas auríferas refractarias previo a la cianuración (Ospina et al., 2012). Dentro de este proceso los microorganismos acidófilos como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* o *Leptospirillum ferrooxidans* son los más importantes para la extracción de metales a partir de minerales sulfurados (Harneit et al., 2006). Estos microorganismos pueden construir estructuras como las biopelículas, las cuales son comunidades de microorganismos rodeadas de sustancias poliméricas extracelulares (EPS - de sus siglas en inglés) (Aguirre, 2012, Karatan y Watnick, 2009). Las EPS son mezclas complejas de polímeros generados por estos microorganismos, se componen principalmente de carbohidratos y proteínas. Se cree que las EPS junto con los iones férricos concentrados dentro de esta oxidan el mineral (He, Yang, Zhou, Hu, & Zhong, 2014). Estas sustancias cumplen dos funciones importantes durante el proceso de biooxidación como son: enlazar a los microorganismos a la superficie mineral y facilitar la acción oxidante del hierro (III) sobre el sulfuro metálico (Sand et al., 2005).

Por esta razón el objetivo de este estudio fue inducir la producción de sustancias poliméricas extracelulares en cultivos microbianos de las especies *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* y compararlas frente a la producción de EPS sin inductores en dichas especies.

Por lo tanto en el capítulo 1 se presenta el marco teórico, el cual describe las bases para la comprensión del proceso de biooxidación y la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Se describe el tipo de microorganismos acidófilos que intervienen, sus mecanismos de acción, además se mencionan las condiciones físicas y químicas que se deben considerar antes y durante la adaptación de los microorganismos para la producción de EPS. Finalmente se describe la función de los inductores para obtener una mayor producción de EPS y su uso en la biooxidación.

En el capítulo 2 se detalla la metodología utilizada para la adaptación microbiana y obtención de EPS a partir de los microorganismos acidófilos, el diseño experimental que se utilizó, y técnicas analíticas que permitieron cuantificar la cantidad de EPS obtenida.

El capítulo 3 muestra los resultados obtenidos en el estudio, los métodos estadísticos utilizados para el análisis de resultados. Además se presentan las cinéticas de crecimiento bacteriano y cantidad de EPS obtenida.

Finalmente se encuentran las conclusiones y recomendaciones obtenidas a partir de los resultados de este estudio.

En el presente estudio se logró determinar que el uso de galactosa, hierro y mineral tienen una gran influencia en la producción de EPS, ya que al someter los cultivos microbianos a dichos inductores la concentración de exopolímeros fue mayor.

Los objetivos propuestos en esta investigación, tuvieron gran alcance puesto que se logró una adecuada adaptación de los microorganismos a los inductores (galactosa e ion férrico) y posteriormente se obtuvo mayores cantidades de EPS, lo que demuestra la influencia que tienen en la producción de exopolímeros. Durante estos bioensayos (adaptación y extracción de EPS) se determinó la concentración de pH, Fe^{2+} , Fe total, sulfatos y conteo celular. Por último se cuantificó la producción de EPS en mg/L, EPS por célula y EPS total en presencia de los inductores (ion férrico, galactosa y mineral).

Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo mediante la medición de parámetros como: hierros, sulfatos, concentración celular y pH, esto con la finalidad de encontrar el tiempo máximo de crecimiento celular. Por otro lado en el tiempo establecido en las cinéticas de crecimiento se realizó la extracción de EPS, el cual se cuantificó por medio de la concentración de carbohidratos y proteínas en mg/L.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Objetivos.

Objetivo General

Inducir la producción de sustancias poliméricas extracelulares en cultivos microbianos de las especies *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* y compararlas frente a la producción de EPS sin inductores en dichas especies.

Objetivos específicos

Determinar la capacidad inductora de la galactosa en la producción de sustancias poliméricas extracelulares en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Determinar la capacidad inductora del hierro en la producción de sustancias poliméricas extracelulares en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans*.

Determinar la capacidad inductora de un mineral aurífero refractario en la producción de sustancias poliméricas extracelulares en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Hipótesis de trabajo

H₀: La presencia de hierro, galactosa y mineral no induce la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en los microorganismos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, en aproximadamente un 30% más con respecto a la producción de EPS en ausencia de estos.

H₁: La presencia de hierro, galactosa y mineral induce la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en los microorganismos *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, en aproximadamente un 30% más con respecto a la producción de EPS en ausencia de estos.

1.2. Biominería.

La biominería se encarga de la extracción de metales de interés como oro, cobre, uranio, etc. a partir de minerales sulfurados con ayuda de microorganismos acidófilos, volviéndolos más susceptibles a la disolución. Esta técnica permite reducir costos de operación y genera un menor impacto ambiental (Rawlings y Johnson, 2007).

1.3. Biooxidación.

Este método se utiliza como pretratamiento de menas auríferas refractarias previo al proceso de cianuración, en el cual intervienen microorganismos acidófilos que tienen la capacidad de oxidar sulfuros metálicos debido a que obtienen su fuente de energía de compuestos inorgánicos como el hierro y el azufre, esta particularidad de los microorganismos permite la liberación del oro a partir de los sulfuros metálicos como pirita, arsenopirita, entre otros (Ospina et al., 2012).

1.4. Microorganismos que intervienen en el proceso de biooxidación.

Los microorganismos utilizados en la biooxidación tienen características especiales, debido a que tienen la capacidad de oxidar sulfuros metálicos y obtener su fuente de energía a partir de compuestos inorgánicos como hierro y azufre (Ospina et al., 2012), son autótrofos porque asimilan directamente CO₂ del aire y además son acidófilos, gracias a su gran resistencia a ambientes ácidos (Rossi, 1990; Rosales et al., 2001; Mejía, 2010). Los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* son los más relevantes dentro del proceso de biooxidación, ya que se hallan de modo natural en los depósitos de minerales y catalizan la solubilización de los sulfuros metálicos por reacciones de oxidación para utilizar la energía química liberada en su metabolismo (Leuze & Farrow, 2011).

1.4.1. Género *Acidithiobacillus*.

El género *Acidithiobacillus* comprende bacterias capaces de adquirir energía de la catálisis oxidativa de compuestos reducidos de azufre utilizando oxígeno como aceptor final de electrones. Dentro de este género existen algunas especies que son capaces de resistir bajos valores de pH, son mesófilas debido a que actúan a temperaturas intermedias (20-30°C) y autotrófas, pues utilizan el CO₂ como fuente de carbono. Algunas bacterias de este género tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, tienen una acción importante en la solubilización de metales a partir de minerales sulfurados de baja ley (Semenza & Curutchet, 2000).

1.4.1.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Esta bacteria es un Gram-negativa, que se desarrolla de manera óptima a 30°C y pH=2, sin embargo puede crecer a valores de pH menores siendo un pH=1 su límite. Es un bacilo no patógeno que mide entre 0.5 a 0.6 µm de ancho por 1 a 2 µm de largo, con extremos redondeados (Daoud & Karamanev, 2006). Estas bacterias son abundantes en ambientes asociados con minerales como piritita, depósitos de carbón y en drenajes ácidos de zonas mineras. Es un organismo dominante en la biominería principalmente en el proceso de biolixiviación de minerales (Valdés et al., 2008).

1.4.1.2. *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Son bacterias Gram-negativas que tienen forma de barras con extremos redondeados, miden de 0.30 a 0.60 µm de ancho por 0.90 a 3.00 µm de longitud. Se adapta a pH menores a 2, siendo su valor óptimo de trabajo pH=1.8, además trabaja a temperaturas de entre 20-30°C. Son bacterias quimiolitótrofas, obtienen su energía a través de compuestos inorgánicos de azufre elemental, sulfuro de hidrógeno, tiosulfato y otros compuestos reducidos de azufre (López, 2007; Mejía, 2010).

1.4.2. Género *Leptospirillum*.

El género *Leptospirillum* se encuentra formado por bacterias Gram negativas con una morfología típica de vibrio a espirilo, aunque puede variar hacia coco o pseudococos. Son bacterias con carácter pleomórfico, esto indica que su morfología varía conforme a las condiciones ambientales. Se trata de un microorganismo acidófilo, que crece en rangos de pH óptimos comprendidos entre 1.3 y 4.0 y un límite inferior de 1.1. Son mesófilos, ya que su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20-30°C. Las bacterias de este género crecen mediante la oxidación de hierro, el cual puede proporcionarse como sulfato ferroso y sulfuros metálicos como la piritita (Hippe, 2000).

1.4.2.1. *Leptospirillum ferrooxidans*.

Son bacterias Gram-negativas de forma espiral, con un ancho de 0.3 a 0.5 µm y de 0.9 a 3 µm de largo, se desarrolla de manera óptima a 30°C y a pHs entre 1.0 a 1.8 (Rossi, 1990; Rosales et al., 2001). Son aerobios y quimiolitótrofos, solo pueden utilizar el Fe²⁺ como donador de protones, no se inhibe en presencia de Fe³⁺, por esta razón se utiliza en procesos de biooxidación de minerales sulfurados (Rosales et al., 2001).

1.5. Mecanismos de biooxidación.

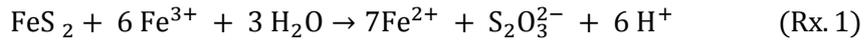
Los microorganismos que intervienen en el proceso de biooxidación actúan a través de dos rutas bioquímicas establecidas por la disolución ácida de los sulfuros: mecanismo vía polisulfuro-azufre y por vía tiosulfato, las cuales se denominan a su vez mecanismo de no-contacto y mecanismo de contacto respectivamente (Donati, 2006). Los mecanismos mencionados anteriormente operan de acuerdo a la especie mineral que va a ser oxidada (Cárdenas *et al.*, 2004). A continuación se detalla cada uno de los mecanismos establecidos.

1.5.1. Mecanismo vía tiosulfato o de contacto.

Los sulfuros metálicos como la pirita, arsenopirita, entre otros pueden solamente ser atacados por un agente oxidante como el hierro III como se muestra en la Figura 1.1 (Sand *et al.*, 2001). A bajo pH la velocidad de oxidación química de la pirita está controlada por los iones férricos, mientras que a un pH neutro, los iones férricos (Fe^{3+}) son aceptores finales de electrones. Este mecanismo se denomina vía tiosulfato debido a que este ión es la especie química intermedia más importante, el hierro hexahidratado acumulado generalmente en las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) destruyen los enlaces entre el hierro y el disulfuro de la red cristalina de la pirita, transformándose este último en ion tiosulfato (Ballester, 2005). En la disolución de la pirita se detectan iones Fe (II) y tiosulfato, los cuales son oxidados por las bacterias al estado trivalente del hierro, mientras que el ión tiosulfato es oxidado a sulfato. Además, se presentan azufre elemental y pentationato como subproductos en pequeñas cantidades (Ballester, 2005).

Este mecanismo tiene dos funciones principales:

La primera en la cual la adherencia de las bacterias a la superficie del sulfuro se da a través de una capa de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), en donde existen iones férricos (Fe^{3+}). La carga positiva de estas sustancias permite que la adherencia del sulfuro metálico se cargue negativamente (Cárdenas *et al.*, 2004). La segunda en la que los sulfuros metálicos como la pirita (FeS_2), son oxidados por este mecanismo, aquí el enlace químico entre el azufre y el metal se rompe luego de seis pasos sucesivos de oxidación electrónica, siendo el primer intermediario el tiosulfato, que posteriormente es oxidado vía tetracionato y otros politionatos, hasta llegar a sulfato (Cárdenas *et al.*, 2004; Donati, 2006; Rossi, 1990). Esto se describe en la Rx 1:



Cuando las bacterias se adhieren a la superficie mineral, el ion férrico contenido en el exopolímero ataca al sulfuro metálico de forma indirecta (Rx. 1), produciendo Fe^{2+} y tiosulfato. Este último reacciona generando tetratiónatos, ácido disulfano-monosulfónico y tritiónato, hasta llegar a sulfato, de acuerdo reacción global (Rx.2) (Cárdenas *et al.*, 2004; Mejía, 2010). Finalmente, el ion ferroso es oxidado a ion férrico por las bacterias y reciclado dentro del exopolímero (Schippers & Sand, 1999).

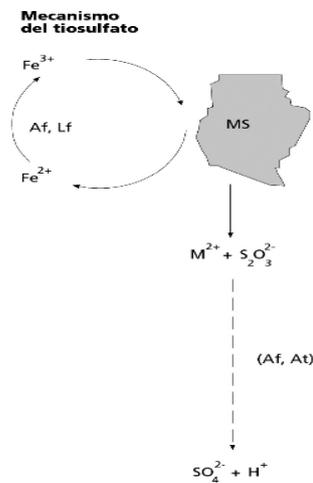
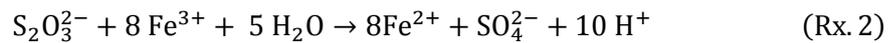


Figura 1.1 Mecanismos de tiosulfato en la biolixiviación de metales sulfurado)

Fuente: Sand, 2001.

Elaborado por: Sand, 2001.

1.5.2. Mecanismo vía polisulfuro-azufre o de no contacto.

En este mecanismo los minerales sulfurados pueden ser lixiviados mediante un ataque oxidativo de Fe^{3+} o mediante ataque ácido, por protones H^+ . Esto implica que la biolixiviación se lleva a cabo tanto por bacterias hierro-oxidantes como azufre-oxidantes, por esta razón las bacterias más importantes dentro de este mecanismo son las *A. ferrooxidans*, ya que poseen ambas capacidades oxidativas. Como subproducto de este mecanismo se obtiene un compuesto insoluble de azufre, el cual a medida que avanza la lixiviación se almacena creando una capa impermeable sobre la superficie del mineral, esto impide la acción de los agentes lixiviantes. Los microorganismos utilizan este compuesto para mantener la acidez del medio, mediante la oxidación de azufre, que genera protones. Los minerales de cobre son los más utilizados en este mecanismo (Quintana, Ly, Bauer, & Espinoza, 1995).

1.6. Sustancias poliméricas extracelulares.

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) o también denominados exopolisacáridos son uno de los principales componentes de las biopelículas. Se encuentran compuestas de proteínas, azúcares, lípidos, carbohidratos, ADN y fragmentos celulares cuya composición y concentración puede variar dependiendo de los microorganismos y las condiciones medioambientales (Wingender *et al.*, 1999). Dichas sustancias cumplen dos funciones importantes en el proceso de biooxidación, la primera enlazando a los microorganismos a la superficie mineral mediante fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas y la segunda facilitando la acción oxidante del hierro (III) sobre el sulfuro metálico (Sand *et al.*, 2005).

Estas sustancias juegan un rol preponderante en la unión de las células al mineral en el proceso de biooxidación. En el caso de bacterias como *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*, estos exopolímeros contienen otros constituyentes como ácido glucurónico e ion férrico (Fe^{3+}), los cuales degradan la estructura mineral. Las características físico-químicas del medio ambiente ayudan a la formación de EPS durante la biooxidación (Genrke *et al.*, 1995). Además, los microorganismos cambian la composición del EPS de acuerdo al sustrato que metabolizan (Sand W y Gehrke T, 2006).

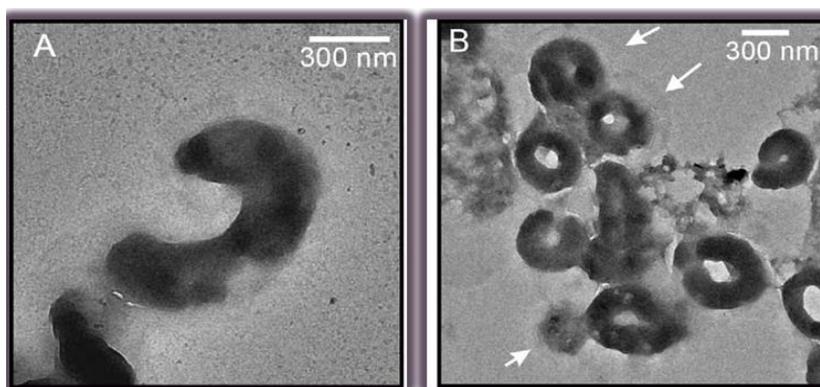


Figura 1.2 *Leptospirillum ferrooxidans*: (A) Sin EPS y (B) Con EPS.

Fuente: Rojas-Chapana; Tributsch, 2004

Elaborado por: Rojas-Chapana; Tributsch, 2004

1.6.1. Inductores en la producción de EPS.

Los EPS se encuentran mayormente asociados como una respuesta generada por los microorganismos al estrés frente a condiciones desfavorables. Sin embargo, existen algunas estrategias que se han propuesto para producir mayores cantidades de EPS, en células plantónicas, tales como: adición de galactosa y hierro a los cultivos microbianos.

1.6.1.1. Adición de galactosa a los cultivos microbianos.

En cultivos de *A. ferrooxidans*, se presenta una vía de catabolismo de galactosa (Figura 1.3.), la misma que se enfoca principalmente en la producción de EPS. Sin embargo, existen antecedentes que indican que azúcares como la galactosa generan toxicidad en este tipo de células microbianas, esto provoca la inhibición de los microorganismos y una mayor producción de EPS como mecanismo de defensa en respuesta al uso de este azúcar (Barreto *et al.*, 2005).

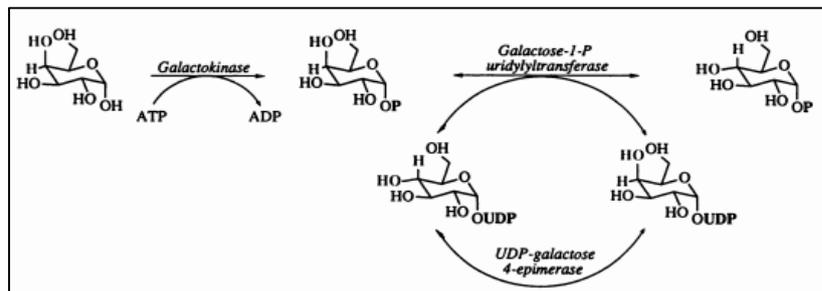


Figura 1.3. Ruta de Leloir del metabolismo de galactosa

Fuente: Perry, 1996.

Elaborado por: Perry, 1996.

En un estudio presentado por (Barreto *et al.*, 2005) se indica que el uso de galactosa en una concentración de 0.25 % incrementa la producción de EPS por parte de los microorganismos. Esto sugiere que la adición de galactosa en otros cultivos como *A. thiooxidans* incrementaría la producción de EPS.

1.6.1.2. Desarrollo de cultivos microbianos en presencia de hierro.

Mediante un estudio se determinó que células de *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* cultivadas en pirita, poseen mayor concentración de hierro y producen mayores niveles de EPS que las células cultivadas en sulfato ferroso y azufre elemental, esto nos indica que la concentración de hierro en los cultivos microbianos está ligada a una mayor producción de EPS (Gehrke *et al.*, 1998 y Sand *et al.*, 2001).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Análisis de la muestra mineral.

El mineral utilizado fue obtenido del distrito minero Bella Rica, se trata de un material polimetálico el cual se encuentra constituido especialmente por pirita y calcopirita con un porcentaje de 17 y 2% para cada uno de estos.(Coop. Minera Bella Rica, 2012).

2.1.1. Procesamiento del mineral.

Las muestras se procesaron por gravimetría obteniendo un concentrado de sulfuros minerales, que posteriormente fue molido por aproximadamente 40 minutos en molino de bolas hasta obtener un pasante D80 de 200 mallas o 75 μm . Se realizaron análisis de Difracción de Rayos X y absorción atómica para determinar la composición mineralógica y química de esta muestra, la misma que está principalmente compuesta por cuarzo, pirita y calcopirita.

2.2. Activación y propagación de los microorganismos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T.

Los microorganismos acidófilos utilizados fueron *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T, los cuales se cultivaron en un medio definido, tomando como base el medio propuesto por Kim et al (2002), con sulfato ferroso y azufre elemental como fuente de energía respectivamente de acuerdo a las Tablas 2.1 y 2.2.

Tabla 2.1. Composición del medio de cultivo para el cultivo de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T

Compuesto	Concentración (g/L)
KCl	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
(NH ₄)H ₂ PO ₄	2,6
FeSO ₄ .7H ₂ O	44
pH (ajustado a 1,8 con H ₂ SO ₄ 10N)	

Fuente: Aguirre et al., (2017)

Elaborado por: El autor

Tabla 2.2. Composición del medio de cultivo para el cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T

Compuesto	Concentración (g/L)
KCl	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,6
Azufre elemental	10
pH (ajustado a 1,8 con H ₂ SO ₄ 10N)	

Fuente: Aguirre et al., (2017)

Elaborado por: El autor

La activación de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo, el cual se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121°C, esterilizando por separado el sulfato ferroso y el azufre elemental que sirven como fuente de energía de *L. ferrooxidans* DSM 2705^T y *A. thiooxidans* DSM 14887^T respectivamente. El azufre se esterilizó a 105°C por 24 horas, mientras que la solución de sulfato ferroso se esterilizó a través de un filtro miliporo de 0.45 µm. Para la activación de los microorganismos se procedió a realizar subcultivos con el medio descrito anteriormente. Los cultivos de *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* se consideraron adaptados cuando el ion ferroso y el azufre elemental fueron oxidados por completo para cada caso y los conteos celulares eran similares al control.

2.3. Cinéticas de crecimiento en cultivos de *A. thiooxidans* DSM 14887^T y *L. ferrooxidans* DSM 2705^T.

Se determinaron cinéticas de crecimiento en las cuales se midió hierros en el caso de *L. ferrooxidans* y sulfatos en *A. thiooxidans*, además se registró pH y conteo celular. Las condiciones de cultivo establecidas fueron de 30°C y 180 rpm en un agitador orbital marca Thermo scientific con pH inicial de 1.8 y 1.3 para los cultivos de *A. thiooxidans* DSM 14887^T y *L. ferrooxidans* DSM 2705^T respectivamente.

2.4. Producción de EPS en *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T utilizando galactosa como inductor.

Los microorganismos activos, se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL a diferentes concentraciones de galactosa (0,15; 0,25 y 0,35 %), las cuales se utilizaron como inductores para la producción de EPS. La extracción de EPS se realizó en un tiempo de 24 horas para

todos los cultivos. La agitación se llevó a cabo mediante un agitador orbital marca Thermo Scientific a 180 rpm y 30°C de temperatura. Los valores obtenidos de EPS se compararon con cultivos microbianos desarrollados en ausencia del inductor y con los cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* adaptados previamente a ión férrico.

2.5. Producción de EPS en *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T utilizando ion férrico como inductor.

Para llevar a cabo la obtención de EPS utilizando ion férrico como inductor en *L. ferrooxidans* DSM 2705^T, se adaptó los cultivos a una concentración de 9 g/L de hierro, para luego escalar a las concentraciones de 18, 27 y 36 g/L, considerando un volumen de inculo de 10%. La extracción de EPS se realizó en un periodo de tiempo de 21 horas para cultivos adaptados a concentraciones de 9 y 18 g/L de hierro y 36 horas para los cultivos de 27 y 36 g/L. Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El pH inicial fue de 1.3. La agitación se llevó a cabo mediante un agitador orbital Thermo Scientific a 180 rpm y 30°C de temperatura. Los valores obtenidos de EPS fueron comparados con valores producidos en cultivos microbianos de *A. thiooxidans* adaptados a galactosa y con el control (9 g/L).

2.6. Producción de EPS en *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T utilizando un mineral como inductor.

Para llevar a cabo la producción de EPS utilizando mineral, se procedió a utilizar un 2% p/v de mineral esterilizado procedente de la zona minera de Bella Rica. El mineral fue previamente molido hasta un tamaño de 75 µm y acidificado con H₂SO₄ hasta obtener un pH 1.8, el control y regulación de pH se realizó durante 15 días hasta que el valor del mismo permanezca constante. Una vez acidificado el mineral se tomó cultivos microbianos de *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* sin previa adaptación a inductores para realizar la extracción de EPS. La extracción de EPS se realizó en un tiempo de 24 horas para el cultivo de *A. thiooxidans* y 21 horas para el cultivo de *L. ferrooxidans*. Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL. La agitación se llevó a cabo mediante un agitador orbital marca Thermo Scientific a 180 rpm y 30°C de temperatura. Finalmente los valores obtenidos de EPS fueron comparados con cultivos microbianos adaptados a otro inductor como hierro y galactosa.

2.7. Diseño experimental.

Los diseños experimentales realizados se muestran en las tablas: 2.3, 2.4 y 2.5 y se detallan a continuación:

Tabla 2.3. Producción de EPS utilizando galactosa como inductor

Variables independientes		Variables Dependientes	Parámetros de trabajo	No. Experimentos
Concentración de galactosa (%)	Tipo de cultivo puro			
0,15	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Cantidad de EPS (mg/L)	pH inicial : 1.8 Temperatura: 30 °C Agitación:180 rpm	8
0,25				
0,35				
Control sin galactosa				

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

Tabla 2.4. Producción de EPS utilizando ion férrico como inductor

Variables independientes		Variables Dependientes	Parámetros de trabajo	No. Experimentos
Concentración de hierro(g/L)	Tipo de cultivo puro			
9	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Cantidad de EPS (mg/L)	pH inicial : 1.3 Temperatura: 30 °C Agitación:180 rpm	8
18				
27				
36				

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

Tabla 2.5. Producción de EPS utilizando un mineral aurífero refractario como fuente de energía.

Variables independientes		Variables Dependientes	Parámetros de trabajo	No. Experimentos
Concentración del mineral %	Tipo de cultivo puro			
2	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> , <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Cantidad de EPS (mg/L)	pH inicial : 1.8 Temperatura: 30 °C Agitación:180 rpm	4

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

2.8. Análisis estadístico para la producción de EPS en cultivos de de *A. thiooxidans* DSM 14887^T y *L. ferrooxidans* DSM 2705^T.

A partir de los resultados obtenidos se realizó un análisis ANOVA con un intervalo de confianza de 95% en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21, con el fin de comprobar si la presencia de inductores (galactosa, ion férrico y mineral) incrementa la producción de EPS de manera significativa.

2.9. Determinaciones analíticas.

2.9.1. Determinación del número de bacterias.

La determinación del número de bacterias por mililitro se realizó a través del conteo celular en una cámara de Neubauer con profundidad de 0.02 mm En esta se colocó una cantidad aproximada a 10 uL de muestra entre la cámara y el cubre-objetos, de esta manera se observó en el microscopio con el lente de 100 X. Se tomó como referencia los cuadrantes ubicados en las esquinas junto con el cuadrante central al momento de realizar el conteo como se muestra en el Anexo 1. Para conocer el número de bacterias por mL es necesario aplicar la siguiente ecuación:

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

Donde:

Área = 0.04 mm²

Profundidad = 0.02 mm

1000 = Factor para obtener el número de bacterias presentes en 1 mL

FD = Factor de dilución.

2.9.2. Medición de pH.

Para la medición de pH se calibró un electrodo marca HANNA (modelo HI 8424) utilizando soluciones estándar de pH de 4.0 y 7.0. Posteriormente se midieron soluciones estándar de pH 1.0 y 3.0.

2.9.3. Determinación de Fe²⁺, Fe³⁺ y hierro total.

El ión ferroso se determinó mediante el método de Muir, basado en la formación de un complejo coloreado entre Fe²⁺ y 1,10-fenantrolina cuantificado mediante un espectrofotómetro marca Thermo Scientific (Modelo Genesys 20) a 510 nm y se comparó con una curva de calibrado como se muestra en el Anexo 2. El hierro total se midió por reducción del Fe³⁺ con clorhidrato de hidroxilamina y midiendo el Fe²⁺ resultante de la forma ya descrita. El ión férrico se determinó por diferencia entre ión ferroso y hierro total (Herrera *et al.*, 1989).

2.9.4. Determinación de Sulfatos.

El ión sulfato en solución se determinó por un método turbidimétrico, en el cual este ión es precipitado en un medio ácido con cloruro de bario formando cristales uniformes de sulfato de bario como se indica en el Anexo 3. La absorbancia de esta suspensión es una medida de la concentración de iones sulfato, se midió en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific (Modelo Genesys 20) a 520 nm y se comparó con una curva de calibrado (González, 1999).

2.9.5. Extracción de EPS a partir de los cultivos de *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*.

Los EPS fueron extraídos de la siguiente manera: treinta mL de sobrenadante de los cultivos microbianos tomados al tiempo máximo de crecimiento: 21 y 36 horas para los cultivos de *L. ferrooxidans* y 24 horas para los cultivos de *A. thiooxidans*, estos se centrifugaron a 5800g durante 10 minutos, posteriormente los sedimentos celulares se resuspendieron en 20 ml de buffer PBS. Aproximadamente se utilizaron dos volúmenes de resina de intercambio catiónico Dowex (CER) con respecto al volumen de peso seco de las células. La resina Dowex se agitó previamente durante 1 h a temperatura ambiente con buffer PBS, posteriormente esto se añadió a la suspensión celular y se agitó durante 4 horas a 100 rpm y 4 ° C. Los extractos que contienen los EPS se recuperaron, y la mezcla de cultivos / CER se lavó una vez con 20 ml de PBS para aumentar la recuperación de EPS. Finalmente el sobrenadante se centrifugó a 4500 g durante 5 min, y se filtró a través de una membrana de 0,2 µm. La cantidad de EPS obtenida se evaluó mediante la determinación de carbohidratos y proteínas (Bellenberg *et al.*, 2014).

2.9.6. Determinación de carbohidratos.

El contenido total de carbohidratos se determinó mediante el método fenol-ácido sulfúrico, el cual consistió en preparar en tubos de ensayo las soluciones de la curva patrón, la cual se muestra en el Anexo 4; las muestras problema diluidas y agua destilada como blanco, a esto se le adicionó 0.5ml del reactivo fenol al 5%, rápidamente se adicionó 2.5ml de ácido sulfúrico tratando de que este no se deslice por las paredes del tubo, seguidamente los tubos se agitaron uno por uno en vortex después de cada adición para capturar los restos de ácido que se encuentren en las paredes del tubo, se dejó incubar durante 10 minutos fuera de la luz directa del sol, luego se colocó en baño de agua a 30°C por 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific (Modelo Genesys 20) a 492nm (Dubois et al., 1956).

2.9.7. Determinación de proteína.

El contenido de proteínas fue determinado usando el método de Bradford (1976). Se utilizó albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar (Sigma- Aldrich). El procedimiento consistió en agregar 100 µL de la muestra en análisis a 5,0 mL de reactivo de Bradford, manteniendo la mezcla estática durante 10 min en obscuridad como se muestra en el Anexo 5; posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific (Modelo Genesys 20) a 595 nm en un espectrofotómetro de UV-visible.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Cinéticas de crecimiento microbiano para *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T y *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T.

A continuación se muestran las cinéticas de crecimiento de los microorganismos *A. thiooxidans* adaptadas a galactosa y *L. ferrooxidans* adaptadas a distintas concentraciones de hierro.

3.1.1. Cinética de crecimiento en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T adaptadas a galactosa.

A las muestras previamente adaptadas a concentraciones de 0.15, 0.25 y 0.35% de galactosa y un control sin galactosa se les realizó cinéticas de crecimiento, en donde se determinó la concentración de sulfatos, concentración de células y pH. En la figura 3.1 (A, B, C y D) se observa el número de bacterias por mililitro en función del tiempo, para los cultivos adaptados a concentraciones de galactosa de: 0, 0.15, 0.25 y 0.35%. Se evidencia que en un tiempo de 24 horas el crecimiento celular es exponencial, a partir de este tiempo se presenta un crecimiento constante lo que indica una etapa estacionaria.

El mayor crecimiento microbiano se presentó en el control sin galactosa con un valor de 1.28×10^8 bacterias/mL, sin embargo los cultivos adaptados a galactosa presentan un número similar de microorganismos en el mismo periodo de crecimiento, como se puede verificar en la figura 3.1; se debe indicar que el mayor crecimiento celular se dio en un tiempo de 24 horas para todos los cultivos partiendo de un inóculo de 5×10^6 bacterias/mL. Este valor se puede comparar a los presentados por Yasuhiro et. al., (1995) el cual alcanzó un valor de 1.59×10^8 bacterias/mL en un periodo de 4 días, partiendo de un inóculo de 3.58×10^5 bacterias/mL, esto en comparación a los valores antes mencionados es significativamente menor, ya que se obtuvo una mayor concentración de células/mL en un menor periodo de tiempo. Por otro lado los valores obtenidos a concentraciones de 0.15, 0.25 y 0.35% de galactosa pueden compararse con el control sin galactosa, ya que estos son similares, esto teniendo en cuenta que dicha sustancia actúa como un inhibidor del crecimiento celular.

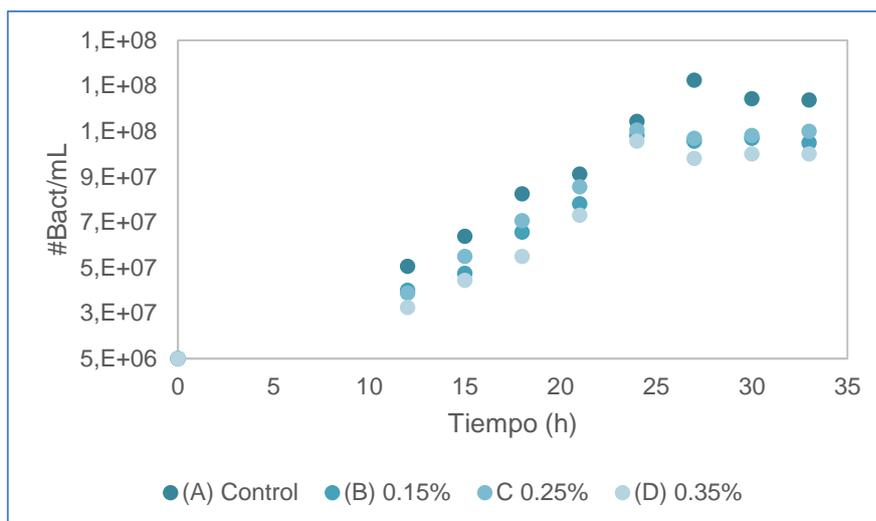


Figura 3.1. Cinética de crecimiento microbiano de *A. thiooxidans* DSM 14887^T a diferentes concentraciones de galactosa 0 (A), 0.15 (B), 0.25 (C) y 0.35% (D) a pH 1.8 y 30°C.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la Tabla 3.1 se presenta la velocidad de crecimiento microbiano μ (h^{-1}) para cultivos de *A. thiooxidans* adaptados a concentraciones de galactosa de: 0, 0.15, 0.25 y 0.35%, la velocidad de crecimiento obtenida para el control fue de 0.090 h^{-1} , este valor es mayor al descrito por Karavaiko et. al., (2006), en donde el valor de μ fue de 0.046 h^{-1} en un cultivo batch a condiciones de pH 1.7, se debe considerar que las condiciones de cultivo presentadas en este estudio fueron diferentes. Para los cultivos adaptados a concentraciones de galactosa de 0.15, 0.25 y 0.35%, las velocidades de crecimiento obtenidas fueron de 0.081 , 0.079 y 0.085 h^{-1} respectivamente. Estos valores comparados con el control son bastante similares, lo cual es un indicativo de la adaptación del microorganismo al inductor.

Tabla 3.1. Velocidad máxima de crecimiento para cultivos de *A. thiooxidans* adaptadas a galactosa

Concentración de inductor (%)	μ (h^{-1})
Control	0,090
0.15	0,081
0.25	0,079
0.35	0,085

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la Figura 3.2 (A, B, C y D) se puede observar el porcentaje de oxidación del ion sulfato en función del tiempo para cultivos de *A. thiooxidans* adaptados a diferentes concentraciones de galactosa: 0%, 0.15%, 0.25% y 0.35% respectivamente. Se puede observar que alcanza valores cercanos al 100% en las 33 horas de crecimiento microbiano, siendo un indicativo de la adaptación de los microorganismos a la galactosa.

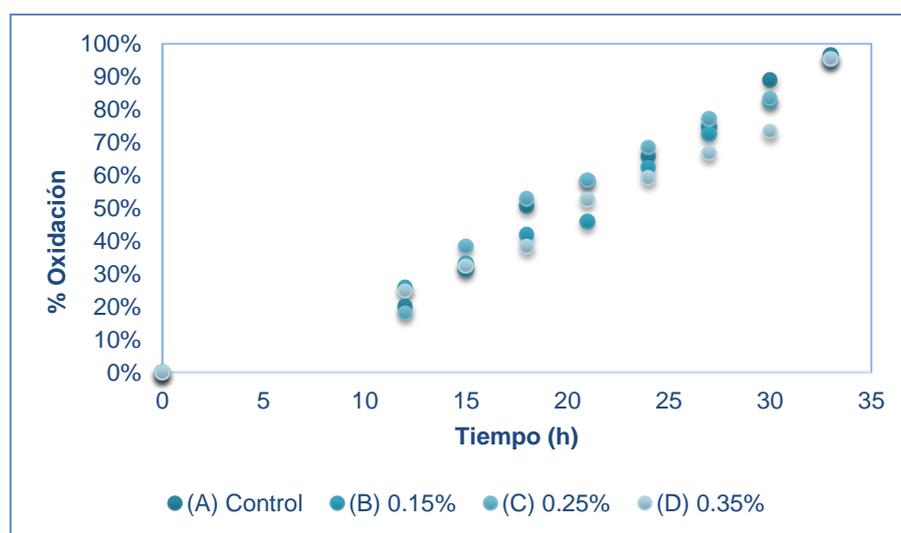


Figura 3.2. Porcentaje de oxidación de sulfatos (%) *A. thiooxidans* DSM 14887^T a concentraciones de galactosa de 0 (A), 0.15 (B), 0.25 (C) y 0.35% (D) a pH 1.8 y 30°C.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la figura 3.3 se presenta el comportamiento del pH a través del tiempo de los cultivos de *A. thiooxidans* adaptados a concentraciones de galactosa de: 0, 0.15, 0.25 y 0.35% respectivamente, el cual disminuye significativamente hasta las 24 horas hasta alcanzar valores cercanos a 1.3. Como se indica en el estudio de Caicedo (2009), esto es causado por la generación de ácido sulfúrico, el cual es producido por la oxidación del azufre elemental, además esta disminución de pH favorece una mejor oxidación del azufre a ion sulfato.



Figura 3.3. Variación de pH en función del tiempo, en cultivos de *A. thiooxidans* a concentraciones de galactosa de 0 (B), 0.15, 0.25 y 0.35% respectivamente.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

3.1.2. Comparación de medias de la velocidad de crecimiento en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887^T.

En la Figura 3.4 se muestra la comparación de medias de la velocidad máxima de crecimiento en función de las concentraciones de galactosa, en la misma se puede observar que el crecimiento celular es mayor en el control, sin embargo la velocidad de crecimiento en cultivos adaptados a las concentraciones de galactosa de: 0.15, 0.25 y 0.35% es similar, lo que indica que la galactosa retrasa el crecimiento celular pero no de manera significativa.

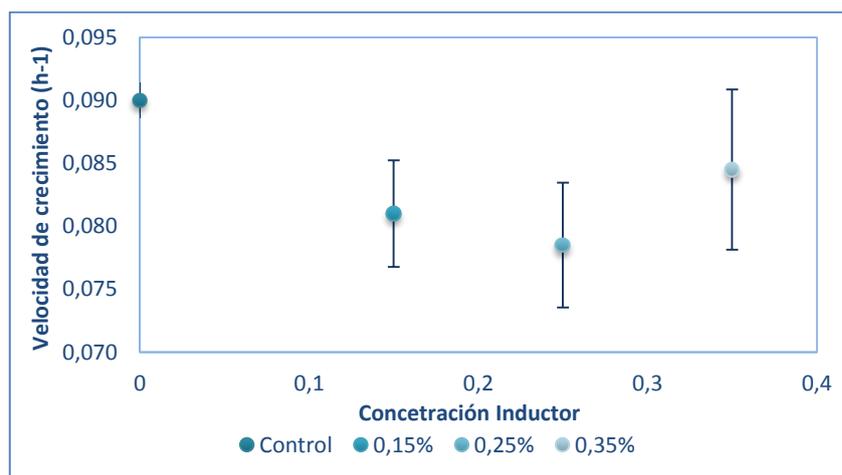


Figura 3.4. Comparación de medias para la velocidad máxima de crecimiento en cultivos de *A. thiooxidans*.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

3.1.3. Cinética de crecimiento en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T adaptadas a ion férrico.

La adaptación de los microorganismos a las diferentes concentraciones de hierro, se dio partiendo de un cultivo con una concentración de 9 g/L, para posteriormente escalar el mismo a concentraciones mayores como 18, 27 y 36 g/L. Para verificar la adaptación de los microorganismos a estas concentraciones de hierro se realizó cinéticas de crecimiento, en donde se determinó la concentración de hierro II, hierro total, número de bacterias y pH, los cuales posteriormente fueron contrastados con el control de 9 g/L.

En la figura 3.5 (A, B, C y D) se observa el número de bacterias/mL en función del tiempo, para los cultivos adaptados a las concentraciones de hierro de: 9, 18, 27 y 36 g/L. Se puede verificar que los cultivos de 27 y 36 g/L de hierro necesitan de un mayor tiempo para consumir el ion ferroso, de ahí que su crecimiento máximo se da a las 48 horas. Por otro lado los cultivos sometidos a concentraciones de hierro de 9 y 18 g/L necesitan de 24 horas para alcanzar su máximo crecimiento.

El mayor crecimiento celular se presentó a una concentración de 9 g/L de hierro con un valor de 1.22×10^8 bacterias/mL, sin embargo se puede evidenciar que para los cultivos adaptados a las concentraciones de 18, 27 y 36 g/L de hierro el crecimiento microbiano es similar, partiendo de un inóculo de 5×10^6 bacterias/mL. Este valor se puede comparar a los obtenidos por el grupo de Sand et. al., (1992) el cual en condiciones de: pH 1.5 y 30°C de temperatura obtuvo un valor aproximado de 8×10^7 bacterias/mL en un tiempo de 10 horas. Esto indica que a mayores periodos de tiempo como los presentados en este estudio el número de células aumenta significativamente. Por otro lado los valores obtenidos a concentraciones de 18, 27 y 36 g/L de hierro pueden compararse con el cultivo de 9 g/L de hierro, ya que estos son similares, lo que indica la adaptación de los microorganismos a elevadas concentraciones de hierro. Se debe tener en cuenta que concentraciones elevadas de hierro actúan como un inhibidor del crecimiento celular.

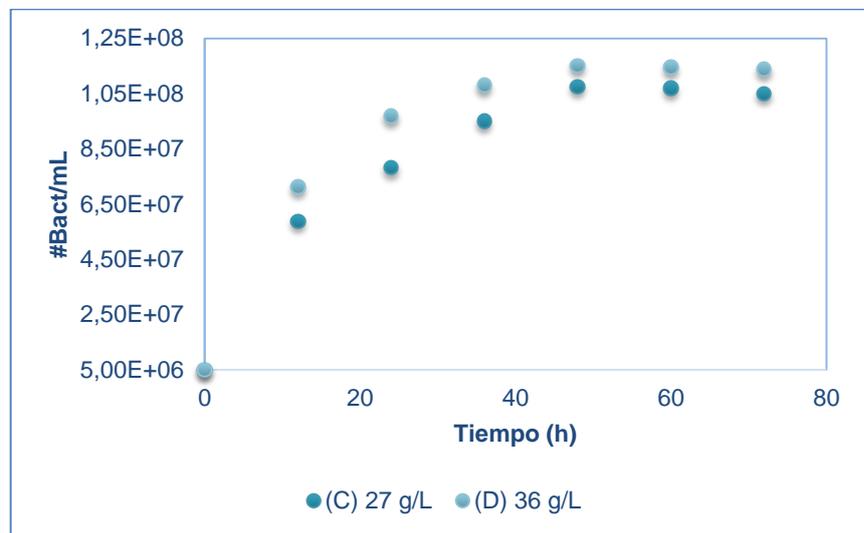
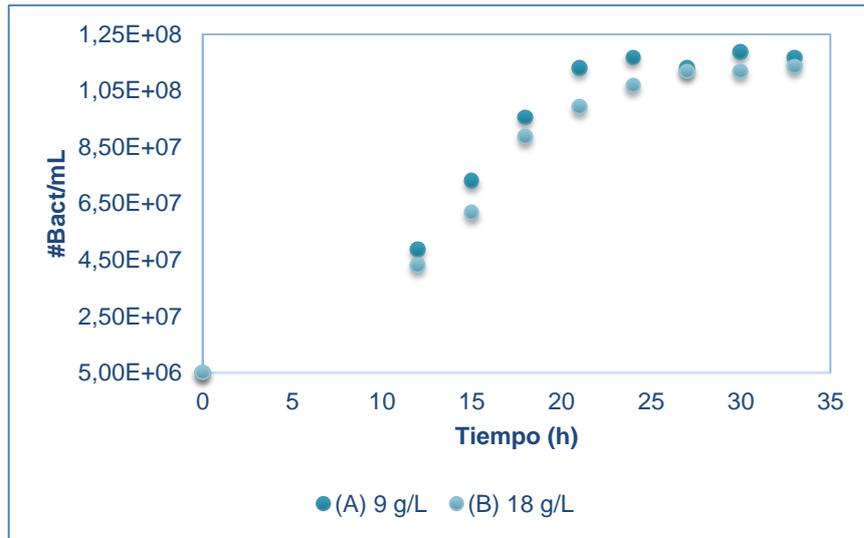


Figura 3.5. Cinética de crecimiento microbiano de *L. ferrooxidans* DSM 2705^T a diferentes concentraciones de hierro 9 (A), 18 (B), 27 (C) y 36 g/L (D) a pH 1.3 y 30°C.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la Tabla 3.2 se presenta la velocidad de crecimiento microbiano μ (h^{-1}) en cultivos de *L. ferrooxidans* adaptados a las concentraciones de hierro de: 9, 18, 27 y 36 g/L, la velocidad de crecimiento obtenida para el cultivo con una menor concentración de hierro fue de 0.072 h^{-1} . Este valor es comparable al obtenido por Breed et. al., (1999), en donde μ fue de 0.046 h^{-1} a condiciones de pH y temperatura de 1.7 y 30°C respectivamente, para cultivos de *L. ferrooxidans*. Por otra parte las velocidades de crecimiento obtenidas en los cultivos adaptados a concentraciones de hierro de: 18, 27 y 36 g/L, fueron de 0.031 , 0.02 y 0.012 h^{-1}

respectivamente, sin embargo se ha demostrado que este microorganismo crece más lentamente que *A. ferrooxidans* (Rawlings et al., 2003).

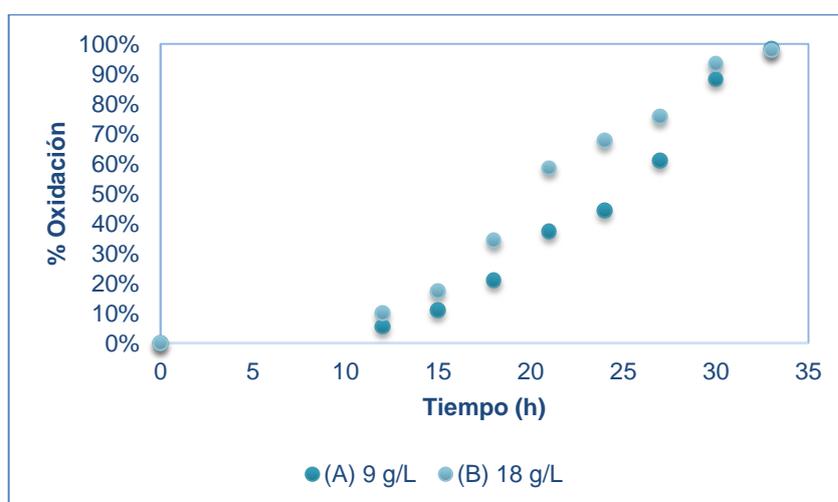
Tabla 3.2. Velocidad máxima de crecimiento para cultivos de *L. ferrooxidans* adaptadas a ion férrico.

Concentración de inductor (g/L)	μ (h ⁻¹)
9	0,072
18	0,031
27	0,020
36	0,012

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la Figura 3.6 (A, B, C y D) se puede observar el porcentaje de oxidación del ion ferroso en función del tiempo para cultivos de *L. ferrooxidans* adaptados a las concentraciones de hierro de: 9, 18, 27 y 36 g/L respectivamente. Se puede evidenciar que la oxidación alcanza valores cercanos al 100% en un tiempo de 33 horas para las concentraciones de 9 y 18 g/L, mientras que para las concentraciones de 27 y 36 g/L el tiempo de oxidación fue de 72 horas. Se puede evidenciar que la oxidación se produce en menor tiempo en los cultivos de 9 y 18 g/L de hierro, esto debido a que los microorganismos se encuentran en presencia de concentraciones bajas, lo que facilita la oxidación del sustrato, a diferencia de los cultivos de 27 y 36 g/L que logran su oxidación en periodos de tiempo más elevados que los antes mencionados.



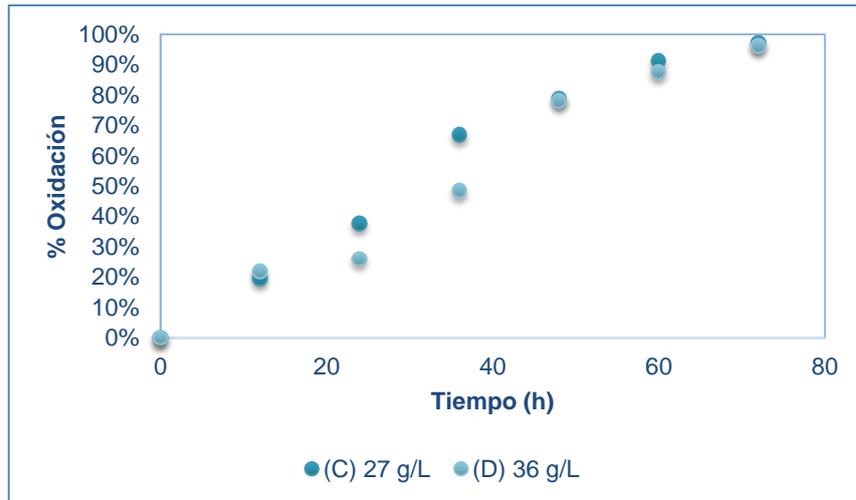
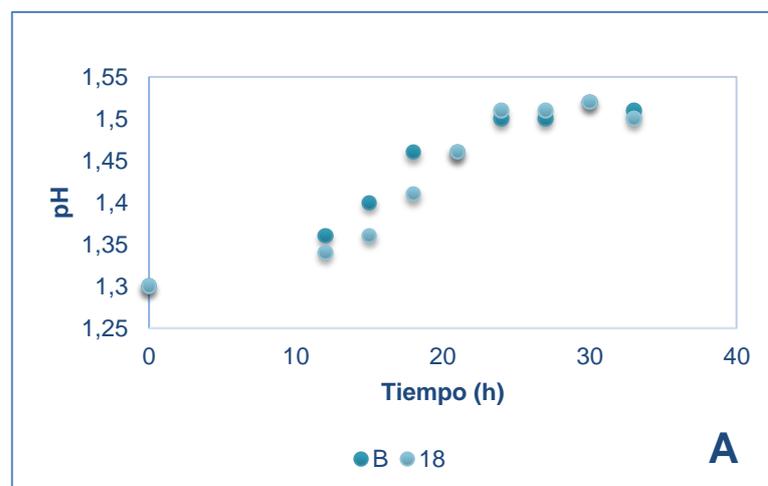


Figura 3.6. Porcentaje de oxidación de hierro II (%) *L. Ferrooxidans* DSM 2705^T a concentraciones de hierro de 9 (A), 18 (B), 27 (C) y 36 g/L (D) a pH 1.8 y 30°C.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la figura 3.7 (A y B) se presenta el comportamiento del pH a través del tiempo de los cultivos de *L. ferrooxidans* adaptados a las concentraciones de hierro de: 9, 18, 27 y 36 g/L respectivamente, el cual incrementa hasta las 24 horas para luego mantenerse en valores constantes. Como indica Muñoz (2002) el incremento del pH se debe a que los microorganismos necesitan protones para realizar la oxidación del ion ferroso, mientras que el pH se mantiene constante después de un periodo de tiempo debido a la producción de ácido sulfúrico por parte de los microorganismos como se indica en el estudio Jensen y Webb (1995).



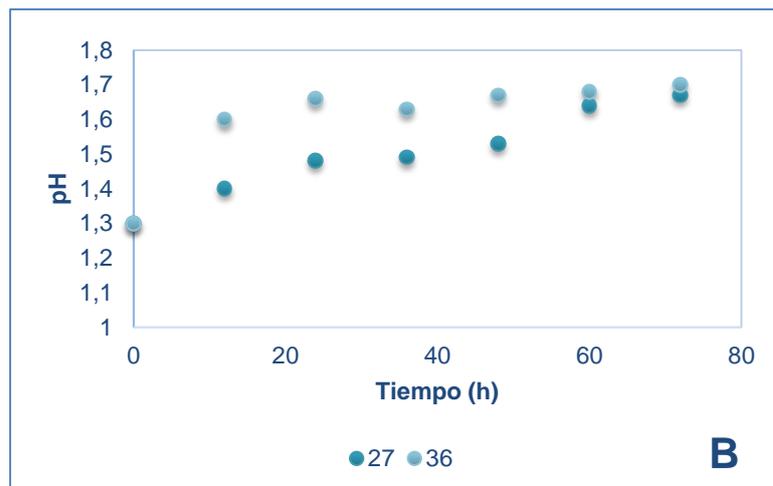


Figura 3.7. Variación de pH en función del tiempo, en cultivos de *L. ferrooxidans* a concentraciones de hierro de 9 (B), 18, 27 y 36 g/L respectivamente.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

3.1.4. Comparación de medias de la velocidad de crecimiento en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T.

En la Figura 3.8 se muestra la comparación de medias de la velocidad máxima de crecimiento en función de las concentraciones de hierro, aquí se puede observar que el crecimiento celular es mayor a una concentración de 9 g/L, sin embargo la velocidad de crecimiento en cultivos adaptados a mayores concentraciones de hierro como: 18, 27 y 36 g/L disminuye considerablemente, lo que indica que el uso de elevadas concentraciones de hierro influyen en gran medida en el crecimiento celular.

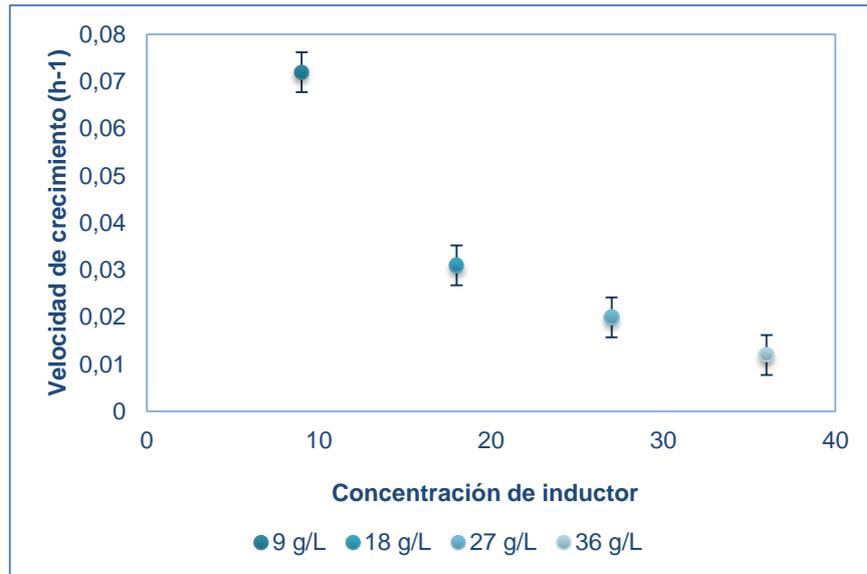


Figura 3.8. Comparación de medias para la velocidad máxima de crecimiento en cultivos de *L. ferrooxidans*.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

3.2. Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

La extracción de sustancias poliméricas extracelulares se realizó mediante el método de adsorción en resina de intercambio iónico DOWEX, en el tiempo máximo de crecimiento celular. Se consideró como tiempos máximos de crecimiento: 24 horas para cultivos de *A. thiooxidans* y para el caso de *L. ferrooxidans* se tomaron dos tiempos: 24 horas para los cultivos adaptados a 9 y 18 g/L de hierro y 48 horas para los cultivos adaptados a 27 y 36 g/L.

3.2.1. Extracción de EPS en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* adaptadas a galactosa y mineral.

La extracción de EPS en estos cultivos se realizó cuando los cultivos llegaron a su crecimiento máximo (24 horas), tanto para el control sin galactosa, y a las diferentes concentraciones de galactosa de 0.15, 0.25 y 0.35% previamente adaptados. Así mismo se usó un mineral refractario como fuente de energía para producción de EPS, con el fin de comparar la producción de dichas sustancias en cada uno.

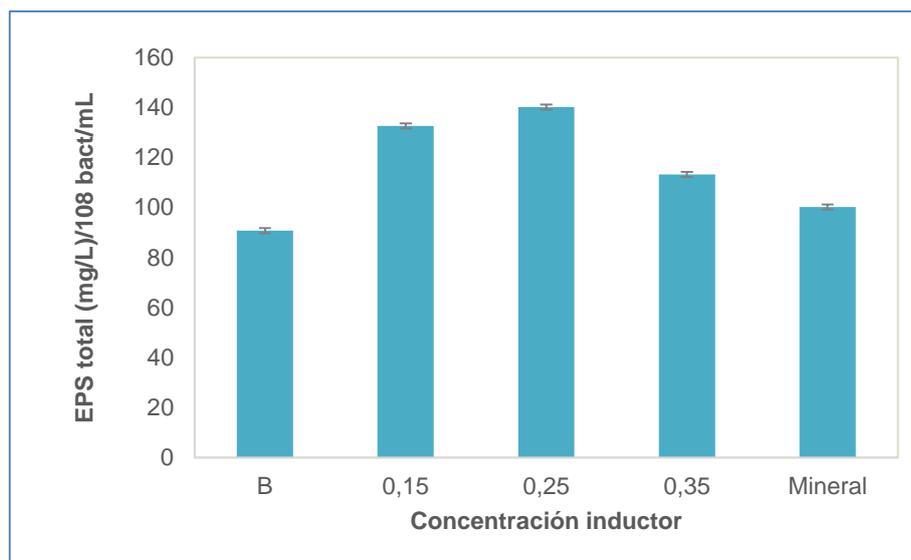


Figura 3.9. EPS total (mg/L) en función de diferentes concentraciones de galactosa en cultivos de *A. thiooxidans* a un pH 1.8 y 30°C de temperatura.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la figura 3.9 se observa la producción de EPS total por número de bacterias contadas al momento de la extracción. Los valores de EPS obtenidos en los cultivos de *A. thiooxidans* a distintas concentraciones de galactosa fueron: 90.83, 132.73, 140.22 y 113.28 mg/L para: 0, 0.15, 0.25 y 0.35 %. Se debe indicar que se obtuvo una concentración de EPS total de 100.26 mg/L utilizando mineral aurífero refractario como fuente de energía. Estos valores se pueden comparar con los descritos por Gehrke et. al., (1998), el cual para un cultivo de *A. ferrooxidans* utilizando azufre como fuente de energía obtuvo una concentración de EPS total de 1.16 mg/L con una cantidad de células/mL de 1×10^{10} , esto respecto a los valores obtenidos en este estudio es relativamente menor, ya que se obtuvo una mayor cantidad de EPS total con una menor cantidad de bacterias/mL.

Además se puede observar que a una concentración de galactosa de 0.25% se generan mayores cantidades de EPS, en comparación con los valores obtenidos a concentraciones de 0.15, 0.35% y del blanco sin galactosa, estos resultados concuerdan con el estudio de Saavedra (2014) en donde al someter cultivos de *A. ferrooxidans* a una concentración de galactosa de 0.25% y 180 ppm de CO₂, se obtuvo un mayor volumen de EPS el mismo fue de 20 μm^3 , esto en relación a los valores obtenidos en cultivos sometidos a concentraciones de galactosa de 0.15, 0.35% y un blanco sin galactosa, en donde para el blanco y una concentración de 0.15% no se evidencia presencia de EPS, mientras que para una

concentración de 0.35% se obtuvo un volumen de $10 \mu\text{m}^3$, relativamente bajo en comparación con el valor antes mencionado.

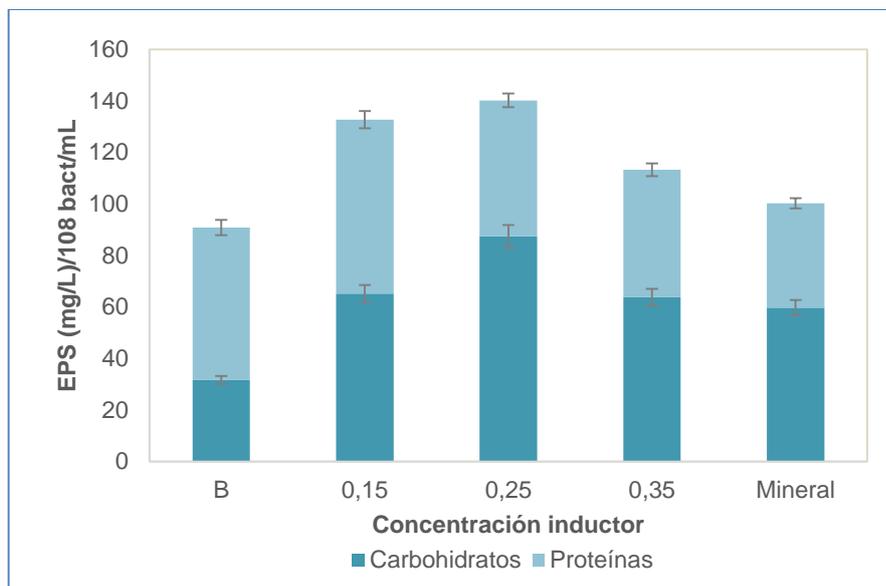


Figura 3.10. Producción de sustancias poliméricas extracelulares EPS (mg/L) en función de la concentración de carbohidratos y proteínas, en cultivos de *A. thiooxidans* a un pH 1.8 y 30°C de temperatura.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la figura 3.10 se observa la producción de EPS en mg/L, en función de los carbohidratos y proteínas obtenidos. Los valores de carbohidratos fueron: 31.66, 65.23, 87.44, 63.84 mg/L a las concentraciones de: 0, 0.15, 0.25, 0.35% de galactosa, mientras que para el cultivo sometido a mineral se obtuvo una concentración de 59.7 mg/L. Por otro lado los valores de proteínas obtenidos fueron de: 59.17, 67.50, 52.78, 49.44 mg/L para las concentraciones de galactosa de: 0, 0.15, 0.25 y 0.35%, mientras que para el mineral la cantidad de EPS fue de 40.56 mg/L.

Los datos obtenidos a partir de la extracción de EPS nos indican que la mayor concentración de carbohidratos en cultivos de *A. thiooxidans* se genera a una concentración de galactosa de 0.25% con un valor de 87.44 mg/L, mientras que la mayor proporción de proteínas se da a una concentración de 0,15% de galactosa con un valor de 67.50 mg/L. Estas concentraciones se pueden comparar por las descritas en el estudio de Vardanyan et. al., (2015), quien en cultivos de *A. ferrooxidans* a condiciones de 30°C de temperatura, 130 rpm de agitación y un periodo de tiempo de 5 días obtuvo valores de 91.7 y 11.3 mg/L para

la concentración de carbohidratos y proteínas respectivamente, esto en relación a los datos obtenidos en el presente estudio es significativamente menor, ya que se obtuvo una cantidad de 87.44 y 67.50 mg/L para carbohidratos y proteínas, en un periodo de tiempo menor el cual fue de 24 horas. Es importante mencionar que el método empleado en la extracción, permite obtener mayor cantidad de EPS con el menor daño celular posible, así mismo este método extrae en su mayoría los carbohidratos de los expolímeros (Tapia, 2010)

3.2.2. Análisis estadístico de la producción de EPS en cultivos de *A. thiooxidans* adaptadas a galactosa.

Se realizó un análisis ANOVA de un factor en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21, con el fin de comprobar si el uso de galactosa como inductor incide en la producción de EPS, y a su vez analizar que concentración del mismo es más eficiente en la generación de dichas sustancias.

Mediante la Tabla 3.3 se indica que el uso de galactosa como inductor si influye en la producción de EPS, ya que el valor de $p < 0.05$ nos indica que existen diferencias significativas entre la producción de dichas sustancias con y sin inductor.

Tabla 3.3. ANOVA de un factor para la producción de EPS en cultivos de *A. thiooxidans* adaptadas a galactosa.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F ₀	P-valor
Tratamiento	2679,769	3	893,256	12,530	0,017
Error	285,155	4	71,289		
Total	2964,925	7			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la Figura 3.11 se muestra la comparación de medias para la producción de EPS en función de las concentraciones de galactosa, en la misma se puede observar que la producción de EPS es mayor a una concentración de 0.25%, sin embargo no existe una diferencia significativa en relación a la producción con 0.15%. Por otro lado se puede destacar que la galactosa influye en gran medida en la producción de EPS, ya que se observa diferencia significativa entre el control y los ensayos en presencia de este inductor.

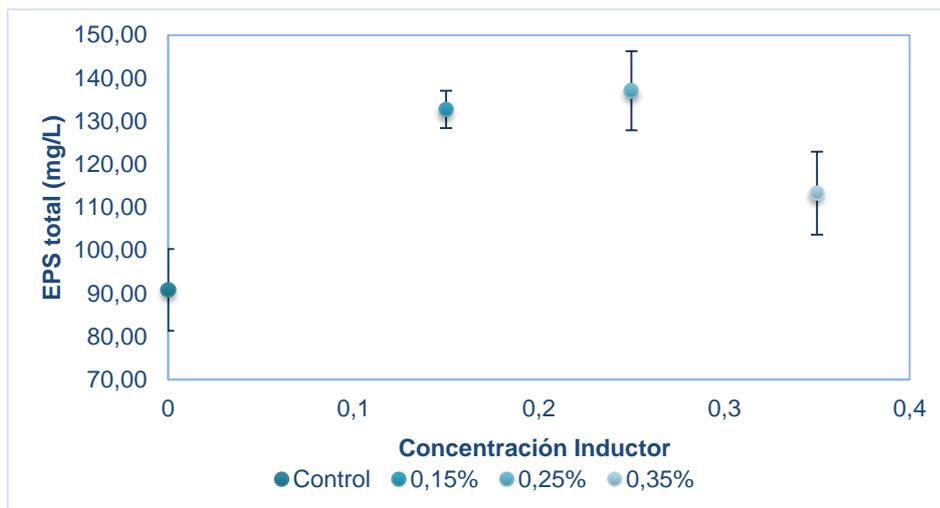


Figura 3.11. Comparación de medias para la producción de EPS en cultivos de *A. thiooxidans* a las concentraciones de: 0, 0.15, 0.25 y 0.35%.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

3.2.3. Extracción de EPS en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705^T adaptadas a ion férrico y mineral.

La extracción de EPS en estos cultivos se realizó en función del crecimiento máximo: 24 horas para los cultivos adaptados a concentraciones de 9 y 18 g/L de hierro y de 48 horas para los cultivos de 27 y 36 g/L. Además se utilizó un mineral aurífero refractario que sirvió como fuente de energía y como inductor en la producción de dichas sustancias.

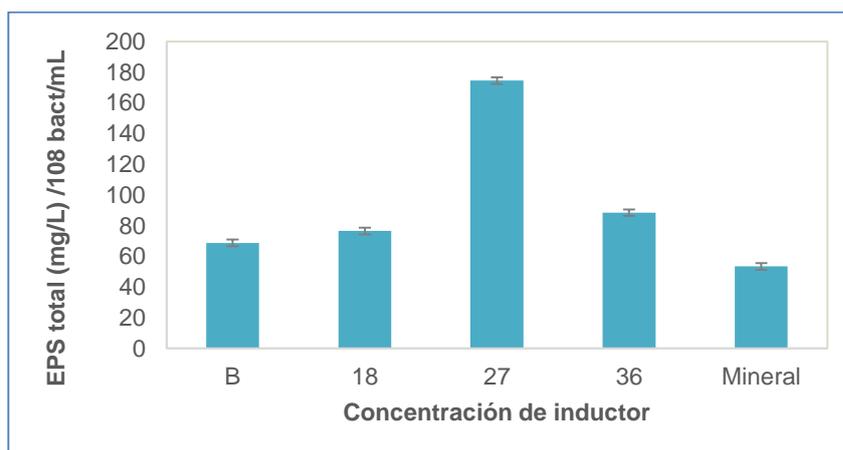


Figura 3.12. EPS total (mg/L) en función del número de células/mL, en cultivos de *L. ferrooxidans* a un pH 1.3 y 30°C de temperatura.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la figura 3.12 se observa la producción de EPS total por número de bacterias contadas al momento de la extracción. La mayor cantidad de EPS obtenida fue de 174.55 mg/L con la concentración de 27 g/L de hierro; mientras que el menor valor de EPS producido se da con el mineral utilizado, el cual generó una cantidad de 53.43 mg/L. Los valores obtenidos son comparables por los presentados en el estudio de Vardanyan et. al., (2015), en donde para un cultivo de *L. ferrooxidans* obtuvo una cantidad de EPS total de 103 mg/L con una cantidad inicial de bacterias/mL de 5×10^8 , simplemente usando mineral como inductor de EPS. De acuerdo a nuestros resultados podemos indicar que el ion férrico es mejor inductor en la producción de EPS.

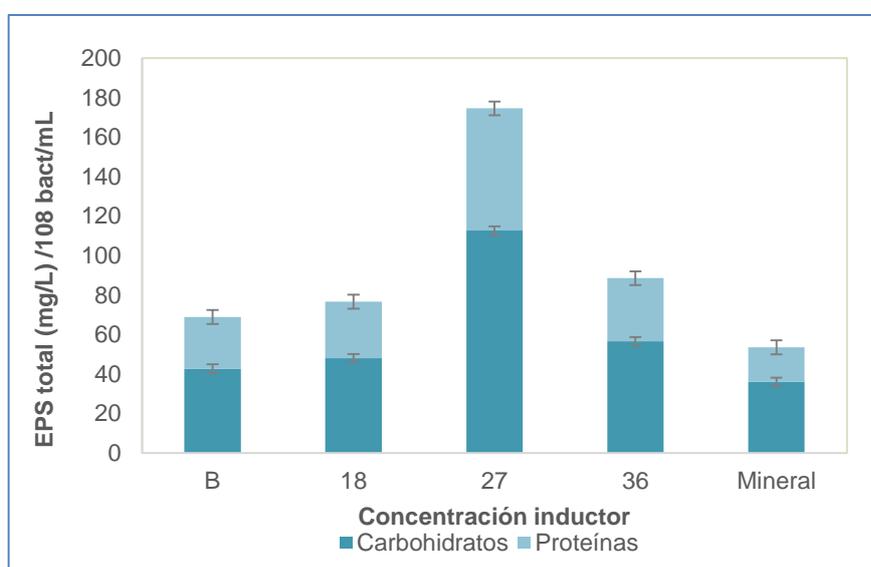


Figura 3.13. Producción de sustancias poliméricas extracelulares EPS (mg/L) en función de la concentración de carbohidratos y proteínas, en cultivos de *L. ferrooxidans* a un pH 1.3 y 30°C de temperatura.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la figura 3.13 se observa la composición del EPS, formado por carbohidratos y proteínas. La concentración de 27 g/L de hierro presenta una mayor producción de carbohidratos y proteínas, sin embargo al comparar la relación carbohidrato/proteína se observa que existe una mayor producción de carbohidratos con respecto a las proteínas. Los valores obtenidos de carbohidratos y proteínas a la concentración de 27 g/L fueron: 112.61 mg/L y 61.94 mg/L respectivamente en un tiempo de 48 horas de crecimiento. Estas concentraciones son mayores a las descritas por Vardanyan et. al., (2015), quien en un tiempo de 5 días en

cultivos de *L. ferrooxidans* obtuvo valores de 100.3 mg/L de carbohidratos y 16.1 mg/L de proteínas.

3.2.4. Análisis estadístico de la producción de EPS en cultivos de *L. ferrooxidans* adaptadas a ion férrico.

Se realizó un análisis ANOVA de un factor en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21, con la finalidad de comprobar si el uso de ion férrico influye en la producción de EPS, y a su cual fue la mejor concentración adecuada para obtener una mayor cantidad de los exopolímeros.

La Tabla 3.4 muestra un valor de significancia de 0.01 menor a ($p < 0.05$), lo cual indica que existe diferencia significativa entre las concentraciones de hierro que fueron probadas (9, 18, 27 y 36 g/L).

Tabla 3.4. ANOVA de un factor para la producción de EPS en cultivos de *L. ferrooxidans* adaptadas a galactosa.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F ₀	P-valor
Tratamiento	12719,574	3	4239,858	604,230	0,01
Error	28,068	4	7,017		
Total	12747,642	7			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la Figura 3.14 se muestra la comparación de medias para la producción de EPS en función de las diferentes concentraciones hierro probadas, aquí se puede observar que la concentración de 27 g/L genera mayor cantidad de EPS que las correspondientes a 9, 18 y 36 g/L esto nos permite decir que el hierro es un buen inductor de sustancias poliméricas extracelulares.

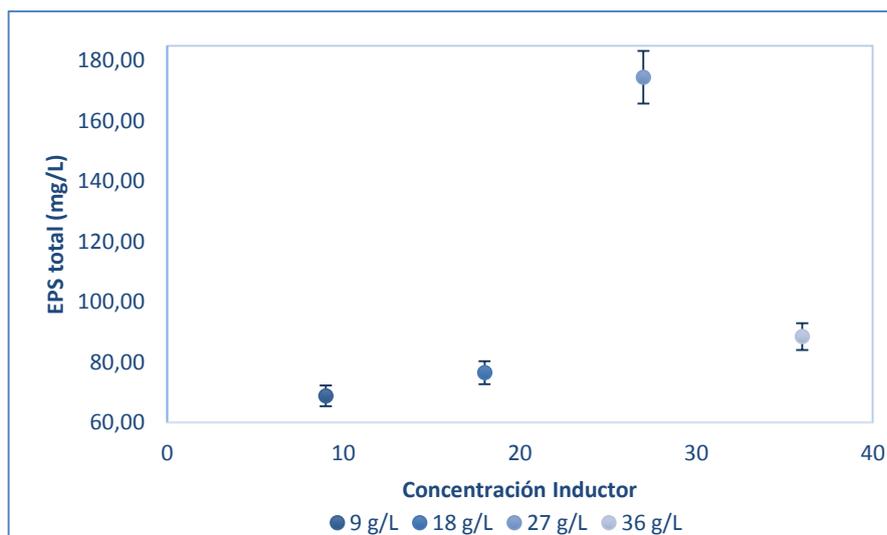


Figura 3.14. Comparación de medias para la producción de EPS en cultivos de *L. ferrooxidans adaptadas a ion férrico* a las concentraciones de: 9, 18, 27 y 36 g/L.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

3.2.5. Extracción de EPS en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* utilizando un mineral refractario como fuente de energía e inductor de EPS.

La extracción de EPS en estos cultivos se realizó en función del máximo crecimiento celular, el cual se presentó a las 24 horas para ambos cultivos. Se consideraron solamente los controles de *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* para determinar la generación de EPS. A continuación se presenta los resultados de producción de EPS y de la composición de los mismos en función de carbohidratos y proteínas.

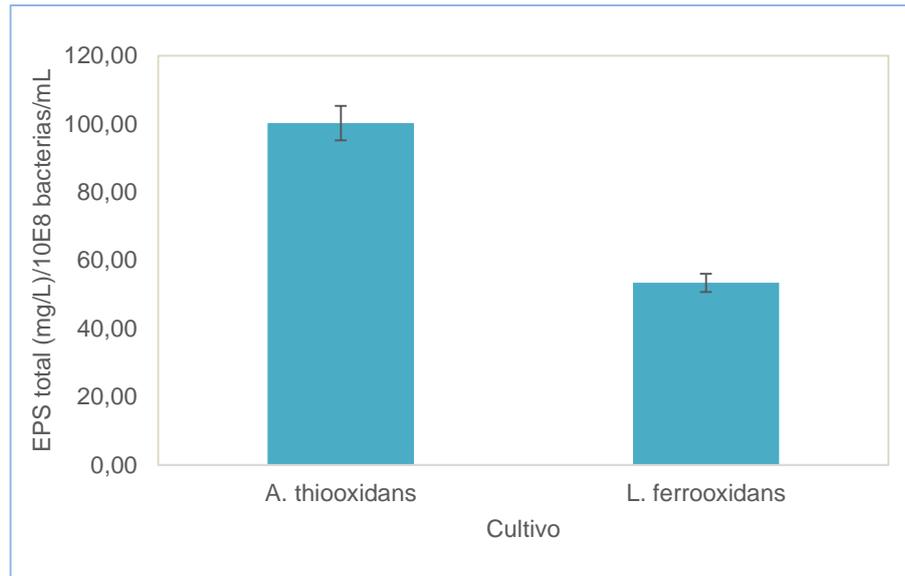


Figura 3.15. EPS total (mg/L) en función del número de células/mL, en cultivos de *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la figura 3.15 se observa la producción de EPS total en mg por número de bacterias contadas al momento de la extracción. Los valores de EPS total obtenidos fueron de: 100.25 mg/L para cultivos de *A. thiooxidans* y 53.43 mg/L para *L. ferrooxidans*. Estos valores son comparables con los descritos por Gehrke et. al., (1998), el cual para un cultivo de *A. ferrooxidans* utilizando pirita como fuente de energía obtuvo una cantidad de EPS total de 2.76 mg/L con un valor de 1×10^{10} bacterias/mL, el cual es menor al obtenido en este estudio, en donde con una concentración menor de bacterias se obtuvo una mayor cantidad de EPS total. Por otro lado podemos observar que existe una mayor producción de EPS con el cultivo de *A. thiooxidans* con una concentración total de 100.25 mg, la cual es significativamente mayor a la producida en el cultivo de *L. ferrooxidans*.

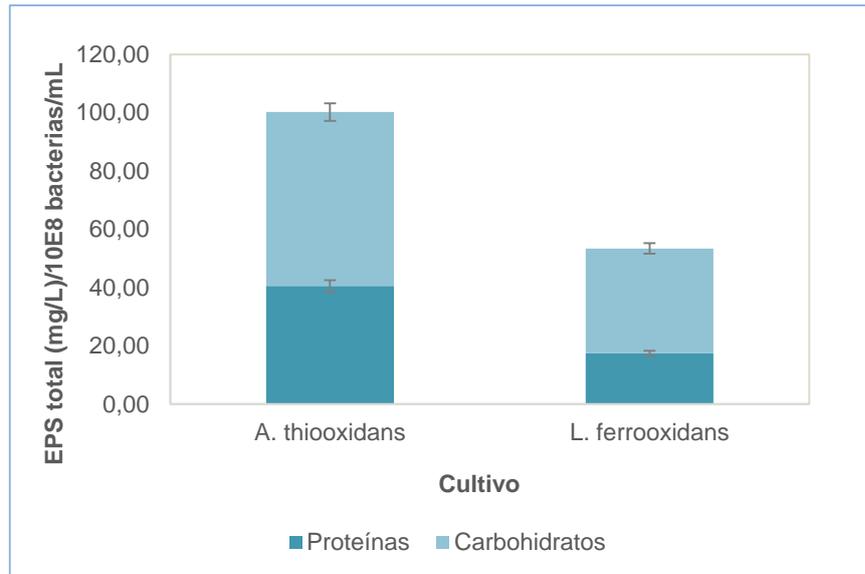


Figura 3.16. Producción de sustancias poliméricas extracelulares EPS (mg/L) en función de la concentración de carbohidratos y proteínas, en cultivos de *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En cuanto a la composición del EPS formado por carbohidratos y proteínas se puede observar que se da una mayor generación de estos en el cultivo de *A. thiooxidans*, de acuerdo a lo que se muestra en la figura 3.16. Estos valores se pueden comparar con los presentados por HE et. al., (2014), quien para cultivos de *A. ferrooxidans* obtuvo una concentración de carbohidratos de 4.51 mg/L y 1.4 mg/L para proteínas, mientras que para cultivos de *L. ferrooxidans* obtuvo valores de 3.74 y 3.08 mg/L para carbohidratos y proteínas. Esto en relación a las cantidades obtenidas en este ensayo es significativamente menor utilizando mineral polimetálico como inductor de EPS. Con los datos obtenidos en este estudio se puede comprobar que existe una mayor producción de carbohidratos y proteínas en cultivos de *A. thiooxidans* que los obtenidos en cultivos de *L. ferrooxidans*. Esto indica que los cultivos de *A. thiooxidans* presentan una mejor utilización del mineral como inductor de EPS a las mismas condiciones de operación.

3.2.6. Análisis estadístico de la producción de EPS en cultivos de *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* utilizando mineral como inductor.

Se realizó un análisis ANOVA de un factor en el programa estadístico IBM SPSS Statistics 21, con el fin de comprobar con qué tipo de cultivo se genera una mayor producción de EPS utilizando un mineral aurífero refractario como fuente de energía.

En la Tabla 3.5 nos presenta un valor de significancia menor a 0.05, esto indica que existe diferencia significativa en la generación de EPS de los cultivos de *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*.

Tabla 3.5. ANOVA de un factor para la producción de EPS en cultivos de *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* usando mineral como fuente de energía.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F ₀	P-valor
Tratamiento	2192,000	1	2192,000	20,000	0,04
Error	216,000	2	108,093		
Total	2408,000	3			

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

En la Figura 3.17 se muestra la comparación de medias para la producción de EPS en función del tipo de cultivos microbianos: *L. ferrooxidans* (1) y *A. thiooxidans* (2), utilizando un mineral refractario como inductor, aquí se puede observar que la producción de EPS es significativamente mayor en cultivos de *A. thiooxidans*, en relación a lo producido en cultivos de *L. ferrooxidans*, a las mismas condiciones de pH, temperatura y partiendo de una concentración de mineral de 2% p/v.

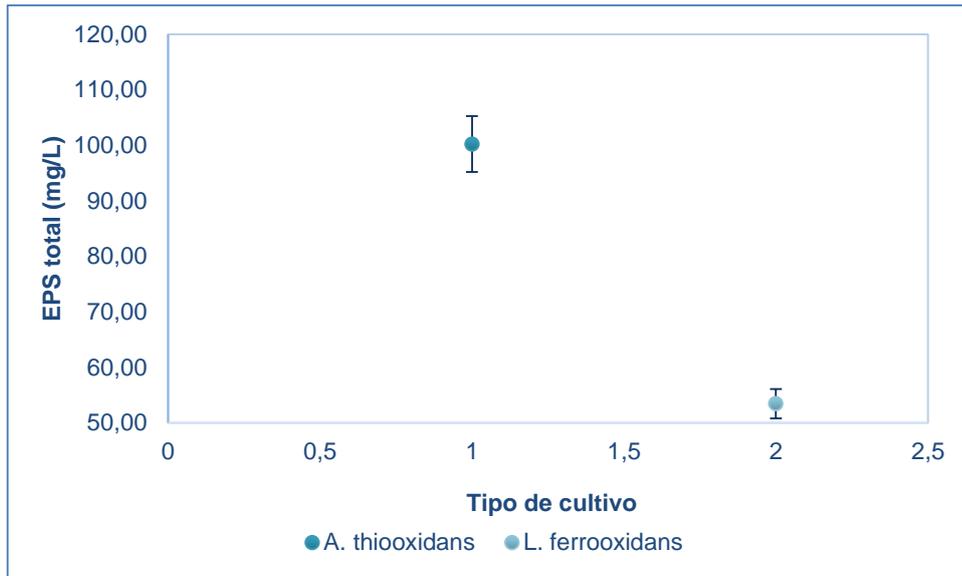


Figura 3.17. Comparación de medias para la producción de EPS en cultivos de: (1) *A. thiooxidans* y (2) *L. ferrooxidans* utilizando un mineral aurífero refractario como fuente de energía.

Fuente: El autor

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

CONCLUSIONES

Los inductores: galactosa e ion férrico influyen en la producción de sustancias poliméricas extracelulares, con respecto a la producción de EPS en ausencia de estos.

En el caso de cultivos de *A. thiooxidans* la mejor producción de EPS se dio utilizando una concentración de 0.25 % de galactosa, mientras que para los cultivos de *L. ferrooxidans* su mayor producción fue a la concentración de 27 g/L de hierro.

El uso de mineral induce la producción de EPS, sin embargo en este estudio se verifica que el uso de galactosa e ion férrico son mejores generadores de exopolímeros.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de producción de EPS en cultivos de *L. ferrooxidans*, utilizando galactosa como inductor, con el fin de comprobar si la generación de estas sustancias es mejor en este cultivo microbiano.

Se debe hacer estudios de optimización con respecto a las concentraciones de inductores de EPS, tanto para galactosa como ion férrico.

Realizar extracciones de EPS a diferentes tiempos de crecimiento celular, para de esta manera comprobar si la producción de EPS depende del tiempo, o si esta es mayor o menor fuera de los tiempos establecidos mediante las cinéticas de crecimiento.

Realizar ensayos de biooxidación sometiendo los cultivos a los inductores mencionados, con el fin de comprobar si la producción de EPS influye en los tiempos en los que se lleva a cabo este proceso.

Se recomienda mantener constante la agitación a 100 rpm y controlar constantemente la temperatura, ya que esta se debe mantener en 4°C

A pesar de que la diálisis no afecta directamente en la producción de EPS es necesario hacerla, para eliminar sustancias de bajo peso molecular que puedan influir en la determinación del EPS:

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo F. y Gentina J. (2005). Mecanismos de la biolixiviación, Fundamentos y perspectivas de las Tecnologías Biomineras. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Aguirre M. (2012). *Extracellular polymeric substances (EPS) production in Sulfobacillus thermosulfidooxidans and its relevance on attachment to metal sulfides*. Tesis de Doctorado en Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Aguirre, P., Sánchez Rodríguez, A., Gentina, J. C., & Schippers, A. (2017). Effect of Galactose on EPS Production and Attachment of: *Acidithiobacillus thiooxidans* to Mineral Surfaces. *Solid State Phenomena*, 262, 476–481. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/SSP.262.476>
- Ballester, A. (2005). Mecanismos de Biolixiviación. En Acevedo F. y Gentina J, Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras. Chile - Valparaíso.
- Bellenberg, S., Díaz, M., Noël, N., Sand, W., Poetsch, A., Guiliani, N., & Vera, M. (2014). Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in Microbiology*, 165(9), 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.08.006>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, 254, 248–254.
- Breed, A. W., Dempers, C. J. N., Searby, G. E., Gardner, M. N., Rawlings, D. E., & Hansford, G. S. (1999). The effect of temperature on the continuous ferrous-iron oxidation kinetics of a predominantly *Leptospirillum ferrooxidans* culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1), 44–53.
- Brockmann S., Arnold T., Schweder B. y Bernhard G, (2010). *Visualizing acidophilic microorganisms in biofilm communities using acid stable fluorescence dyes*, Journal of Fluorescence 20: 943-951.
- Cárdenas, J; Guerrero, J; Zárate, G. Mecanismos de oxidación bacterial de minerales sulfurados. Recuperado el 02 de Julio de 2016 de; <http://www.solomineria.com.pe/html/metalurgia/57.pdf>.

- Caicedo, G. a., & Márquez, M. a. (2010). Selection procedures of consortia bacterial with *A. ferrooxidans* like bacteria and *A. thiooxidans* like bacteria in coal biodesulfurization process. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 52, 88–94.
- Calle Castañeda, S. M. (2016). Evaluación de la acidulación de roca fosfórica empleando la bacteria acidófila *Acidithiobacillus thiooxidans*, 106. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/52635/>.
- Donati, E. (2006). *Fundamin*. Recuperado el 08 de Junio de 2013, de Biominería: Una tecnología alternativa: <http://www.fundamin.com.ar/es/publicaciones/61-mineria-y-medio-ambiente/105-biomineria-una-tecnologia-alternativa.html>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Flemming H.C., Wingender J. (2001a). *Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects*. *Water Sci. Technol.*, 43,1-8
- Daoud, J., & Karamanev, D. (2006). Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*, 19, 960–967. <http://doi.org/10.1016/j.mineng.2005.10.024>
- González, R. (1999). Biooxidación de un mineral concentrado refractario de oro en sistema continuo. Tesis de Maestría .Universidad católica de Valparaíso, Chile.
- Gehrke T., Hallmann R., Sand. W. (1995). *Importance of exopolymers from Thiobacillus ferrooxidans and Leptospirillum ferrooxidans for bioleaching*, in: T. Vargas, C.A. Jerez, J.V. Wiertz, H. Toledo (Eds.), in: *Biohydrometallurgical Processing* 1:1–11.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., & Sand, W. (1998). Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2743–2747.
- Guerrero J. (1998). *Missouri Botanical Garden*. Recuperado el 02 de Julio de 2016, de Biotecnología en la disolución y recuperación de metales: <http://www.mobot.org/jwcross/phytoremediation/Biotecnologia.htm>

- Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J. H., Gehrke, T., & Sand, W. (2006). Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 83(1–4), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.03.044>
- Herrera, L; Agillon, JC; Fehrmann, A. (1989). A new spectrophotometric method for determination of ferrous iron in the presence of ferric iron. *Chem Technol Biotechnol* 44, 171
- He, Z. G., Yang, Y. P., Zhou, S., Hu, Y. H., & Zhong, H. (2014). Effect of pyrite, elemental sulfur and ferrous ions on EPS production by metal sulfide bioleaching microbes. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, 24(4), 1171–1178. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(14\)63176-9](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(14)63176-9)
- Hippe, H. (2000). *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), *ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972),. *New York*, (May), 501–503.
- Jensen, A. B., & Webb, C. (1995). Ferrous sulphate oxidation using *thiobacillus ferrooxidans*: a review. *Process Biochemistry*, 30(3), 225–236. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)85003-1](https://doi.org/10.1016/0032-9592(95)85003-1)
- Karavaiko, G. I., Dubinina, G. A., & Kondrat'eva, T. F. (2006). Lithotrophic microorganisms of the oxidative cycles of sulfur and iron. *Microbiology*, 75(5), 512–545. <https://doi.org/10.1134/S002626170605002X>
- Kinzler K., Gehrke T., Telegdi J., Sand W. (2003). *Bioleaching—a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS)*. *Hydrometallurgy* 71: 83–88.
- Konishi, Y., Asai, S., & Yoshida, N. (1995). Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the Surface of Elemental Sulfur . These include: Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the Surface of Elemental Sulfur, 61(10), 3617–3622.
- Leuze, J. A. De, & Farrow, B. A. (2011). Modelación de Biopelículas de Microorganismos para Lixiviación de Minerales.
- Li X.Y. y Yang S.F, 2007. *Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge*. *Water Research* 41: 1022-1030.

- López, T, Domínguez, L & García, J. (2007). Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre. Trabajo presentado en el octavo Congreso Nacional de Microscopía, Octubre, México.
- 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.
- Michel, C.; Garrido, F.; Roche, E.; Challan, S.; Dictor, M. (2011). *Role of Exopolymeric Substances (EPS) in the Stability of the Biofilm of Thiomonas arsenivorans Grown on a Porous Mineral Support*. J. Microbiol. Biotechnol. 21(2), 183–186
- Muñoz, A. (2002). Oxidación de concentrados de sulfuros metálicos provenientes de la mina La Maruja de Marmato, Caldas, mediante una cepa nativa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Maestría en Biotecnología.
- Ospina J., Mejía E., Osorno L., Márquez M. y Morales, A. (2012). *Biooxidación de concentrados de arsenopirita por Acidithiobacillus ferrooxidans en erlenmeyer agitados*. Revista Colombiana de Biotecnología, 14(1), 135-145.
- Quintana, M., Ly, M., Bauer, J., & Espinoza, M. (1995). Avances en la caracterización molecular de los microorganismos biooxidantes en tanques industriales de biooxidación de arsenopirita para la recuperación de oro y en drenajes ácidos de minas: Reporte preliminar, (2), 166–171.
- Rawlings, D. E., Dew, D., & Du Plessis, C. (2003). Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology*, 21(1), 38–44. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)00004-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)00004-5)
- Rawlings D., y Johnson B. (2007). *The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia*. Microbiology, 153, 315-324.
- Rosales, V; Guerrero, J; Sáez, M. Industrial. 2001, 2, 7-10.
- Rossi, G. (1990). Biohydrometallurgy; McGraw- Hill Book Company GmbH: Hamburgo.

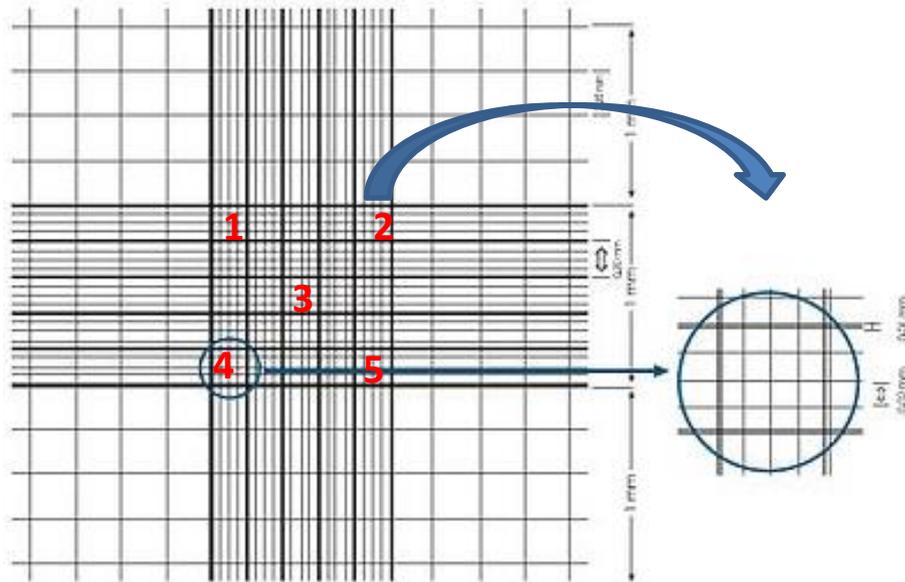
- Sánchez, I. (2013). Diversidad microbiana y taxonomía: Crecimiento microbiano. Recuperado el 02 de Julio de 2016 de: http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_contentyview=articleid=182yItemid=225
- Sand W., Gehrke T. (2006). *Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria*. Research in Microbiology 157: 49-56.
- Sand W., Gehrke T. (2006). *Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria*. Research in Microbiology 157: 49-56.
- Sand, W; Gehrke, T; Asai, S. (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching- direct vs. indirect bioleaching. Hydrometallurgy. 59, 159-175.
- Schippers, A., & Sand, W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 319–321.
- Semenza, M., & Curutchet, G. (2000). Importancia de *Thiobacillus caldus* en la lixiviación de sulfuros metálicos, (lii), 1–6.
- SUZUKI, I., CHAN, C. W., & TAKEUCHI, T. L. (1992). Oxidation of Elemental Sulfur to Sulfite by *Thiobacillus-Thiooxidans* Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(11), 3767–3769. Retrieved from <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16348814&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/6B8405DE-CC40-40AE-92E0-EA4B154ED2FD>
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., li, R. B.,Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism : from genome sequence to industrial applications, 24, 1–24. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-9-597>
- Vardanyan, A., Vardanyan, N., Markosyan, L., Sand, W., Vera, M., & Zhang, R. Y. (2015). Biofilm Formation and Extracellular Polymeric Substances (EPS) Analysis by New Isolates of *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* from Armenia. *Advanced Materials Research*, 1130, 153–156.

Wingender J., Neu T., Flemming H. (1999). *What are bacterial extracellular polymeric substances?* pp. 1-19. In J. Wingender, T. Neu, and H. Flemming (eds.). *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, New York.

ANEXOS

ANEXO 1.- CONTEO CELULAR

Se colocó aproximadamente 10 μL de muestra entre la cámara Neubauer y el cubre-objeto, fue observado en el microscopio con lente de 100X, en la siguiente figura se puede observar que el conteo celular se realizó de forma cuadrangular 1, 2, 4 y 5 (Figura 1).



Fuente: El autor

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

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

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

MEDICIÓN IÓN FERROSO

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

MEDICION HIERRO TOTAL

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

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

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

PROCEDIMIENTO:

- a. Tomar una muestra y realizar un factor de dilución a un aforo de 2mL
- b. Colocar la muestra diluida en un tubo de ensayo y añadir 0.1 mL de reactivo condicionante.
- c. Agitar continuamente durante 3 minutos.
- d. Añadir cloruro de bario con la ayuda de una espátula y agitar por un minuto.
- e. Medir absorbancia a 520 nm durante 4 minutos, tomando como el valor máximo.
- f. Se toma como blanco a una muestra que no se añade cloruro de bario.
- g. Para la curva de calibrado se realizó soluciones estándares de Na_2SO_4 anhidro en un rango de 10 - 100 ppm. Estas soluciones se procesan y se leen de manera idéntica a la solución problema.

Anexo 4. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS (FUENTE BIBLIOGRAFICA)

Preparación de reactivos:

Stock de glucosa de 400mg/L: Se tomaron 0.0400g de glucosa anhidra grado reactivo con exactitud hasta la décima de mg, esto se disolvió y aforó a 100ml con agua destilada y se almacenó en el congelador para su posterior uso.

Reactivo de fenol 5%: Se tomaron 5g de fenol grado reactivo pesados con exactitud hasta la décima de g, esto se disolvió y aforó a 100ml con agua destilada, posteriormente se almacenó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

A continuación se elaboró la curva de calibrado, la cual se encuentra especificada en la siguiente tabla:

Tabla 4.1. Curva de calibrado para medición de carbohidratos.

# Dilución	Blanco	1	2	3	4	5	6
Glucosa 400mg/L (uL)	0	25	50	100	150	200	250
H ₂ O destilada (uL)	1000	975	950	900	850	800	750
Mg/L Glucosa	0	10	20	40	60	80	100

Anexo 5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Preparación de Reactivos

Reactivo Bradford: 100mg de azul brillante de Coomasie se disuelven en 50 mL de etanol 95%. A esta disolución se le añade 100 mL de ácido fosfórico 85% p/v. Finalmente la solución resultante se diluye y afora hasta 1000 mL.

Solución de BSA: Se utilizó suero de albúmina bovina.

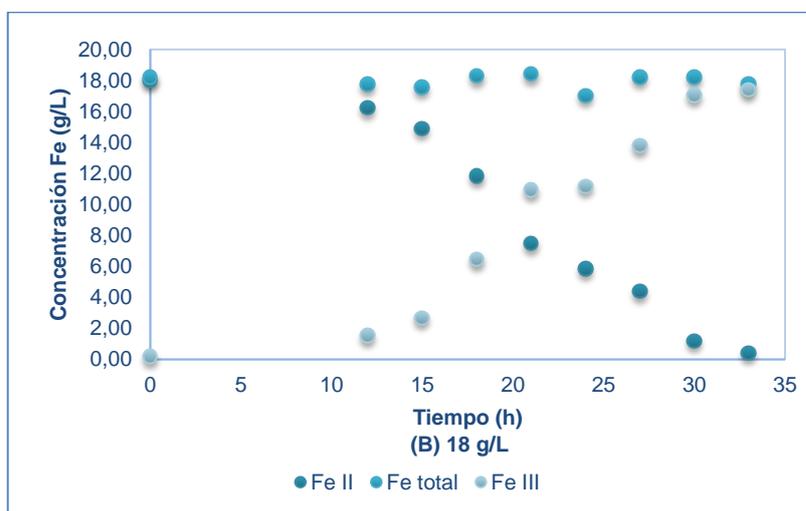
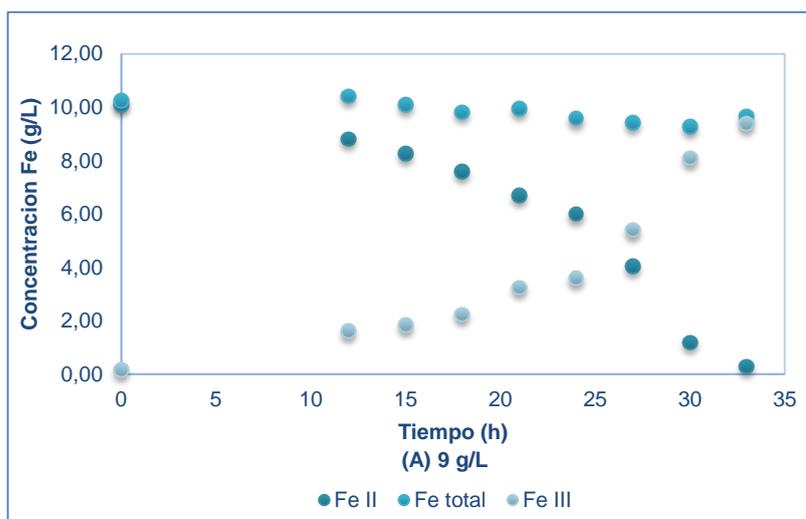
A continuación se elaboró la curva de calibrado, la cual se encuentra especificada en la siguiente tabla:

Tabla 5.1. Curva de calibrado para medición de proteínas.

MG/L concentración + estándar (µL)	Solución de BSA 1000 + mg/L (µL)	H ₂ O dest. Solución + Buffer (µL)	Reactivo Bradford (ML)
600	60	40	5
500	50	50	5
400	40	60	5
300	30	70	5
200	20	75	5
150	15	80	5
100	100	900/100	5
50	50	950/100	5
20	20	980/100	5
10	10	990/100	5
0	0	100	5

Anexo 6. DETERMINACIÓN DE HIERROS EN CULTIVOS DE *L. ferrooxidans*.

En la Figura 6.1 (A, B, C y D) se puede observar la concentración de hierro II, hierro III y hierro total en función del tiempo para cultivos de *L. ferrooxidans* adaptados a concentraciones de hierro de: 9, 18, 27 y 36 g/L respectivamente, además se puede observar que la concentración de Fe^{3+} aumenta en comparación con la de Fe^{2+} la cual disminuye, esto demuestra que existe una oxidación biológica de Fe^{2+} a Fe^{3+} .



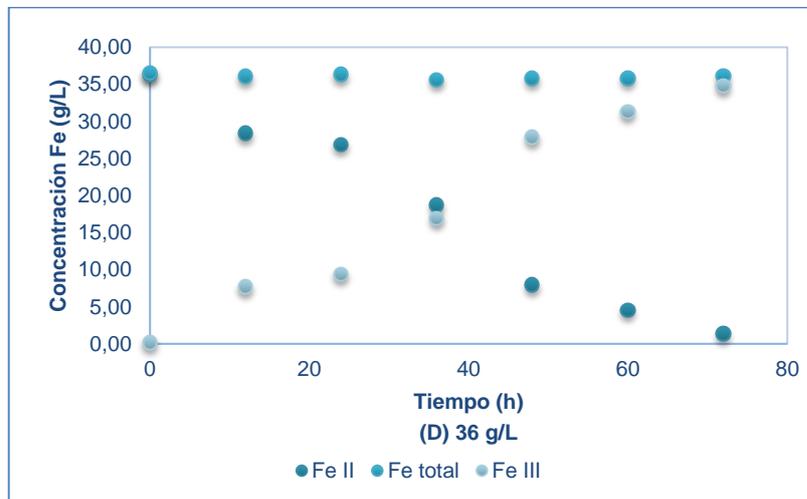
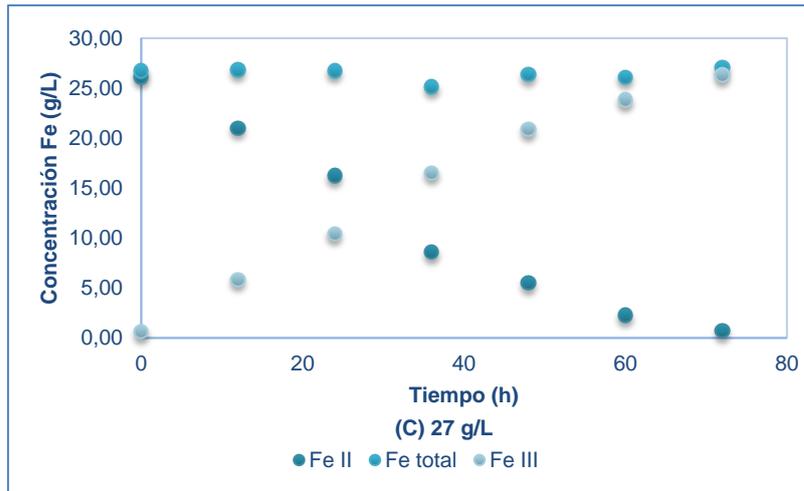
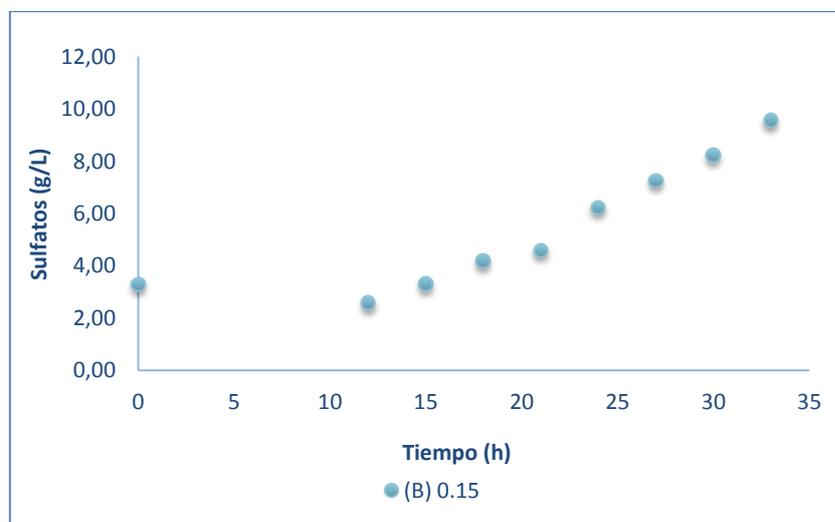
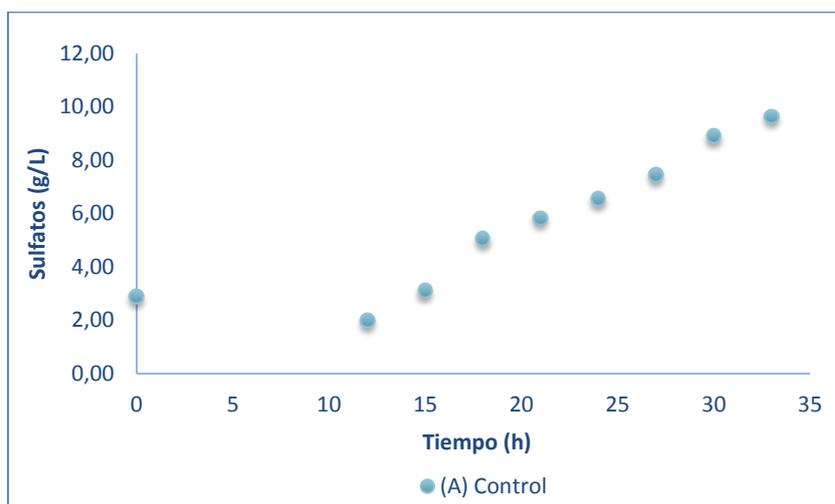


Figura 6.1. Concentración de hierro II, hierro III y hierro total (mg/L) en cultivos de *L. ferrooxidans* DSM 2705^T a concentraciones de hierro de 9 (A), 18 (B), 27 (C) y 36 g/L (D) a pH 1.8 y 30°C.

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

Anexo 7. DETERMINACIÓN DE SULFATOS EN CULTIVOS DE *A. thiooxidans*.

En la Figura 7.1 (A, B, C y D) se puede observar la concentración de sulfatos en función del tiempo para cultivos de *A. thiooxidans* adaptados a concentraciones de galactosa de: 0, 0.15, 0.25 y 0.35%.



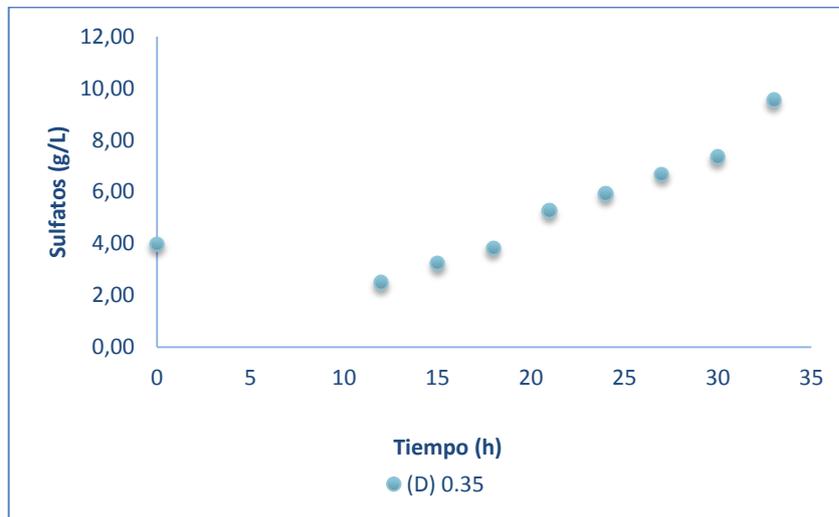
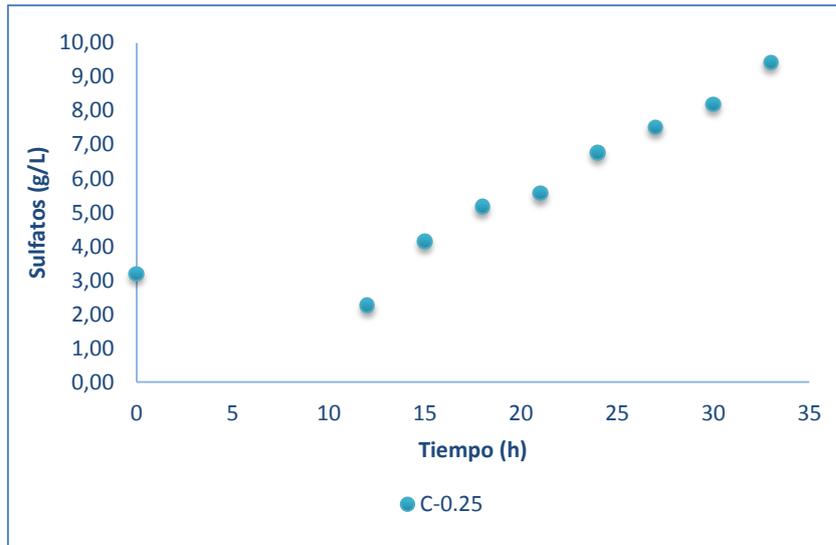


Figura 7.1. Concentración de sulfatos (mg/L) en cultivos de *A. thiooxidans* a concentraciones de galactosa de: 0 (A), 0.15 (B), 0.25 (C) y 0.35% (D) a pH 1.8 y 30°C.

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

Anexo 8. ANÁLISIS POST-HOC DE TUKEY

La Tabla 8.1 nos indica que existen diferencias significativas entre los grupos con concentraciones de galactosa de: 0 y 0.15%, y 0 y 0.25%, ya que el valor $p < 0.05$, es decir que a dichas concentraciones de galactosa la producción de EPS es mayor en comparación con la producción de estas en ausencia del inductor.

Tabla 8.1. Análisis post-hoc de Tukey para la producción de EPS en cultivos de *A. thiooxidans* adaptadas a galactosa.

(I) Galactosa	(J) Galactosa	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0,00	0,15	-41,89500*	8,44327	0,026	-76,2663	-7,5237
	0,25	-46,23500*	8,44327	0,018	-80,6063	-11,8637
	0,35	-22,45000	8,44327	0,171	-56,8213	11,9213
0,15	0,00	41,89500*	8,44327	0,026	7,5237	76,2663
	0,25	-4,34000	8,44327	0,951	-38,7113	30,0313
	0,35	19,44500	8,44327	0,240	-14,9263	53,8163
0,25	0,00	46,23500*	8,44327	0,018	11,8637	80,6063
	0,15	4,34000	8,44327	0,951	-30,0313	38,7113
	0,35	23,78500	8,44327	0,147	-10,5863	58,1563
0,35	0,00	22,45000	8,44327	0,171	-11,9213	56,8213
	0,15	-19,44500	8,44327	0,240	-53,8163	14,9263
	0,25	-23,78500	8,44327	0,147	-58,1563	10,5863

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

La tabla 8.2 nos indica que existen diferencias significativas entre los grupos con concentraciones de hierro de: 9 y 18 g/L, 9 y 36 g/L, 27 y 9 g/L, 27 y 18 g/L, y 27 y 36 g/L, ya que el valor de significancia es < 0.05 .

Tabla 8.2. Análisis post-hoc de Tukey para la producción de EPS en cultivos de *L. ferrooxidans* adaptadas a ion férrico.

(I) Hierro	(J) Hierro	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
9,00	18,00	-16,81500*	2,64895	0,011	-27,5985	-6,0315
	27,00	-103,29000*	2,64895	0,001	-114,0735	-92,5065
	36,00	-23,04000*	2,64895	0,003	-33,8235	-12,2565
18,00	9,00	16,81500*	2,64895	0,011	6,0315	27,5985
	27,00	-86,47500*	2,64895	0,001	-97,2585	-75,6915
	36,00	-6,22500	2,64895	0,230	-17,0085	4,5585
27,00	9,00	103,29000*	2,64895	0,001	92,5065	114,0735
	18,00	86,47500*	2,64895	0,001	75,6915	97,2585
	36,00	80,25000*	2,64895	0,001	69,4665	91,0335
36,00	9,00	23,04000*	2,64895	0,003	12,2565	33,8235
	18,00	6,22500	2,64895	0,230	-4,5585	17,0085
	27,00	-80,25000*	2,64895	0,001	-91,0335	-69,4665

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

Anexo 9. FOTOS

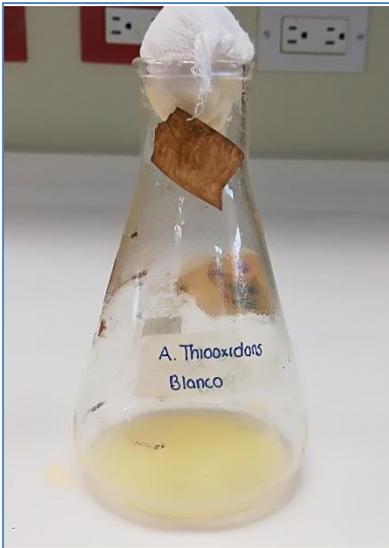


Figura 9.1. Cultivo de *A. thiooxidans* galactosa

Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.2. Adaptación de cultivos de *A. thiooxidans* a galactosa

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

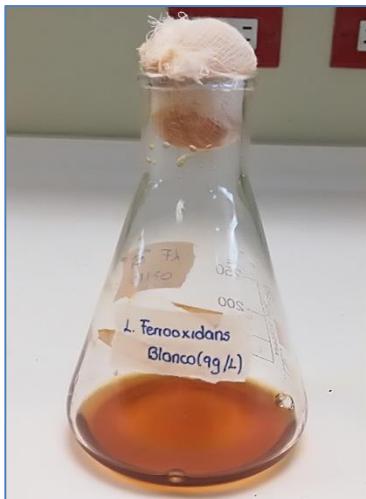


Figura 9.3. Cultivo de *L. ferrooxidans*

Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.4. Adaptación de cultivos de *L. ferrooxidans* a ion férrico

Elaborado por: Alejandro Ordóñez

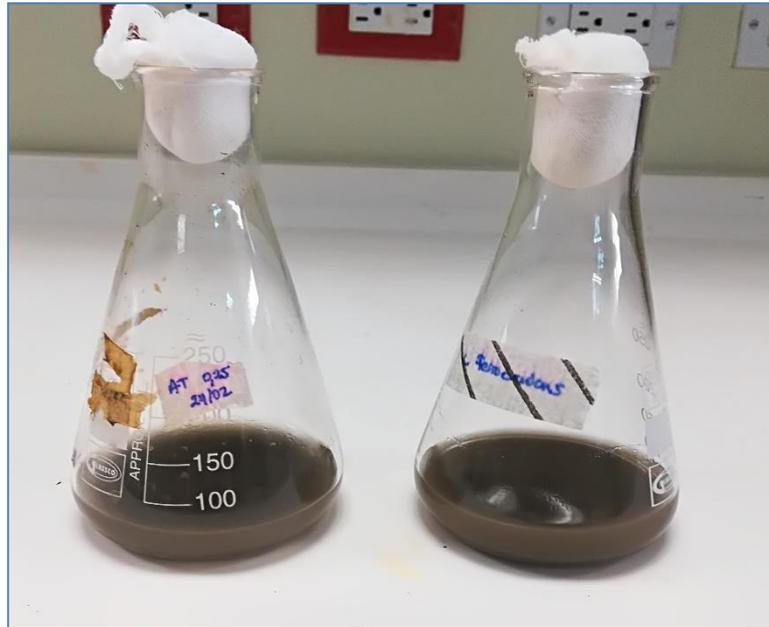


Figura 9.5. Acidificación de mineral a pH 1.8

Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.6. Cámara de Petroff-Hausser

Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.7. Microscopio para recuento de bacterias

Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.8. Determinación de pH
Elaborado por: Alejandro Ordóñez

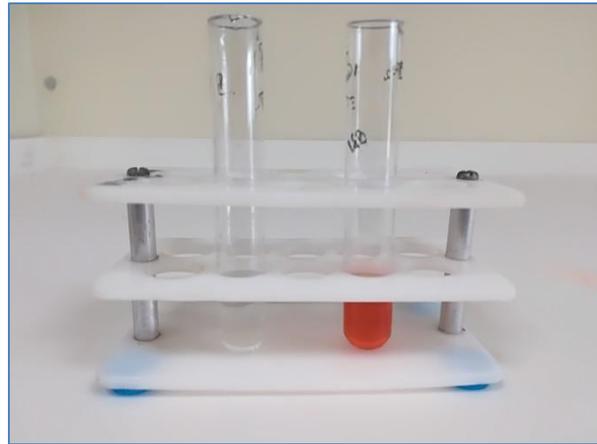


Figura 9.9. Determinación de Hierros
Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.10. Determinación de sulfatos
Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.11. Extracción de EPS
Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.12. Determinación de proteínas por el método de Bradford
Elaborado por: Alejandro Ordóñez



Figura 9.13. Determinación de carbohidratos por espectrofotetría UV visible
Elaborado por: Alejandro Ordóñez