



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**

**TÍTULO DE INGENIERO QUÍMICO**

**Producción y caracterización de sustancias poliméricas extracelulares EPS  
a diferentes tiempos de crecimiento utilizando microorganismos Acidòfilos**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**AUTORA:** Maldonado Ochoa, María Elizabeth

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

**LOJA- ECUADOR**

**2018**



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

2018

## APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

**Ingeniera.**

Paulina Isabel Aguirre Chamba

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de Producción y caracterización de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a diferentes tiempos de crecimiento utilizando microorganismos Acidòfilos, realizado por Maldonado Ochoa María Elizabeth ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, enero del 2018

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, María Elizabeth Maldonado Ochoa declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Producción y caracterización de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a diferentes tiempos de crecimiento utilizando microorganismos Acidòfilos**, 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. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad"

f. ....

Autor: María Elizabeth Maldonado Ochoa

**Cedula: 1105880965**

## **DEDICATORIA**

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mis padres. A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que di, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento.

María Elizabeth Maldonado

## **AGRADECIMIENTO**

Le agradezco a Dios por haberme permitido vivir hasta este día, haberme guiado a lo largo de mi vida, por ser mi apoyo y mi camino. Por darme la fortaleza para poder seguir adelante en aquellos momentos de debilidad.

Le doy gracias a mis papas Jorge y Silvia por todo el apoyo brindado a lo largo de toda mi vida, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera y por ser ejemplo de mi vida.

A mis hermanos por apoyarme en aquellos momentos de necesidad, por llenar mi vida de grandes momentos de felicidad que hemos compartido, como lo es ahora.

Por su orientación y atención, mi agradecimiento a la Ing. Paulina Aguirre, por el material facilitado y las sugerencias recibidas, por permitir el desarrollo de este proyecto y por toda la confianza brindada

A mis amigos Daniel, Alejandro y Erika, por todos los momentos que pasamos juntos, por todas las tareas que realizamos juntos y por su apoyo moral necesario en los momentos difíciles y la gran confianza depositada en mí.

A mi compañero de vida, por ser esa parte de mi vida que puedo llamar felicidad y ganas de salir adelante pese a las adversidades.

Finalmente y no menos importante a mi hijo, por todas las veces que no pudo tener una mamá de tiempo completo, por ser la personita que más me alienta a seguir adelante Mateo.

## 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
<b>CAPÍTULO I- MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>5</b>
1.1. Objetivos.....	6
Hipótesis de trabajo .....	6
1.2. Biohidrometalurgia .....	7
1.3. Biooxidación .....	7
1.4. Biolixiviación .....	7
1.5. Microorganismos que actúan en el proceso de biooxidación .....	7
1.5.1. Género <i>Acidithiobacillus</i> .....	8
1.5.2. Género <i>Leptospirillum</i> .....	9
1.6. Mecanismo de biolixiviación vía tiosulfato o de contacto.....	10
1.7. Biopelículas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS).....	11
1.7.1. Funciones Biológicas.....	12
1.7.2. Composición EPS de <i>A. thiooxidans</i> y <i>Lepstospirillum ferrooxidans</i> ).....	12
<b>CAPÍTULO II – METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
2.1. Diseño Experimental.....	16
2.2. Propagación de inóculos de <i>L DSM 2705<sup>T</sup></i> y <i>A thiooxidans DSM 1488<sup>T</sup></i> .....	17
2.3. Cinéticas de crecimiento .....	18
2.4. Producción de EPS en <i>A thiooxidans DSM.1488</i> utilizando galactosa como inductor. .....	18
2.5. Producción de EPS en <i>Leptospirillum ferrooxidans DSM. 2705<sup>T</sup></i> utilizando ion férrico como inductor. ....	19

2.6. Determinaciones analíticas .....	20
2.6.1. Determinación del número de bacterias .....	20
2.6.2. Medición de pH. ....	20
2.6.3. Determinación de Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> y hierro total.....	20
2.6.4. Determinación de Sulfatos. ....	20
2.6.5. Extracción de EPS. ....	21
2.6.6. Determinación de carbohidratos. ....	21
2.6.7. Determinación de proteína. ....	22
<b>CAPÍTULO III – RESULTADOS Y ANÁLISIS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Determinación de las cinéticas de crecimiento microbiano para <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM.14887 <sup>T</sup> y <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM. 2705 <sup>T</sup> .....	24
3.1.1. Cinéticas de crecimiento en cultivos de <i>A thiooxidans</i> DSM.14887 <sup>T</sup> con y sin adaptación a galactosa .....	24
3.1.2 Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento en cultivos de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 <sup>T</sup> . ....	27
En la tabla 3.2.....	27
3.1.3 Cinéticas de crecimiento en cultivos de <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM. 2705 <sup>T</sup> adaptadas a ion férrico como inductor. ....	28
3.1.4. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento microbiano en cultivos de <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 <sup>T</sup> . ....	31
En la tabla 3.4.....	31
3.2. Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). ....	32
3.2.1 Extracción de EPS en cultivos de <i>A thiooxidans</i> DSM 14887 <sup>T</sup> adaptadas a galactosa.....	33
3.2.2. Análisis estadístico para producción de EPS en cultivos <i>A.thiooxidans</i> DSM 14887 <sup>T</sup> adaptados a galactosa en diferentes tiempo de crecimiento microbiano.....	34
3.2.3. Extracción de EPS en cultivos de <i>ferrooxidans</i> adaptadas a ion férrico. ....	36
3.2.4. Análisis estadístico para producción de EPS en cultivos <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 <sup>T</sup> adaptados a hierro en diferentes tiempo de crecimiento microbiano.....	38
3.3. Caracterización química de EPS en cultivos de <i>L ferrooxidans</i> DSM 2705 <sup>T</sup> y <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 14887 <sup>T</sup> . ....	39
3.3.1 Caracterización química de EPS en cultivos <i>A. thiooxidans</i> DSM 14887 <sup>T</sup> .....	40
3.3.2. Caracterización química de EPS en cultivos <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM 2705 <sup>T</sup> .....	41



CONCLUSIONES .....	43
RECOMENDACIONES .....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	45
ANEXOS.....	48

## RESUMEN

Esta investigación se centró en la determinación del mejor tiempo de crecimiento microbiano para la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), pues estas sustancias juegan un rol importante en la biooxidación de minerales refractarios de oro.

Los microorganismos de estudio fueron *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, los cuales se manejaron bajo condiciones de pH 1.8 y 1.3 respectivamente, temperatura 30°C y cultivados a diferentes tiempos de crecimiento microbiano, (tiempo máximos de crecimiento, 72 y 96 horas), además estos fueron adaptados a inductores para una mayor producción de EPS, los cuales fueron galactosa a concentraciones de 0, 0.15, 0.25 y 0.35% e ion férrico a concentraciones de 9, 18, 27 y 36 g/L respectivamente.

La mayor producción de EPS en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* se dio en un tiempo de 72 horas utilizando galactosa como inductor a una concentración de 0.25%, mientras que para los cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* la mayor producción de EPS se dio en el 48 horas utilizando hierro como inductor a una concentración de 27 g/L.

**Palabras clave:** microorganismos, biominería, EPS, galactosa, ion férrico.

## ABSTRACT

This research focused on the determination of the best microbial growth time for the production of extracellular polymeric substances (EPS), since these substances play an important role in the biooxidation of gold refractory minerals.

The microorganisms used were *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*, which were managed under conditions of pH 1.8 and 1.3 temperature 30 ° C and were cultivated at different times of microbial growth, such as at maximum growth time, 72 and 96 hours, beside these were adapted to inducers for a greater production of EPS, which were galactose at concentrations of 0, 0.15, 0.25 and 0.35% and ferric ion at concentrations of 9, 18, 27 and 36 g / L respectively.

The highest production of EPS in cultures of *Acidithiobacillus thiooxidans* occurred at a time of 72 hours using galactose as inducer at a concentration of 0.25%, while for the cultures of *Leptospirillum ferrooxidans* the highest production of EPS was given in 48 hours using iron as inducer at a concentration of 27 g / L.

**Keywords:** microorganisms, bio-mining, EPS, galactose, ferric ion

## INTRODUCCIÓN

*Acidithiobacillus-ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus caldus* son los principales microorganismos usados en la biooxidación de oro en diferentes plantas industriales del mundo<sup>2</sup> Estos organismos 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 en acción conjunta, con otros organismos autótrofos y heterótrofos<sup>3</sup>

Estos microorganismos tienen características similares, ya que son quimiolitótrofos, es decir que tienen la capacidad de obtener su fuente de energía de compuestos inorgánicos<sup>4</sup>. Y a la vez son capaces de producir exopolímeros o sustancias poliméricas extracelulares (EPS), los cuales consisten en una mezcla compleja de biopolímeros constituidos por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y sustancias húmicas entre otras<sup>2</sup>.

Los EPS juegan un rol importante en la biooxidación de minerales refractarios de oro ya que se trata de un proceso interfacial que se da a lugar en el microambiente generado por los exopolímeros y los iones férricos, que se ubican entre las paredes celulares de los microorganismos anteriormente citados y la superficie de sulfuros metálicos, cumpliendo dos funciones, 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<sup>5</sup>

Por tal motivo el objetivo del presente estudio fue determinar el mejor tiempo de crecimiento microbiano de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> para la mayor producción de EPS y su caracterización.

El capítulo 1 corresponde al marco teórico, el cual describe los fundamentos básicos con los cuales se llevó a cabo este estudio, también se describe brevemente los microorganismos que intervienen y sus mecanismos de acción, al igual que las condiciones físicas y químicas que se deben considerar antes y durante la adaptación de los microorganismos, finalmente se describe la función biológica y la composición de los EPS y su uso en la biooxidación.

En el capítulo 2 se describe la metodología utilizada en esta investigación, el diseño experimental que se utilizó, y técnicas que se llevaron a cabo para la adaptación de los microorganismos y extracción de EPS.

El capítulo 3 muestra los resultados obtenidos, así como los métodos estadísticos utilizados para su análisis. Se presentan las cinéticas de crecimiento bacteriano, la cantidad de EPS obtenida en función del tiempo y su caracterización bioquímica.

En el capítulo 4 se dan a conocer las conclusiones obtenidas de esta investigación así como las recomendaciones para posteriores estudios.

## **CAPÍTULO I- MARCO TEÓRICO**

## 1.1. Objetivos

### Objetivo General

Determinar el mejor tiempo de crecimiento de los microorganismos acidófilos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> para producir mayores cantidades de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y caracterizar químicamente su composición en los tiempos establecidos.

### Objetivos específicos

Establecer las cinéticas de crecimiento microbiano de los cultivos puros *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>

Determinar el mejor tiempo de producción de EPS en los microorganismos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup>, y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> en 72 horas, 96 horas y en el tiempo de crecimiento máximo.

Caracterizar químicamente el EPS producido en los diferentes tiempos de formación.

### Hipótesis de trabajo

**H<sub>0</sub>:** La producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) es igual al tiempo máximo de crecimiento así como en los tiempos de 72 y 96h.

**H<sub>1</sub>:** La producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) es diferente al tiempo máximo de crecimiento con respecto a los tiempos de 72 y 96h.

## 1.2. Biohidrometalurgia

Biominería es el término genérico que describe el procesamiento de minerales y concentrados que utilizan microorganismos. Es un área de la biotecnología que ha experimentado un crecimiento considerable en escala y aplicación desde la década de 1960, cuando se utilizó por primera vez, en Roca "dumps" para la recuperación de cobre a partir de minerales de baja ley, los cuales no eran posibles procesarlos por fundición convencional<sup>1</sup>.

## 1.3. Biooxidación

La biooxidación es una tecnología alternativa para el aprovechamiento de minerales como (e.g. uranio, cobre, zinc, níquel y oro). Los minerales auríferos son en muchos casos refractarios a los tratamientos tradicionales, y es por ello que se requieren de condiciones tecnológicas drásticas, tales como la pirometalurgia<sup>6</sup>. Este proceso implica la acción microbiana, actuando sobre especies sulfuradas que cubren la especie mineralógica de interés; es decir, la biooxidación simplemente aumenta la exposición del elemento a recuperar, pero no lo solubiliza como ocurre durante los procesos de biolixiviación. La biooxidación se usa como proceso de pretratamiento de los minerales refractarios de oro para liberar a éste de los sulfuros y arsenosulfuros que suelen ocluirlo; de este modo, se lo expone para que pueda ser lixiviado más fácilmente<sup>7</sup>.

## 1.4. Biolixiviación

Se denomina así al proceso de catálisis de ciertos microorganismos sobre la solubilización de algunos componentes de una matriz insoluble, tal es el caso de los sulfuros metálicos.<sup>8</sup>.

## 1.5. Microorganismos que actúan en el proceso de biooxidación

Las principales bacterias mesófilas involucradas en la biooxidación de minerales sulfurados son:

- *Acidithiobacillus ferrooxidans*: capaz de oxidar compuestos reducidos de azufre a sulfatos y  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ .
- *Leptospirillum ferrooxidans*: capaz sólo de oxidar  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ .
- *Acidithiobacillus thiooxidans*: capaz sólo de oxidar compuestos reducidos de azufre a sulfatos



Otro grupo de microorganismos que encontramos dentro de la biooxidación son los termófilos moderados estos son capaces de crecer a temperaturas alrededor de 50°C donde encontramos:

- *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: tienen la capacidad de oxidar azufre y hierro.
- *Sulfobacillus thermotolerans*: temperatura óptima de crecimiento a 40°C
- *Sulfobacillus sibiricus*: oxida los sulfuros metálicos, iones de Fe<sup>2+</sup> y azufre en presencia de extracto de levadura.

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<sup>9</sup>

Estos microorganismos son capaces de vivir en pH muy bajos y a su vez mantienen este ambiente ácido generando protones a través de la oxidación de azufre (*A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*). Además, usan principalmente oxígeno como aceptor final de electrones<sup>9</sup>.

#### 1.5.1. Género *Acidithiobacillus*

El género *Acithiobacillus* comprende a bacterias capaces de obtener energía de la catálisis oxidativa de compuestos reducidos de azufre utilizando oxígeno como último aceptor electrónico. De este género, existen algunas especies acidófilas que resisten bajos valores de pH, además son mesófilas, es decir, actúan a temperaturas de 20-30°C y autotróficas (utilizan CO<sub>2</sub> como fuente de carbono), Así *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, han mostrado sistemáticamente una acción importante en la solubilización de metales a partir de minerales sulfurados de baja ley<sup>10</sup>.

##### 1.5.1.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Esta bacteria es un Gram-negativa, que se desarrolla de manera óptima a 30°C y pH=2. 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<sup>11</sup>.

Estas bacterias son abundantes en ambientes asociados con minerales como pirita, depósitos de carbón y en drenajes ácidos de zonas mineras. Es un organismo dominante en el proceso de biooxidación de minerales<sup>12</sup>.

#### 1.5.1.2. ***Acidithiobacillus thiooxidans***

Son bacterias Gram-negativas que tienen forma de barras con extremos redondeados, miden de 0.30 a 0.60µm de ancho por 0.90 a 3.00µm de longitud. Se adapta a zonas con pH=2, es decir que es un microorganismo acidófilo, además a temperaturas de entre 20-30°C.

Son bacterias autótrofas y quimiolitótrofas, por esta razón obtienen su fuente de energía a través de compuestos inorgánicos de azufre elemental, sulfuro de hidrógeno, tiosulfato y otros compuestos reducidos de azufre<sup>13</sup>.

#### 1.5.2. **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 monófilos, ya que tienen un límite cercano a 55°C.

Las bacterias de este género son quimiolitótrofas, es decir que crecen mediante la oxidación de hierro, pero no compuestos reducidos del azufre. El hierro puede proporcionarse como sulfato ferroso, o en forma mineral, como sulfuros como la pirita (FeS<sub>2</sub>). De entre esta destaca en el proceso de biooxidación *Leptospirillum ferrooxidans*<sup>9</sup>.

##### 1.5.2.1. ***Leptospirillum ferrooxidans***

Son bacterias de forma espiral, con un ancho de 0.3 a 0.5µm y de 0.9 a 3µm de largo, se desarrolla de manera óptima a 30°C y a pH ácidos entre 1.3 a 1.8. Son aerobios y quimiolitótrofos, solo pueden utilizar el Fe<sup>2+</sup> como donador de protones, no se inhibe en presencia de Fe<sup>3+</sup>, por esta razón se utiliza en procesos de biooxidación de minerales sulfurados<sup>14</sup>.

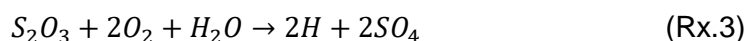
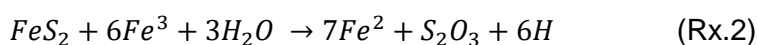
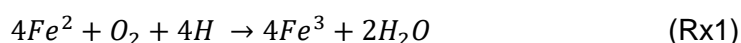
## 1.6. Mecanismo de biolixiviación vía tiosulfato o de contacto

Este mecanismo tiene dos funciones principales:

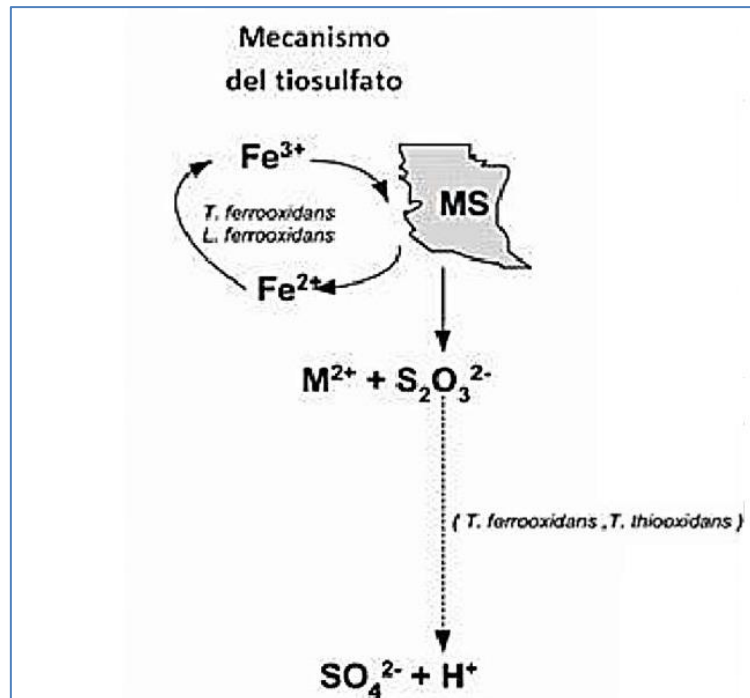
La primera en la cual la adherencia de las bacterias a la superficie del sulfuro se da a través de una capa de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), en donde existen acumulados iones férricos ( $Fe^{3+}$ ). La carga positiva de estas sustancias permite que la adherencia del sulfuro metálico se cargue negativamente<sup>15</sup>

La segunda en la que los sulfuros metálicos como la piritita ( $FeS_2$ ), 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 tetrionato y otros politionatos, hasta llegar a sulfato<sup>16</sup>

La presencia y acción de compuestos intermedios de azufre (sulfitos, tiosulfatos y tetratonatos) durante la disolución de piritita, nos indica un mecanismo indirecto para la oxidación de sulfuros metálicos, siendo atacado por ión férrico hexahidratado produciendo tiosulfato, al no ser estable en soluciones ácidas que contienen  $Fe^{3+}$ , reacciona produciendo ion ferroso y tetrionato. Según este mecanismo, una vez que la célula bacteriana se encuentra adherida a la superficie mineral, el ion férrico hexahidratado contenido en el exopolímero extracelular empieza a atacar al sulfuro metálico de forma indirecta produciendo  $Fe^{2+}$  y tiosulfato (intermediario). Este último reacciona generando otros productos intermedios, tales como tetrionato y tritronato, hasta llegar a sulfato de acuerdo a las siguientes reacciones:



El ión ferroso es, rápidamente, oxidado a ion férrico por las bacterias y reciclado dentro del exopolímero. Parte de los politionatos producidos sirven como fuente de energética a las bacterias, asimismo proveen características de coloración y turbidez al medio y la consiguiente generación de precipitados<sup>17</sup>.



**Figura 1.1** Mecanismos de tiosulfato en la biolixiviación de metales sulfurado<sup>18</sup>

**Fuente:** Tapia (2012)

**Elaboración:** María Maldonado

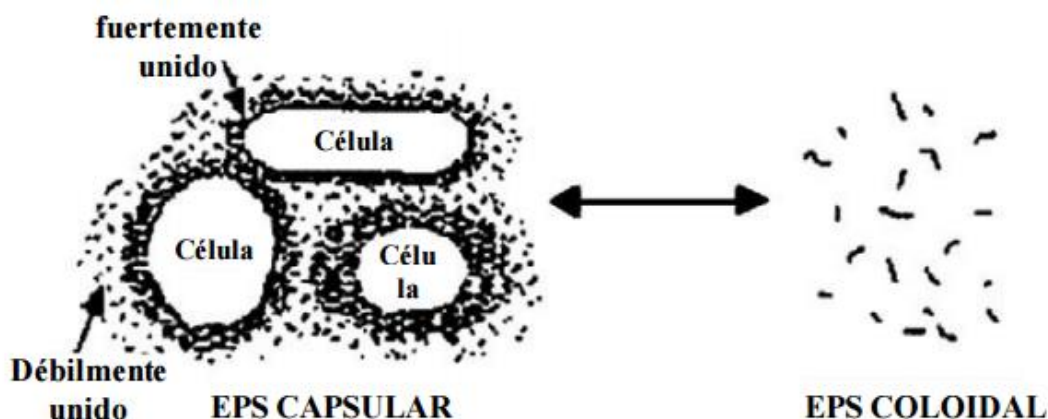
### 1.7. Biopelículas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS)

Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son productos metabólicos de origen biológico y sus constituyentes principales consisten esencialmente en sustancias de alto peso molecular, como carbohidratos y proteínas, además de sustancias húmicas y ácidos nucleicos y urónicos<sup>19</sup>.

Las EPS confieren estabilidad mecánica a las biopelículas, las cohesionan, facilitan su adhesión a las superficies e interconectan e inmovilizan a las células presentes en las biopelícula<sup>20</sup>. Las denominadas EPS activas son mayoritariamente enzimas que intervienen en la degradación de compuestos orgánicos. Los ácidos nucleicos y las lectinas son EPS que permiten intercambiar información y regular diferentes procesos como la actividad enzimática<sup>21</sup>

Las EPS pueden subdividirse en dos fracciones: EPS capsular y EPS coloidal (Figura 1.2). La fracción de la EPS capsular está íntimamente unida a las células, mientras que la EPS coloidal está débilmente ligada a tales células o disuelta en el medio. Generalmente, estas dos fracciones de EPS pueden separarse por centrifugación: la

fracción coloidal permanece en el sobrenadante mientras que la fracción capsular queda en el pellet de microorganismos. La estructura de las EPS capsular está formada por dos capas: una interna fuertemente unida a las células y la más externa que se encuentra más dispersa<sup>22</sup>.



**Figura 1.2.** Esquema de la estructura de las EPS<sup>22</sup>

**Fuente:**

**Elaboración:**

#### 1.7.1. Funciones Biológicas

Los polímeros extracelulares producidos por los microorganismos desempeñan múltiples funciones que generalmente se traducen en acciones beneficiosas para los mismos. Los exopolímeros intervienen en la adhesión microbiana a superficies. Estas películas o biofilms constituyen un entorno dinámico en el que las células bacterianas parecen alcanzar un estado de homeostasis y una óptima organización para hacer uso de todos los nutrientes disponibles.

Otra función de los exopolisacáridos microbianos es la de proteger la célula bacteriana frente a la desecación y fluctuación de potenciales de agua, ya que pueden actuar como reservorios de agua en condiciones drásticas<sup>23</sup>.

#### 1.7.2. Composición EPS de *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Lepstospirillum ferrooxidans*)

Estas bacterias son capaces de adaptar la composición de sus EPS según el sustrato y fuente de energía al que se adhieren, por lo que se ha propuesto que su modo de adherencia debe ser diferente para las células que oxidan compuestos inorgánicos reducidos de azufre o para aquellas que oxidan hierro<sup>24</sup>. La célula bacteriana debe ser

capaz de censar la superficie del mineral y gatillar la expresión de genes diferentes de acuerdo a la composición del sustrato mineral y a las condiciones de crecimiento, pH y temperatura principalmente en las que se encuentre. En base a esto, la estructura química de las EPS varía según el sustrato al cual se adhiere la bacteria. Algunas especies del género *Acidithiobacillus* crecidas con azufre como son las *Acidithiobacillus thiooxidans* presentan un alto porcentaje de lípidos (53,8%) en sus EPS en comparación con *Lepstuspirillum ferrooxidans* crecidas con sulfato ferroso (36,9%). La composición de los polisacáridos de las EPS también cambia de acuerdo al sustrato, presentando una mayor variabilidad de sacáridos (ramnosa, fucosa, xilosa, mannososa, glucosa y ácido glucurónico) en células crecidas con sulfato ferroso que aquellas crecidas con azufre (glucosa y ácido glucurónico)<sup>25</sup>.

**Tabla 1.1** Componentes principales EPS

POLIMERO	COMPONENTES PRINCIPALES	TIPO DE PUENTE
Polisacáridos	Monosacáridos, ácidos irónicos amino-azúcares	Glicosídicos
Proteínas (polipéptidos)	amino-ácidos	Péptidos
Aminoácidos	Nucleótidos	Fosfodiester
(Fosfo)lípidos	Ácidos grasos, glicerol, fosfatos, azucars	Esteres
Substancias húmicas	Amino-ácidos, azucars simples compuestos fenólicos	Éter, tipo C-C, Péptidos

Fuente : Tapia<sup>19</sup> (2010)

Elaboración: María Maldonado

Por otro lado el tiempo de crecimiento microbiano presenta influencia en cuanto a la composición bioquímica de EPS, donde en un tiempo de crecimiento exponencial se obtiene mayores cantidades polisacáridos<sup>19</sup>.

## **CAPÍTULO II – METODOLOGÍA**



## 2.1. Diseño Experimental

Los diseños experimentales realizados en este trabajo se detallan en las tablas a continuación:

**Tabla 2.1.** Cinética de crecimiento microbiano utilizando galactosa como inductor de EPS

Variables independientes		Variables Dependientes	Parámetros de trabajo	No Experimentos
Concentración de galactosa (%)	Tipo de cultivo puro			
0,15	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM. 14887 <sup>T</sup>	Velocidad de crecimiento	pH inicial : 1,8	8
0,25			Temperatura: 30 °C	
0,35		Sulfatos	Agitación:180 rpm	
Control sin galactosa				

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

**Tabla 2.2.** Cinética de crecimiento microbiano utilizando ion férrico como inductor de EPS

Variables independientes		Variables Dependientes	Parámetros de trabajo	No Experimentos
Concentración de hierro(g/L)	Tipo de cultivo puro			
9 (control)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM. 2705 <sup>T</sup>	Velocidad de crecimiento	pH inicial : 1,3	8
18			Temperatura: 30 °C	
27		Fe <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup> Fe total	Agitación:180 rpm	
36				

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

**Tabla 2.3.** Producción y caracterización del EPS variando el tiempo de obtención de EPS

Variables independientes		Variables Dependientes	Parámetros de trabajo	No Experimentos
Tiempo de extracción para cada cultivo	Tipo de cultivo puro			
3 tiempos (72,96 y tiempo de máximo crecimiento microbiano)	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> DSM. 2705 <sup>T</sup>	Cantidad de EPS	pH inicial : 1,8	48
	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM. 14887 <sup>T</sup>	Caracterización EPS	Temperatura: 30 °C	
			Agitación:180 rpm	

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

## 2.2. Propagación de inóculos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>.

Los microorganismos acidófilos usados fueron *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>, se cultivaron en un medio definido, tomando como base el medio propuesto por Kim et al (2002), con sulfato ferroso y azufre como fuente de energía respectivamente (ver Tablas 4 y 5).

**Tabla 2.4.** Composición del medio de cultivo para el cultivo de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM. 2705<sup>T</sup>

Compuesto	Concentración (g/L)
KCl	1,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,6
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	44
pH (ajustado a 1,3 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10N)	

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

**Elaborado por:** María Maldonado

**Tabla 2.5.** Composición del medio de cultivo para el cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM. 14887<sup>T</sup>

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

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

**Elaborado por:** María Maldonado

La activación y propagación de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM. 2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM.14887<sup>T</sup> se llevó a cabo en matraces erlenmeyer de 250 mL con 50 mL del medio de cultivo. Se esterilizó en un autoclave marca Yamato sterilizer SM510 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<sup>T</sup> y *A. thiooxidans* respectivamente, a fin de evitar la oxidación férrica y su precipitación.

Se procedió a realizar sub-cultivos a través de repiques sucesivos de los microorganismos previamente adaptados con el fin de disponer de inóculos activos. Las condiciones en las que se mantuvieron los cultivos fue de 30°C y 180 rpm en un agitador orbital marca Thermo scientific con pH inicial de 1.8 y 1.3 para *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* respectivamente. El cultivo se consideró adaptado cuando en el caso de *L. ferrooxidans* DSM. 2705<sup>T</sup> se dio el 100% de la oxidación férrica y en el caso de *A. thiooxidans* DSM.14887<sup>T</sup> se oxidó por completo el azufre elemental. Además se evidenció su adaptación mediante conteo celular, comprobando así que las muestras adaptadas a galactosa e ion férrico, tenían un número similar de bacterias que el control.

### **2.3. Cinéticas de crecimiento**

Una vez adaptados los microorganismos se procedió a inocular los cultivos en matraces de 250 mL, con un volumen de inóculo de 10% que permita obtener una concentración celular inicial de  $5 \times 10^6$  células/mL para proceder con la determinación de la cinética de crecimiento con un número constante de células entre los cultivos y sus réplicas. Se llevaron conteos celulares en cámara Neubauer de 0,02 mm con microscopia de contraste de fases (Zeiss), cada 2 horas, así mismo se realizó la medición de parámetros como: pH, Fe<sup>2+</sup>, Fe total, sulfatos; con el fin de controlar la variación de las mismas en función del tiempo. Los ensayos se dieron por terminados cuando la oxidación de hierro y sulfatos fue mayor al 90%.

### **2.4. Producción de EPS en *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM.14887<sup>T</sup> utilizando galactosa como inductor.**

Con el fin de obtener alto contenido de EPS, se utilizó cultivos microbianos puros de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM.14887<sup>T</sup> los cuáles se desarrollaron en el medio definido anteriormente, la fuente de energía empleada fue azufre elemental.

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 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.

La extracción de EPS se realizó tomando en cuenta diferentes tiempos de crecimiento celular: tiempo de máximo de crecimiento celular determinado por la cinética, 72 y 96h, para de esta manera comparar la producción de dichas sustancias y su composición.

## **2.5. Producción de EPS en *Leptospirillum ferrooxidans* DSM. 2705<sup>T</sup> utilizando ion férrico como inductor.**

Para llevar a cabo la obtención de EPS utilizando ión férrico como inductor en *L. ferrooxidans* DSM. 2705<sup>T</sup>, se procedió a aumentar en escalón el ión ferroso, considerando un volumen de inóculo de 10% y una concentración inicial de 9 g/L de hierro. A medida que el cultivo alcanzó concentraciones cercanas a cero se adicionó ión ferroso hasta alcanzar concentraciones de 18; 27 y 36 g/L de ión férrico en solución.

Los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El valor de 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 entre las diferentes concentraciones de hierro probadas.

Con el fin de verificar el crecimiento de las células microbianas en ión férrico, se llevaron a cabo determinaciones de ion ferroso, hierro total, pH, conteo celular y proteína total.

La extracción de EPS se realizó tomando en cuenta el tiempo donde existe un máximo crecimiento microbiano, 72 y 96h, para de esta manera comparar el crecimiento de dichas sustancias y su composición.

## 2.6. Determinaciones analíticas

### 2.6.1. Determinación del número de bacterias

La determinación de número de células por volumen se realizó a través del conteo celular en una cámara de Neubauer con profundidad de 0.02 mm. En esta se colocó una cantidad 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:

$$\text{concentración} \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células} * \text{FD} * 1000}{\text{Área} * \text{Profundidad}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Dónde:

Área = 0.04mm<sup>2</sup>

Profundidad = 0.02mmG

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

FD = factor de dilución

### 2.6.2. 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.

### 2.6.3. Determinación de Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y hierro total.

El ión ferroso se determinó mediante el método de Muir, basado en la formación de un complejo coloreado entre Fe<sup>2+</sup> 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. El hierro total se midió por reducción del Fe<sup>3+</sup> con clorhidrato de hidroxilamina. El ión férrico se determinó por diferencia entre ión ferroso y hierro total<sup>26</sup> (Anexo 2).

### 2.6.4. 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. 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<sup>27</sup> (Anexo 3).

#### **2.6.5. Extracción de EPS.**

Los EPS agrupados fueron extraídos de la siguiente manera: Se tomó 30 mL de los cultivos microbianos a los tiempos establecidos (tiempo de máximo crecimiento, 72 y 96 h) se centrifugaron a 5800rpm durante 10 minutos, posteriormente los sedimentos celulares se resuspendieron en 20 mL de buffer PBS (phosphate buffered saline). Aproximadamente se utilizaron dos volúmenes de resina de intercambio catiónico Dowex (CER) con respecto al volumen de peso seco ver anexo 4 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 4500rpm durante 5 min, y se filtró a través de una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ <sup>28</sup>, para la cuantificación del mismo se determinó la cantidad de carbohidratos y proteínas descritas seguidamente.

#### **2.6.6. 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 ver anexo 5, 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 en obscuridad, 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<sup>29</sup> (Anexo 5).

### **2.6.7. Determinación de proteína.**

El contenido de proteínas fue determinado usando el método de Bradford (1951). Se utilizó albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar (Sigma- Aldrich). El procedimiento consistió en agregar 100  $\mu$ L de la muestra en análisis a 5,0 mL de reactivo de Bradford, manteniendo la mezcla estática durante 10 min en oscuridad, se midió la absorbancia de la mezcla en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific (Modelo Genesys 20) a 750 nm en un espectrofotómetro de UV-visible<sup>30</sup> (Anexo 6).

## **CAPÍTULO III – RESULTADOS Y ANÁLISIS**



### **3.1. Determinación de las cinéticas de crecimiento microbiano para *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM.14887<sup>T</sup> y *Leptospirillum ferrooxidans* DSM.2705<sup>T</sup>.**

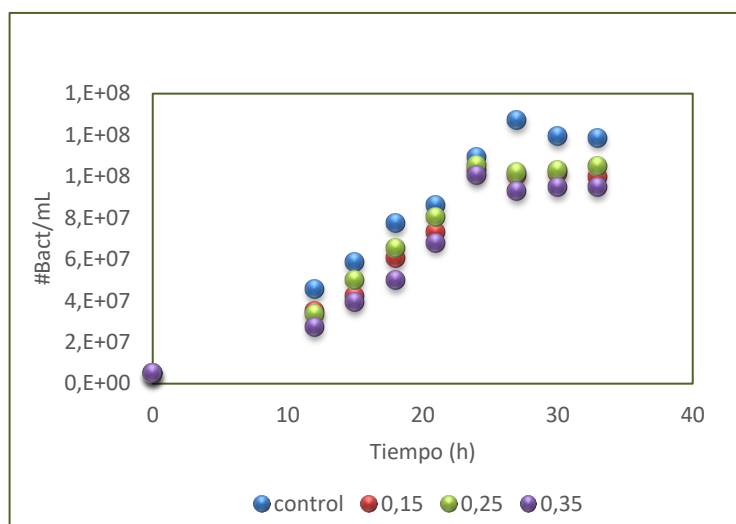
#### **3.1.1. Cinéticas de crecimiento en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM.14887<sup>T</sup> con y sin adaptación a galactosa**

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 las cinéticas de crecimiento, en donde se determinó la concentración de sulfatos, concentración microbiana y medición de pH.

En la figura 3.1 se observa la concentración microbiana (bacterias/mL), en función al tiempo (h), para las diferentes concentraciones de galactosa ya indicadas. De acuerdo a las gráficas mostradas los microorganismos tienen un crecimiento exponencial a partir de la hora 10 hasta la hora 24, a partir del cual se ve un crecimiento constante lo que indica que las bacterias entraron en una etapa estacionaria, es por eso que se consideró un tiempo de 24 horas como el periodo de crecimiento óptimo de las células.

El mayor crecimiento microbiano se dio para el control con  $1 \times 10^8$  células/mL; seguido de los cultivos adaptados a 0.15, 0.25 y 0.35% de galactosa. Los valores obtenidos son similares al estudio de Tapia<sup>19</sup>, sin embargo se debe indicar que las experiencias mencionadas en dicha investigación tuvieron una duración de 3 a 4 días en cultivos de *A. ferrooxidans*.

Los conteos obtenidos a las concentraciones de 0.15, 0.25 y 0.35% de galactosa pueden ser comparadas con el control, ya que los valores son similares. A pesar que la galactosa actúa como un inhibidor del crecimiento celular los microorganismos se han adaptado a la misma.



**Fig. 3.1.** Cinética de crecimiento microbiano de *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> a diferentes concentraciones de galactosa 0 (control), 0.15, 0.25 y 0.35% a pH 1.8 y 30°C.

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

En la tabla 3.1 se muestra la velocidad de crecimiento microbiano  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) para cultivos de *A. thiooxidans* adaptados a galactosa a concentraciones de 0 (control), 0.15, 0.25 y 0.35%, la velocidad máxima de crecimiento se dio en un periodo de 24 horas dando un valor  $0.090 \text{ h}^{-1}$  para el cultivo sin galactosa, este valor es similar al descritos por Jensen & Webb<sup>31</sup>, en donde los rangos de  $\mu$  oscilan entre  $0.05$  y  $1.3 \text{ h}^{-1}$  para el género *Acidithiobacillus*, sin embargo, para la especie *A. thiooxidans* el valor de  $\mu$  reportado es de  $0.046$ , en un cultivo batch a pH de 1.7 Karavaiko<sup>32</sup>

En los cultivos adaptados a concentraciones de galactosa de 0.15, 0.25 y 0.35%, las velocidades de crecimiento fueron cercanas a la obtenida en el control, lo que nos indica que los cultivos se encuentran adaptados al inductor.

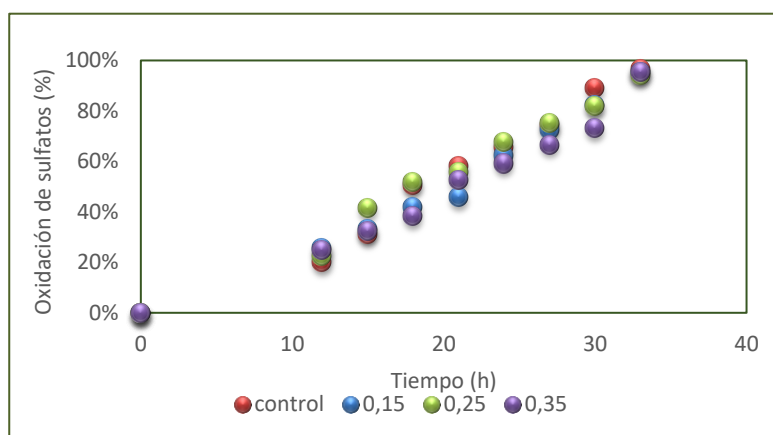
**Tabla 3.1.** Velocidad máxima de crecimiento microbiano ( $\mu$ ) y  $R^2$  de *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> a concentraciones de galactosa de 0.15, 0.25 y 0.35% a pH 1.8 y 30°C.

Concentración de galactosa (%)	$\mu(\text{h}^{-1})$	$R^2$
Control	0.090	0.99
0.15	0.081	0.97
0.25	0.079	0.99
0.35	0.085	0.98

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

En la Figura 3.2 se observa el porcentaje de oxidación del ion sulfato en función del tiempo (h) para cultivos de *A. thiooxidans* adaptados a diferentes concentraciones de galactosa, los valores obtenidos alcanzan aproximadamente el 100% de oxidación en 33 horas de crecimiento, siendo el que mayormente oxida el cultivo sin galactosa.

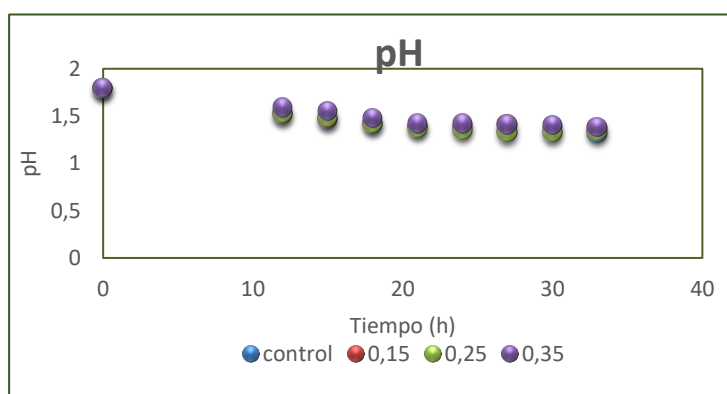


**Figura 3.2.** Porcentaje de oxidación de sulfatos (%) *A. thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> a concentraciones de galactosa de 0 (blanco), 0.15, 0.25 y 0.35% a pH 1.8 y 30°C.

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

En las figuras 3.3 se observa la variación del pH a través del tiempo, el cual disminuye significativamente en las 24 horas hasta alcanzar valores aproximadamente de 1.2 para las distintas concentraciones de galactosa. Este decremento del pH se debe a la oxidación del azufre elemental realizada por los microorganismos generando así ácido sulfúrico y sulfatos como producto de su metabolismo como indica en su estudio Calle<sup>33</sup>.



**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:** María Maldonado

### 3.1.2 Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>.

En la tabla 3.2 se analizó la concentración de galactosa con respecto a la velocidad de crecimiento microbiano, donde se observa que el valor P es mayor a 0.05 por lo que la concentración de galactosa no afectaría en el crecimiento microbiano.

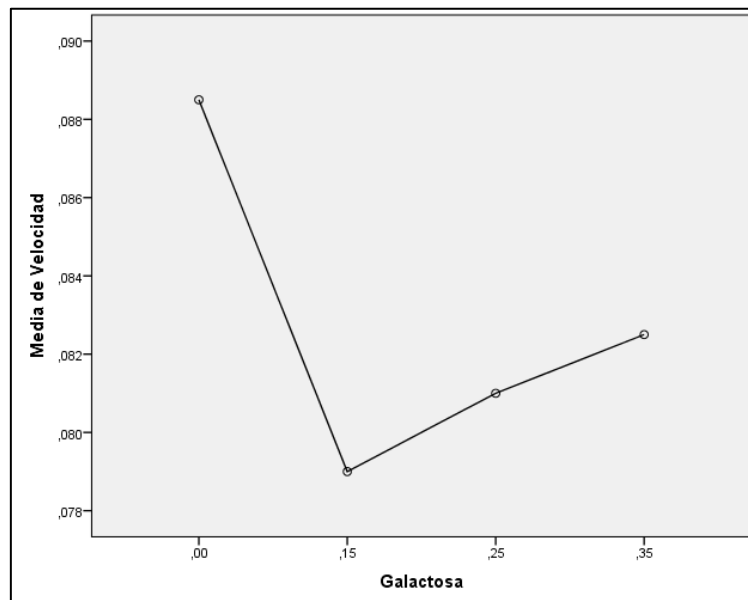
**Tabla 3.2.** ANOVA de un factor para velocidad de crecimiento en cultivos *Acidithiobacillus Thiooxidans*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,000	3	0,000	4,061	0,105
Intra-grupos	0,000	4	0,000		
Total	0,000	7			

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

**Elaborado por:** María Maldonado

En la Figura 3.4 se observa las medias de la velocidad de crecimiento microbiano en función de las diferentes concentraciones de galactosa, donde en el control se observa el mayor crecimiento celular que al ser comparado con las otras concentraciones se observa valores similares.



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

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

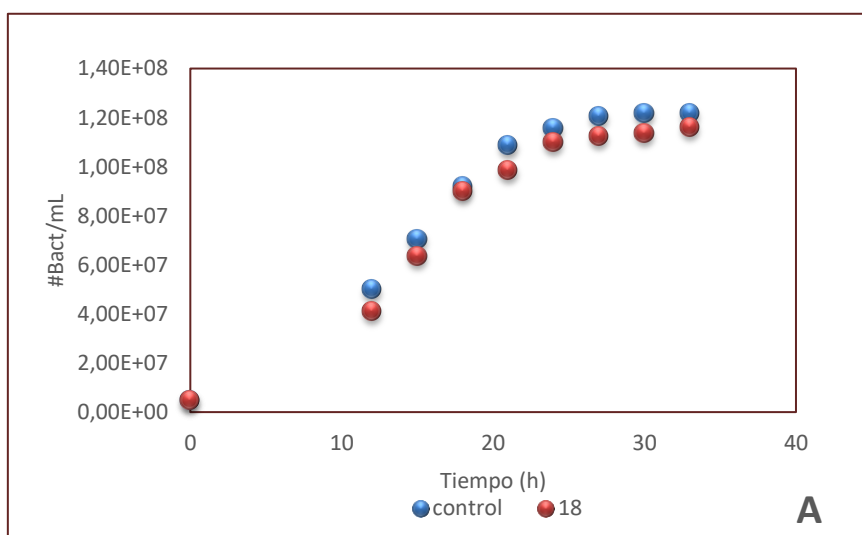
**Elaborado por:** María Maldonado

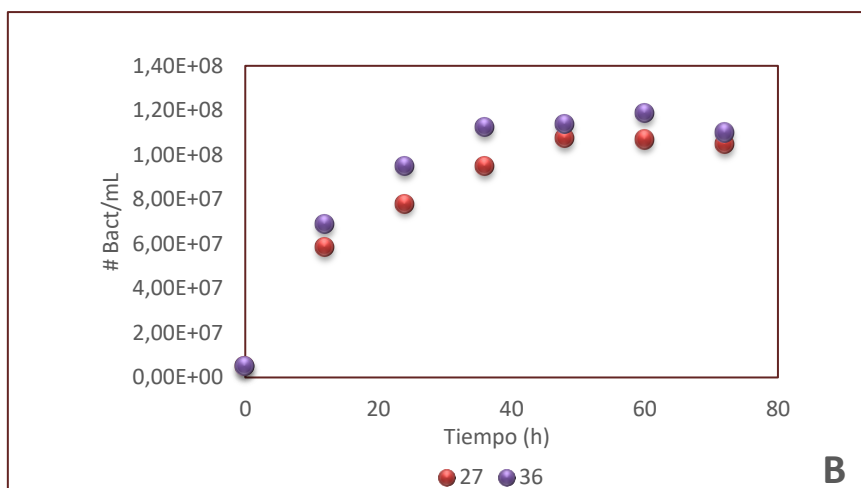
### 3.1.3 Cinéticas de crecimiento en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM. 2705<sup>T</sup> adaptadas a ion férrico como inductor.

A las muestras previamente adaptadas a concentraciones de 9 gr/l (control), 18, 27 y 36 g/L de hierro se les realizó las cinéticas de crecimiento, en donde se determinó la concentración de Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y Fe total, concentración celular y medición de pH.

En la figura 3.5 (A) y (B) se muestra la concentración celular (células/mL) en función del tiempo (h), para las concentraciones de hierro de: 9 (control), 18, 27 y 36 g/L, donde para las muestras de 9 y 18 g/L (figura 3.4 A) alcanzaron su máximo crecimiento a las 24 horas. Por otro en lado en la figura 3.4 B se presentan las cinéticas de crecimiento de 27 y 36 g/L los cuales alcanzaron su máximo crecimiento a las 48 horas, los valores obtenidos de concentración celular son mayores a los reportados por Escobar<sup>34</sup> quien obtuvo una concentración  $3 \times 10^7$  bact/mL en un tiempo de 7 días crecidos en medio MC a pH de 1.6

Las concentraciones celulares de los cultivos adaptados a las diferentes concentraciones de hierro son similares al control, sin embargo el tiempo de crecimiento es menor debido a las altas concentraciones de hierro que tiene que oxidar.





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

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

En la tabla 3.3 se muestra la velocidad de crecimiento microbiano  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) para cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* adaptados a concentraciones de 9 (control) ,18 , 27 y 36 g/L de hierro, la velocidad obtenida para el control es muy similar a la reportada por Karavaiko<sup>32</sup> quien obtuvo un valor de  $0.069 \text{ h}^{-1}$ . Debemos indicar que los valores de los cultivos adaptados a 18, 27 y 36 g/L son menores al control pero similares a los reportados por Sand<sup>35</sup> bajo las mismas condiciones del ensayo pH 1.3 y 30°C.

**Tabla 3.3.** Velocidad máxima de crecimiento microbiano ( $\mu$ ) y  $R^2$  de *L. ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> a concentraciones de hierro de 9 (control), 18, 27 y 36 g/L a pH 1.3 y 30°C.

Concentración de hierro g/L	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$R^2$
Control	0.072	0.98
18	0.031	0.98
27	0.02	0.98
36	0.012	0.99

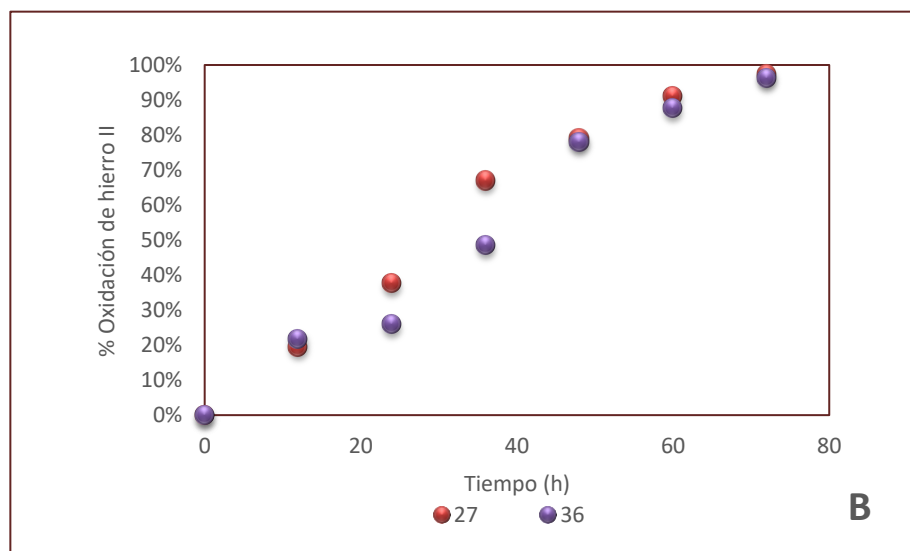
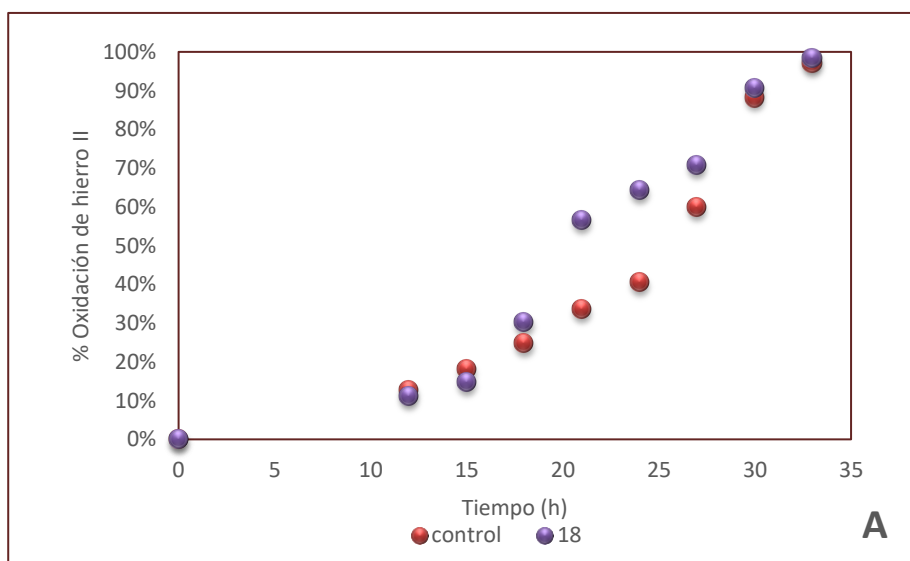
**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

En la Figura 3.6 (A) y (B) se observa el porcentaje de oxidación de hierro II en función del tiempo (h) para cultivos *Leptospirillum ferrooxidans* adaptados a concentraciones de hierro de 9 (control), 18, 27 y 36 g/ L. En la figura (A) se observa que en un tiempo de 33 horas se da una oxidación aproximada al 100% para los cultivos de 9 y 18 g/L,

mientras que en la figura (B) tenemos que los mayores porcentajes de oxidación se dan en un tiempo de 72 horas para cultivos adaptados a 27 y 36 g/L.

El menor tiempo de oxidación se da en los cultivos de 9 y 18 g/L de  $\text{Fe}^{+3}$  (figura 3.6 (A)), esto se debe a que los microorganismos se encuentran en presencia de concentraciones bajas de hierro, lo que facilita la oxidación del sustrato, a diferencia de los cultivos mostrados en la figura (B) que logran su oxidación en periodos más elevados que los antes mencionados.

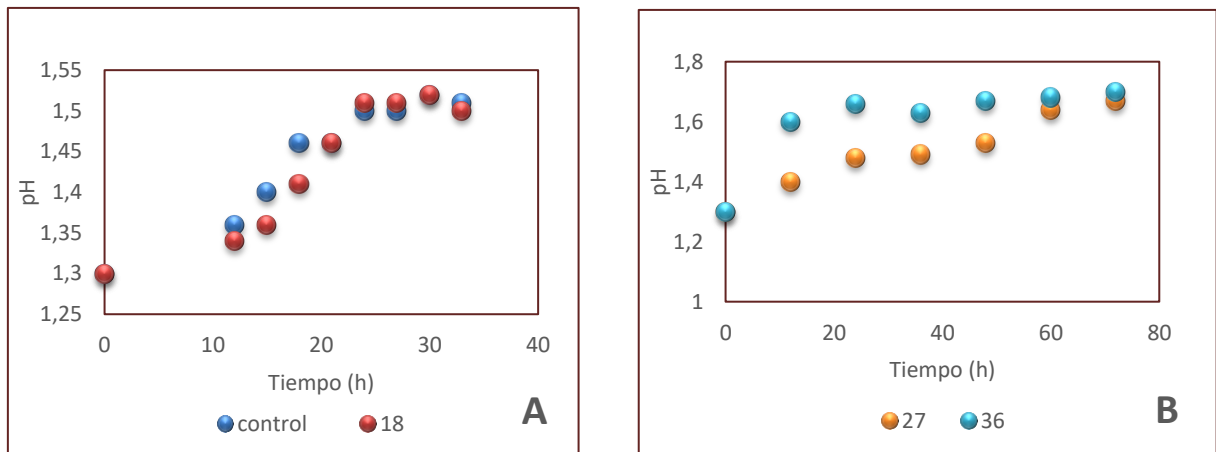


**Figura 3.6.** Porcentaje de oxidación de hierro II (%) *L.ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> a concentraciones de hierro de 9, 18 (A), 27 y 36 g/L (B) a pH 1.8 y 30°C.

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

En la figura 3.7 A y B se muestra 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, donde hasta las 24 horas se observa un incremento y luego se mantiene en valores constantes, como indica Rossi<sup>16a</sup> la variación del pH se debe a que los microorganismos requieren de protones la oxidación del ion ferroso, luego de cierto tiempo el pH se mantiene constante debido a la producción de ácido sulfúrico por parte de los microorganismos<sup>36</sup>



**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:** María Maldonado

### 3.1.4. Análisis estadístico de la velocidad de crecimiento microbiano en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup>.

En la tabla 3.4 se analizó la concentración de hierro con respecto a la velocidad de crecimiento microbiano, donde se observa que el valor P es menor a 0.05 por lo que la concentración de hierro si afecta en el crecimiento microbiano.

**Tabla 3.4.** ANOVA de un factor para velocidad de crecimiento en cultivos *Leptodpirillum ferrooxidans*

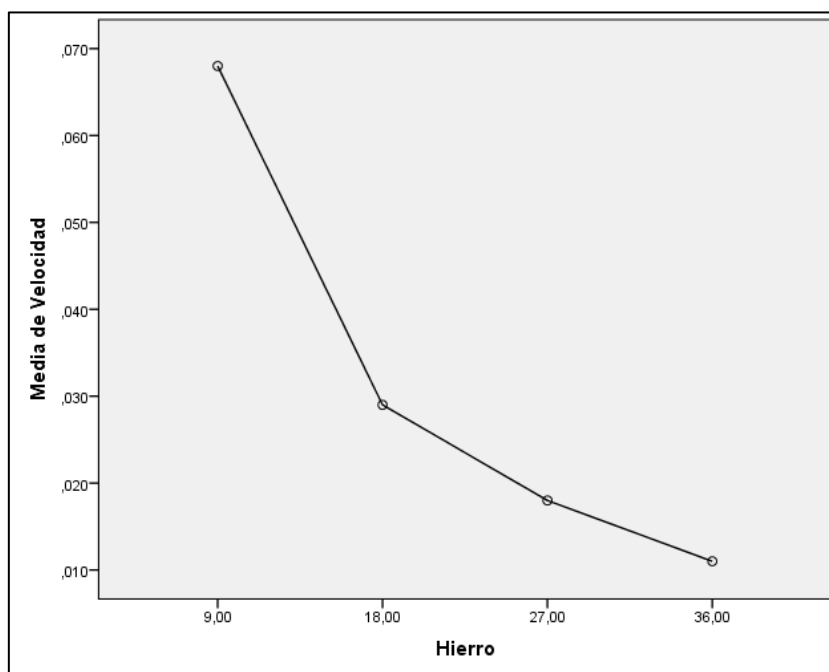
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,004	3	0,001	103,000	,000
Intra-grupos	0,000	4	0,000		
Total	0,004	7			

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

**Elaborado por:** María Maldonado



En la Figura 3.8 se muestra la comparación de medias de la velocidad de crecimiento celular en función de las concentraciones de hierro, donde se observa que a una concentración de 9g/L de hierro se da el mayor crecimiento celular, por otro lado las velocidades obtenidas en los cultivos adaptados a las concentraciones de 18, 27 y 36 g/L disminuye, indicando así que el hierro a altas concentraciones influye en la concentración celular.



**Figura3.8.** Comparación de medias para la velocidad máxima de crecimiento en cultivos de *L. ferrooxidans*.

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

**Elaborado por:** María Maldonado

### 3.2. Extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS).

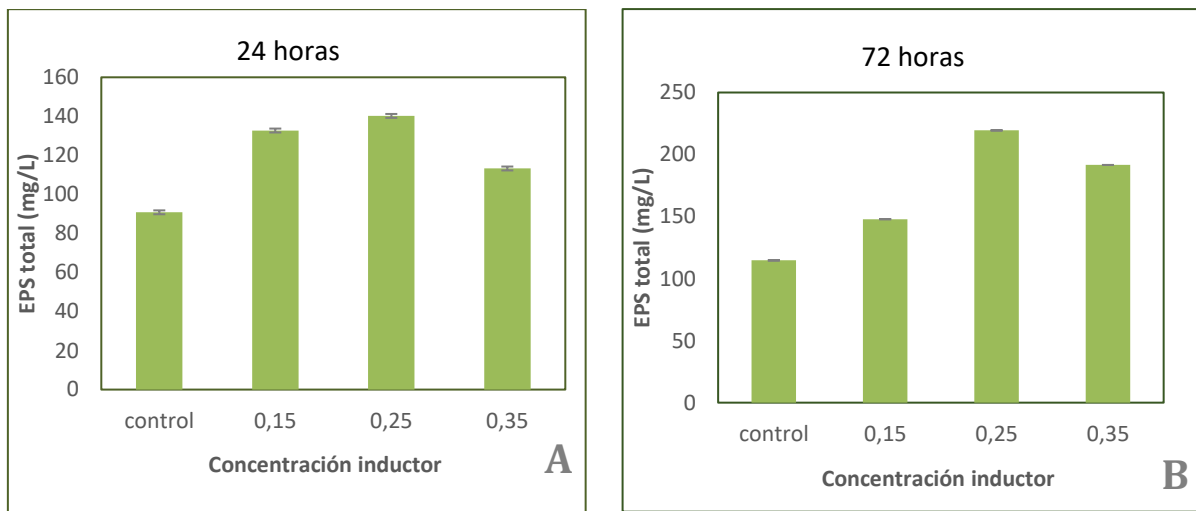
La extracción de sustancias poliméricas extracelulares se realizó mediante el método de adsorción en resina de intercambio iónico DOWEX, el cual se cuantificó mediante la medición de carbohidratos y proteínas, en el tiempo de crecimiento máximo microbiano, 72 y 96 horas. Para *Acidithiobacillus thiooxidans* el tiempo de crecimiento máximo se determinó a las 24 horas para todos los cultivos, mientras que para *Leptospirillum ferrooxidans* fueron 24 horas para las concentraciones de 9 y 18 g/L de hierro y de 48 horas para las concentraciones de 27 y 36 g/L de hierro.

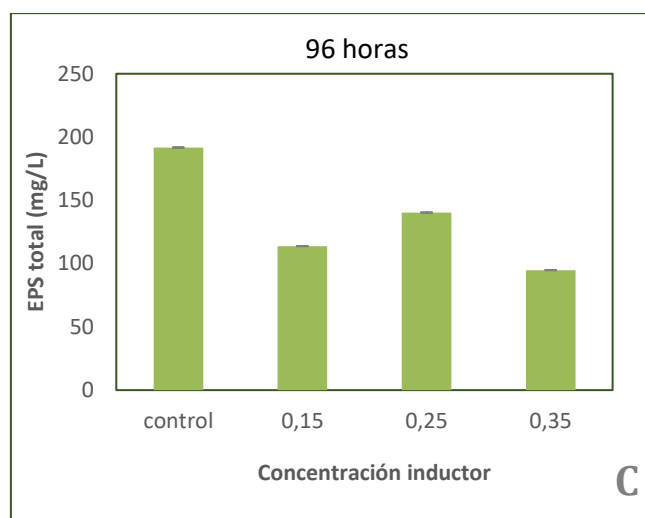
### 3.2.1 Extracción de EPS en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> adaptadas a galactosa.

La extracción de EPS se realizó en los tiempos de 24, 72 y 96 horas, en el control sin galactosa y a concentraciones de galactosa de 0.15, 0.25 y 0.35%, con el fin de comparar la producción de dichas sustancias en cada uno.

En la figura 3.9 A, B y C se muestra la producción de EPS total en mg/L a las diferentes concentraciones de galactosa (0, 0.15, 0.25 y 0.35%) en los tiempos de 24, 72 y 96 horas crecimiento respectivamente, en la figura 3.9 A y B se observa que la mejor producción de EPS se dio a una concentración de 0.25% de galactosa siendo a 72 horas donde se obtuvo mayor cantidad con un valor de 219.46 mg/L

Por otro lado en la figura 3.9 C la producción de EPS disminuye por lo que se podría decir que a un tiempo de 96 horas los microorganismos entran en una etapa de declive y no producen las mismas cantidades de EPS<sup>19</sup>.





**Fig. 3.9** Producción de EPS total (mg/L), en cultivos de *A. thiooxidans* DSM.14887<sup>T</sup> a concentraciones de 0.15, 0.25, 0.35 % de galactosa y un blanco a un pH = 1.8 y 30°C de temperatura a tiempo de crecimiento máximo microbiano (A), 72 (B) y 96 (C) horas.

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

### 3.2.2. Análisis estadístico para producción de EPS en cultivos *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> adaptados a galactosa en diferentes tiempo de crecimiento microbiano.

Se aplicó un análisis ANOVA de dos factores con la finalidad de comparar los diferentes tiempos de crecimiento microbiano (24, 72 y 96 horas) y las concentraciones de galactosa (0, 0.15, 0.25 y 0.35 %), para conocer la influencia de estos sobre la producción del EPS.

En la tabla 3.3 se analizó la variable de tiempo y concentración de galactosa con respecto a la producción de EPS, donde se observa que el valor P es menor a 0.05 por lo que la diferencia estadística es significativa. El valor de F nos indica que la variable tiempo influye mayormente en la generación de exopolímeros con respecto a la concentración de galactosa.

**Tabla 3.3.** ANOVA de dos factores para producción de EPS en cultivos *Acidithiobacillus thiooxidans* a diferentes tiempos de crecimiento microbiano

Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	36540,050 <sup>a</sup>	11	3321,823	10,138	0,001
Intersección	474876,600	1	474876,600	1449,302	0,001
Tiempo	10338,432	2	5169,216	15,776	0,001
Galactosa	4981,632	3	1660,544	5,068	0,017
Tiempo * Galactosa	21219,986	6	3536,664	10,794	0,001
Error	3931,907	12	327,659		
Total	515348,557	24			
Total corregida	40471,957	23			

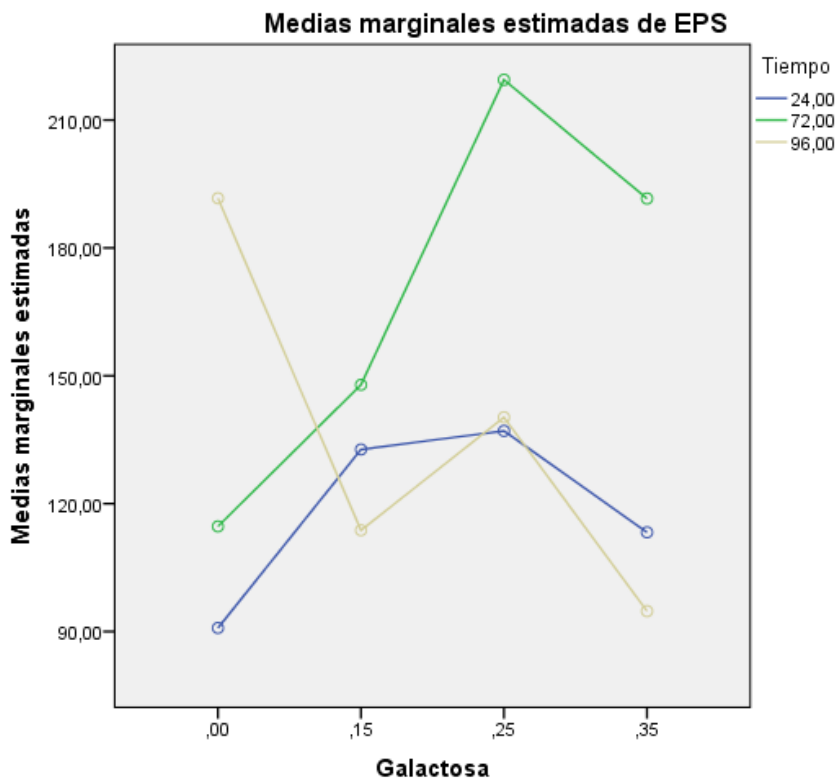
a. R cuadrado = 0,903 (R cuadrado corregida = 0,814)

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

**Elaborado por:** María Maldonado

En la figura 3.10 se observa la comparación de medias de los diferentes tiempos de crecimiento microbiano, donde se observa que la mayor producción de EPS se da en un tiempo de 72 horas a una concentración de 0.25% de galactosa, donde podemos decir que tanto el tiempo tiene mayor influencia que la concentración de galactosa en la producción de EPS

De acuerdo a la gráfica 3.10 y la tabla 3.3 los niveles de significancia son menores a 0.05 por lo que la hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa, que indica que la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) es diferente al tiempo de velocidad máxima de crecimiento con respecto a los tiempos de 72 y 96h.



**Figura 3.10. Comparación de medias de EPS en cultivos *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup> adaptadas a galactosa en diferentes tiempos de crecimiento microbiano.**

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

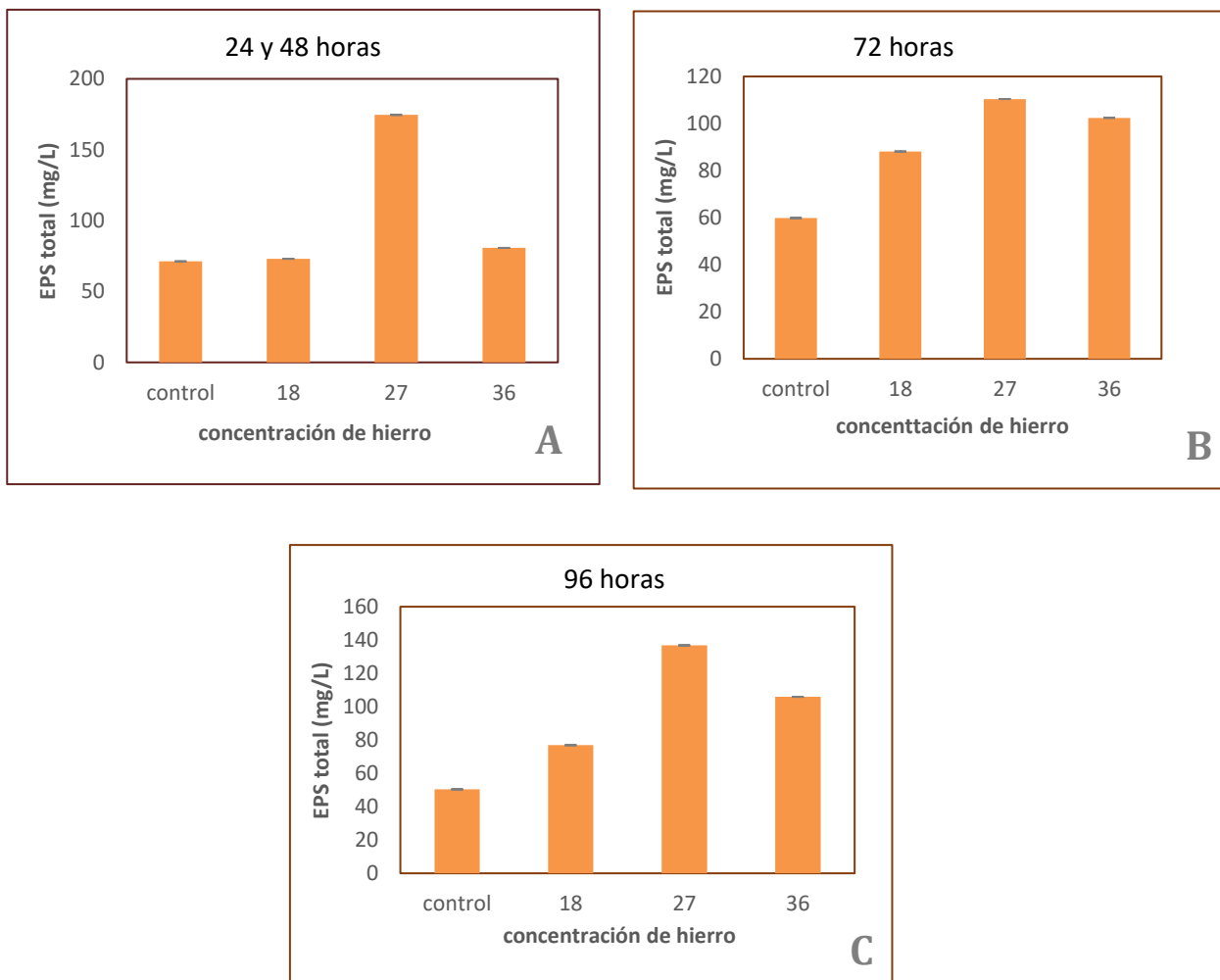
### **3.2.3. Extracción de EPS en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> adaptadas a ion férrico.**

La extracción de EPS en estos cultivos se realizó en 24, 72 y 96 horas para las concentraciones de hierro de 9 y 18 g/L, mientras que para las concentraciones de 27 y 36 g/L se realizó a 48, 72 y 96 horas.

En la figura 3.11 A, B y C Se observa la producción de EPS total en mg/L en función de la concentración de hierro a los diferentes tiempos establecidos. La mayor generación de EPS se da a una concentración de 27 g/L de hierro en un tiempo de 48 horas que corresponde al tiempo de crecimiento máximo de los microorganismos.

Por otro lado se puede verificar que la extracción de EPS a 96 horas es menor con respecto a las obtenidas en 24, 48 y 72 horas en todas las concentraciones de hierro

establecidas, esto se debería a la edad del cultivo como lo expone Tapia<sup>19</sup> en su trabajo donde en un tiempo de 72 horas obtuvo valores entre 388 - 776 mg/ g-PS, mientras que a un tiempo de 96 horas los resultados obtenidos fueron 293 - 337 mg/ g-PS por lo que los microorganismo entran en una etapa de declive por lo cual no se recomendaría realizar la extracción a esas horas de crecimiento.



**Fig.3.11.** EPS total (mg/L) en función de la concentración de hierro 9 (blanco), 18, 27 y 36, en cultivos de *L. ferrooxidans* a un pH = 1.3 y 30°C de temperatura a tiempo de crecimiento máximo microbiano (A), 72 (B) y 96 (C) horas

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

**3.2.4. Análisis estadístico para producción de EPS en cultivos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> adaptados a hierro en diferentes tiempo de crecimiento microbiano.**

Se aplicó un análisis ANOVA de dos factores con la finalidad de identificar el mejor tiempo de producción de EPS a diferentes concentraciones de hierro (9, 18, 27 y 36 g/L) y determinar el efecto de las variables tiempo y concentración de hierro.

En la tabla 3.4 se analizó las variables tiempo y concentración de hierro con respecto a la producción de EPS, donde se observa que el valor P es menor a 0.05 por lo que la diferencia estadística es significativa. El valor F nos indica que las concentraciones de hierro influyen mayormente en la producción de los exopolímeros con respecto al tiempo.

**Tabla 3.4.** ANOVA de dos factores para producción de EPS en cultivos *Leptospirillum ferrooxidans* a diferentes tiempos de crecimiento microbiano

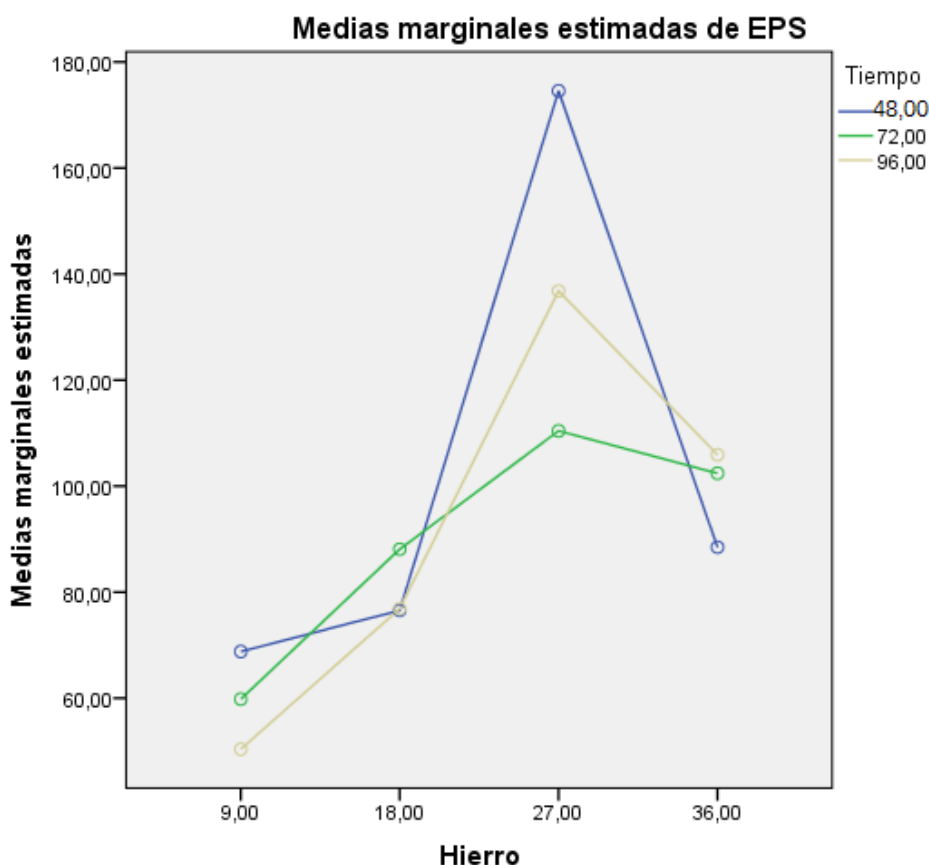
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	26323,802 <sup>a</sup>	11	2393,073	390,090	0,001
Intersección	216273,323	1	216273,323	35254,243	0,001
Tiempo	637,724	2	318,862	51,977	0,001
Hierro	21315,378	3	7105,126	1158,191	0,001
Tiempo * Hierro	4370,700	6	728,450	118,743	0,001
Error	73,616	12	6,135		
Total	242670,741	24			
Total corregida	26397,418	23			

a. R cuadrado = ,997 (R cuadrado corregida = ,995)

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

**Elaborado por:** María Maldonado

En la figura 3.12 se observa la comparación de medias de los diferentes tiempos establecidos, donde se muestra que la mayor producción de EPS se da en un tiempo de 48 horas a una concentración de 27 g/L de hierro.



**Figura 3.12. Comparación de medias de EPS en cultivos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> adaptadas a galactosa en diferentes tiempos de crecimiento microbiano.**

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

### **3.3. Caracterización química de EPS en cultivos de *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> y *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>.**

La extracción de sustancias poliméricas extracelulares se realizó en el tiempo de máximo crecimiento, 72 y 96 horas. Para *Acidithiobacillus thiooxidans* este fue de 24 horas para todos los cultivos, mientras que para *Leptospirillum ferrooxidans* fueron 24 horas para las concentraciones de 9 y 18 g/L de hierro y de 48 horas para las concentraciones de 27 y 36 g/L de hierro, donde se procedió a cuantificar proteínas y carbohidrato y así poder caracterizar el EPS.



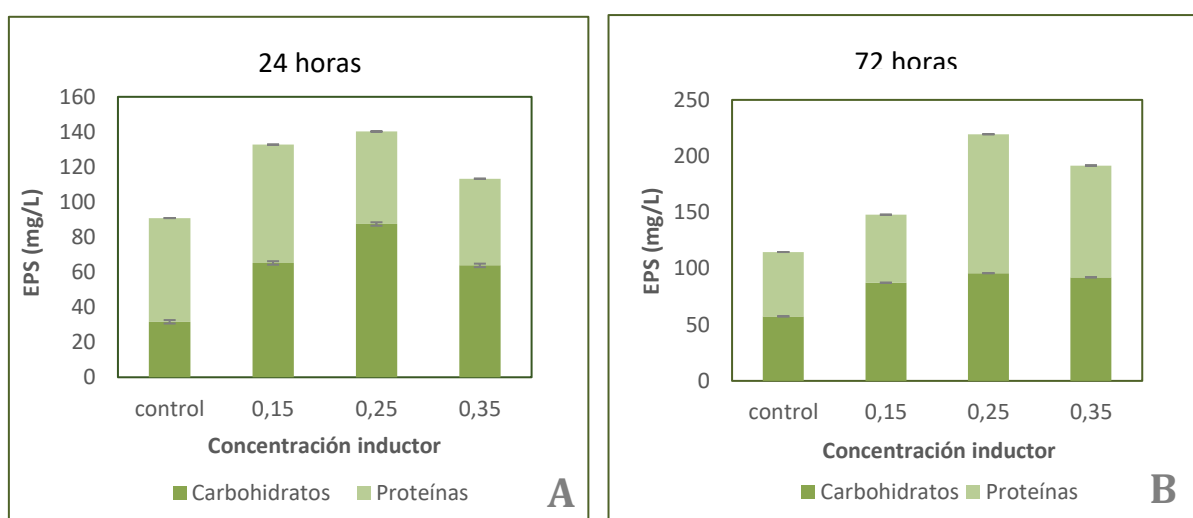
### 3.3.1 Caracterización química de EPS en cultivos *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 14887<sup>T</sup>.

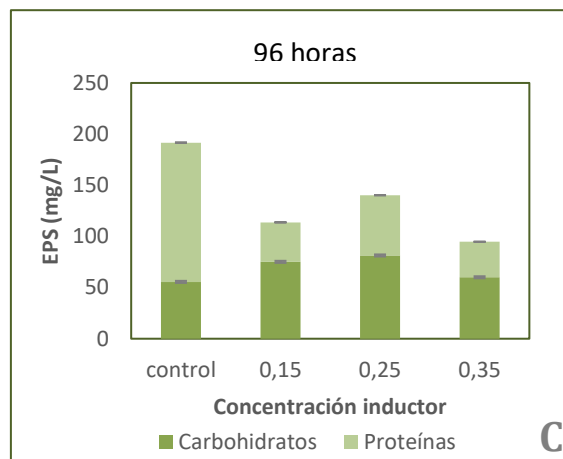
En la figura 3.13 A, B y C se observa la cantidad de carbohidratos y proteínas obtenidas que forman el EPS a los diferentes tiempos de crecimiento microbiano (24, 72 y 96 horas). Se puede verificar que la mayor concentración de los hidratos de carbono (95,84 mg/L) se obtuvo a las 72 horas con una concentración de 0.25 % de galactosa, esto concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en la producción total de EPS.

Por otro lado la mejor producción de proteína obtenida se dio en un tiempo de 72 horas a 0.25 % de galactosa como se verifica en la figura 3.13 B , esto se debe al estado de madurez en el que se encuentra el EPS<sup>37</sup>.

En la figura 3.13 A se muestra la cantidad de carbohidratos y proteínas obtenidas a las 24 horas de crecimiento en las diferentes concentraciones galactosa (control, 0.15, 0.25, 0.35 %), con respecto al caso de carbohidratos el mayor valor obtenido se dio a 0.25 % de galactosa, mientras que la más alta concentración de proteínas fue a 0.15 % de galactosa.

Con respecto a la concentración de carbohidratos y proteínas mostrados en la figura 3.13 C observamos que la mayor concentración de carbohidratos se obtuvo a 0,25 % de galactosa como en los casos anteriores, mientras que en las proteínas la mayor producción se dio en el control, una posible explicación a este fenómeno es que en el tiempo de 96 horas ya existe muerte celular lo que ocasiona ruptura de las células y por lo tanto la proteína aumenta<sup>19</sup>.





**Fig.3.13.** Producción de sustancias poliméricas extracelulares EPS (mg/L) en función de la concentración de carbohidratos y proteínas, en cultivos de *A. thiooxidans* a diferentes tiempos de crecimiento (A) crecimiento máximo microbiano, (B) 72 horas y (C) 96 horas, a un pH = 1.8 y 30°C de temperatura.

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

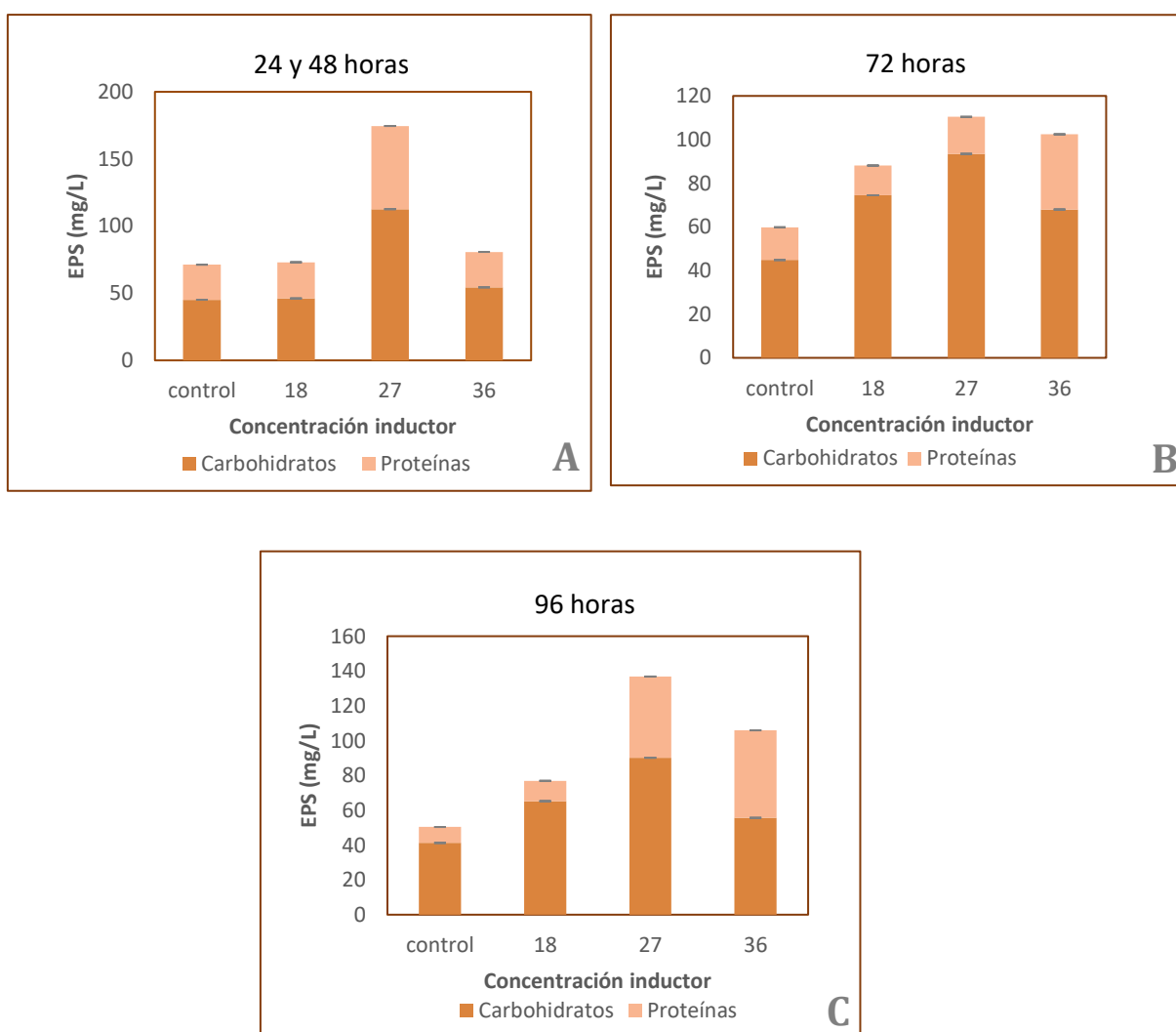
### 3.3.2. Caracterización química de EPS en cultivos *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup>.

En la figura 3.14 A, B y C se observa la producción de EPS en mg/L, en función de los carbohidratos y proteínas obtenidos a los diferentes tiempos de crecimiento microbiano.

En la figura 3.14 A se muestra la cantidad de carbohidratos y proteínas obtenidas en los tiempo de 24 y 48 horas a las diferentes concentraciones de hierro ( 9, 18, 27 y 36), donde a una concentración de 27 g/L de hierro se dio la mayor cantidad de carbohidratos y proteínas.

En la figura 3.14 B se observa que a una concentración de 27g/L de hierro, se obtuvo la mayor concentración de hidratos de carbono, mientras que la mayor cantidad de proteínas se dio en una concentración de 36 g/L de hierro, este hecho se repite en el tiempo de 96 horas como se muestra en la figura 3.14 C.

Finalmente se puede indicar que la mejor concentración de carbohidratos y proteínas se dio a una concentración de hierro de 27 g/L en un tiempo de 48 horas, que corresponde al máximo crecimiento del microorganismo; en los tiempos de 72 y 96 horas la producción de EPS disminuye posiblemente a la rápida muerte celular que tiene *L. ferrooxidans*<sup>38</sup>.



**Fig.3.14.** Producción de sustancias poliméricas extracelulares EPS (mg/L) en función de la concentración de carbohidratos y proteínas, en cultivos de *L. ferrooxidans* a diferentes tiempos de crecimiento (A) crecimiento microbiano, (B) 72 horas y (C) 96 horas, a un pH = 1.8 y 30°C de temperatura.

**Fuente:** El autor

**Elaborado por:** María Maldonado

## CONCLUSIONES

A partir de las cinéticas de crecimiento para los cultivos *A. thiooxidans* se estableció que el máximo crecimiento fue de 24 horas para todas las concentraciones de galactosa, mientras que para los cultivos *L. ferrooxidans* para una concentración de 9 y 18 g/L se estableció un tiempo de 24 horas y para las concentraciones de 27 y 36 g/L un periodo de 48 horas para alcanzar la fase exponencial de los microorganismos

Se determinó que el mejor tiempo de producción de EPS para los cultivos *A. thiooxidans* se dio en un periodo de 72 horas a una concentración de galactosa de 0.25%; de la misma manera para el cultivo *L. ferrooxidans* se determinó que el mejor tiempo de producción de EPS se dio en un tiempo de 48 horas a una concentración de 27 g/L de hierro.

Para el caso de *A. thiooxidans* la mayor concentración de carbohidratos y proteínas se dio en un tiempo de 24 horas a una concentración de 0.25 % de galactosa, por otro lado para el caso de *L. ferrooxidans* los mejores valores obtenidos tanto para carbohidratos y proteínas se dio en un periodo de 48 horas a una concentración de 27 g/L de hierro.

El tiempo afecta la producción de EPS en los cultivos microbianos *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* por lo tanto la hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alternativa.

## RECOMENDACIONES

Se debe realizar ensayos de biooxidación con el mejor tiempo de producción de EPS, con la finalidad de comprobar si este proceso se llevaría a cabo en menor tiempo.

Realizar estudios de adherencia para comprobar si la cantidad de EPS tiene influencia en la adherencia del microorganismo al mineral

Se debe acortar el tiempo de extracción de EPS entre el tiempo de máximo crecimiento y 72 horas con la finalidad de obtener mayor producción de exopolímero.

Caracterizar más ampliamente el contenido de EPS para ver si existe presencia de azúcares, metales como el hierro y galactosa

Cuantificar el consumo de galactosa que es necesario para la producción de EPS.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rawlings, D. E.; Johnson, D. B., The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* **2007**, *153* (2), 315-324.
2. Asmah, R.; Clement, C.; Bosompem, K.; Wilson, M.; Brown, C.; Osei, Y.; Addy, M., Molecular characterization of mineral leaching bacteria from a gold mine in Ghana using PCR and RFLP. *PROCESS METALLURGY* **2001**, *11*, 317-324.
3. Quintana, M.; Ly, M.; Bauer, J.; Espinoza, M.; Montoya, Y.; Espinoza, J., 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. **2005**.
4. Ospina, J. D.; Mejía Restrepo, E.; Osorno Bedoya, L.; Márquez, M. A.; Morales, A. L., Biooxidación de concentrados de arsenopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en erlenmeyer agitados. *Revista Colombiana de Biotecnología* **2012**, *14* (1).
5. Sand, W.; Gehrke, T., Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* **2006**, *157* (1), 49-56.
6. Alvear, N. G.; Freire, V. V., Biooxidación de concentrados refractarios de oro con alto contenido de arsénico. *Afinidad* **2015**, *72* (572).
7. Giaveno, A.; Lavalle, L.; Donati, E., Uso de biorreactores para la lixiviación de un mineral oxidado. *Jornadas SAM* **2000**, 23-30.
8. Donati, E., Tecnologías más limpias en minería: biominería.
9. Cabezas Alvarez, C. V., Modelación de Biopelículas de Microorganismos para Lixiviación de Minerales. **2011**.
10. Semenza, M.; Curutchet, G.; Viera, M.; Donati, E., Importancia de *Thiobacillus caldus* en la lixiviación de sulfuros metálicos. *Jornadas SAM 2000–IV Coloquio Latinoamericano de Fractura y Fatiga* **2000**, 1-6.
11. Daoud, J.; Karamanev, D., Formation of jarosite during Fe 2+ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering* **2006**, *19* (9), 960-967.
12. Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R. J.; Tettelin, H.; Blake, R.; Eisen, J. A.; Holmes, D. S., *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC genomics* **2008**, *9* (1), 597.

13. López, T.; Dominguez, L.; García, J. In *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, 2007.
14. Rossi, G., *Biohydrometallurgy* Mc Graw-Hill Book Company GmbH. Hamburg: 1990.
15. Rodríguez, Y.; Ballester, A.; Blázquez, M.; González, F.; Muñoz, J., Mecanismo de biolixiviación de sulfuros metálicos. *Revista de metalurgia* **2001**, 37 (6), 665-672.
16. (a) Rossi, G., *Biohydrometallurgy*. McGraw-Hill: 1990; (b) Jaramillo, K. I.; Ch, P. I. A., Efecto del tiempo de residencia sobre la biooxidación de un mineral aurífero refractario. *Maskana* **2016**, 157-163.
17. Arias, V.; Lovera, D.; Diego, J.; Gil, J.; Ramírez, L.; Cayo, H., Biooxidación de tiosulfato como mecanismo indirecto para la lixiviación de minerales mediante cepas nativas acidófilas. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica* **2016**, 18 (35).
18. Sand, W.; Gehrke, T.; Jozsa, P.-G.; Schippers, A., (Bio) chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* **2001**, 59 (2), 159-175.
19. Quezada, J. M. T., Fenómenos de interacción químico-biológicos del hierro en nuevos sistemas de generación de energía. **2010**.
20. Flemming, H.-C.; Neu, T. R.; Wozniak, D. J., The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of bacteriology* **2007**, 189 (22), 7945-7947.
21. Castro Ruiz, L., Biorreducción del hierro: desarrollo de alternativas medioambientalmente limpias para la obtención del metal. **2014**.
22. Sheng, G.-P.; Yu, H.-Q.; Li, X.-Y., Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology advances* **2010**, 28 (6), 882-894.
23. Gómez, J. A. M., *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros "Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger"*. Editorial de la Universidad de Granada: 2006.
24. Harneit, K.; Göksel, A.; Kock, D.; Klock, J.-H.; Gehrke, T.; Sand, W., Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **2006**, 83 (1), 245-254.
25. Flores, M.; Karina, S., Caracterización del regulón quorum sensing en la bacteria biolixivante *Acidithiobacillus ferrooxidans*. **2015**.

26. Herrera, L.; Ruiz, P.; Aguillon, J. C.; Fehrmann, A., A new spectrophotometric method for the determination of ferrous iron in the presence of ferric iron. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **1989**, *44* (3), 171-181.
27. González, R. Biooxidación de un mineral concentrado refractario de oro en sistema continuo. Tesis de Maestría en ciencias de la ingeniería con mención en ingeniería en bioquímica, Universidad católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile, 1999.
28. Bellenberg, S.; Díaz, M.; Noël, N.; Sand, W.; Poetsch, A.; Guiliani, N.; Vera, M., Biofilm formation, communication and interactions of leaching bacteria during colonization of pyrite and sulfur surfaces. *Research in microbiology* **2014**, *165* (9), 773-781.
29. DuBois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. t.; Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* **1956**, *28* (3), 350-356.
30. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **1976**, *72* (1-2), 248-254.
31. Jensen, A. B.; Webb, C., Ferrous sulphate oxidation using Thiobacillus ferrooxidans: a review. *Process Biochemistry* **1995**, *30* (3), 225-236.
32. Karavaiko, G.; Dubinina, G.; Kondrat'eva, T., Lithotrophic microorganisms of the oxidative cycles of sulfur and iron. *Microbiology* **2006**, *75* (5), 512-545.
33. Calle Castañeda, S. M. Evaluación de la acidulación de roca fosfórica empleando la bacteria acidófila *Acidithiobacillus thiooxidans*. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
34. Escobar, B.; Godoy, I., Determination of sulfur and iron oxidation bacteria by the most probable number (MPN) technique. *Process Metallurgy* **1999**, *9*, 681-687.
35. Sand, W.; Rohde, K.; Sobotke, B.; Zenneck, C., Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Applied and Environmental Microbiology* **1992**, *58* (1), 85-92.
36. Jimenez, H. V. I. Aislamiento y caracterización molecular de bacterias acidófilas nativas del sector minero Tundayme perteneciente a la provincia de Zamora Chinchipe. Investigación, Universidad Técnica Particular de Loja, 2016.
37. Lasa, I.; Del Pozo, J.; Penades, J. R.; Leiva, J. In *Biofilms bacterianos e infección*, Anales del Sistema Sanitario de Navarra, SciELO Espana: 2005; pp 163-175.
38. Dempers, C. J. N. An investigation into the use of batch experiments in the determination of the kinetics of ferrous-iron oxidation by *Leptospirillum ferrooxidans*. University of Cape Town, 2000.



## **ANEXOS**

## ANEXO 1.- CONTEO CELULAR

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

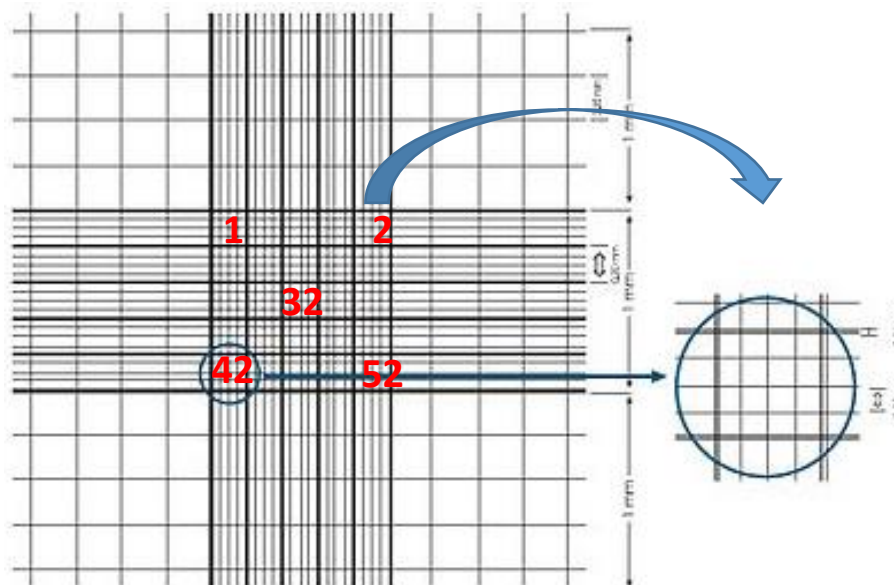


Figura 1.1. Cámara Neubauer

Fuente: El autor

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

$$\text{concentración} \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{número de células} * 10000}{FD * \text{Area} * \text{Profundidad}}$$

Donde:

Área = 0.04mm<sup>2</sup>

Profundidad = 0.02mm

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

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

**METODO IÓN FERROSO**

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

**METODO HIERRO TOTAL**

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

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

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

#### **PROCEDIMIENTO:**

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

#### **ANEXO 4. PESO SECO**

- Se tomaron 30 mL, de la muestra de cultivo en capsulas de porcelana previamente pesados
- Posteriormente se llevaron a una estufa, a una temperatura de 105°C Por un tiempo de 3 horas
- Pasado ese tiempo, se pesa y sacamos los valores promedios de cada muestra.

## ANEXO 5. DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

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 <sub>2</sub> O destilada (uL)	1000	975	950	900	850	800	750
Mg/L Glucosa	0	10	20	40	60	80	100

## ANEXO 6. 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.

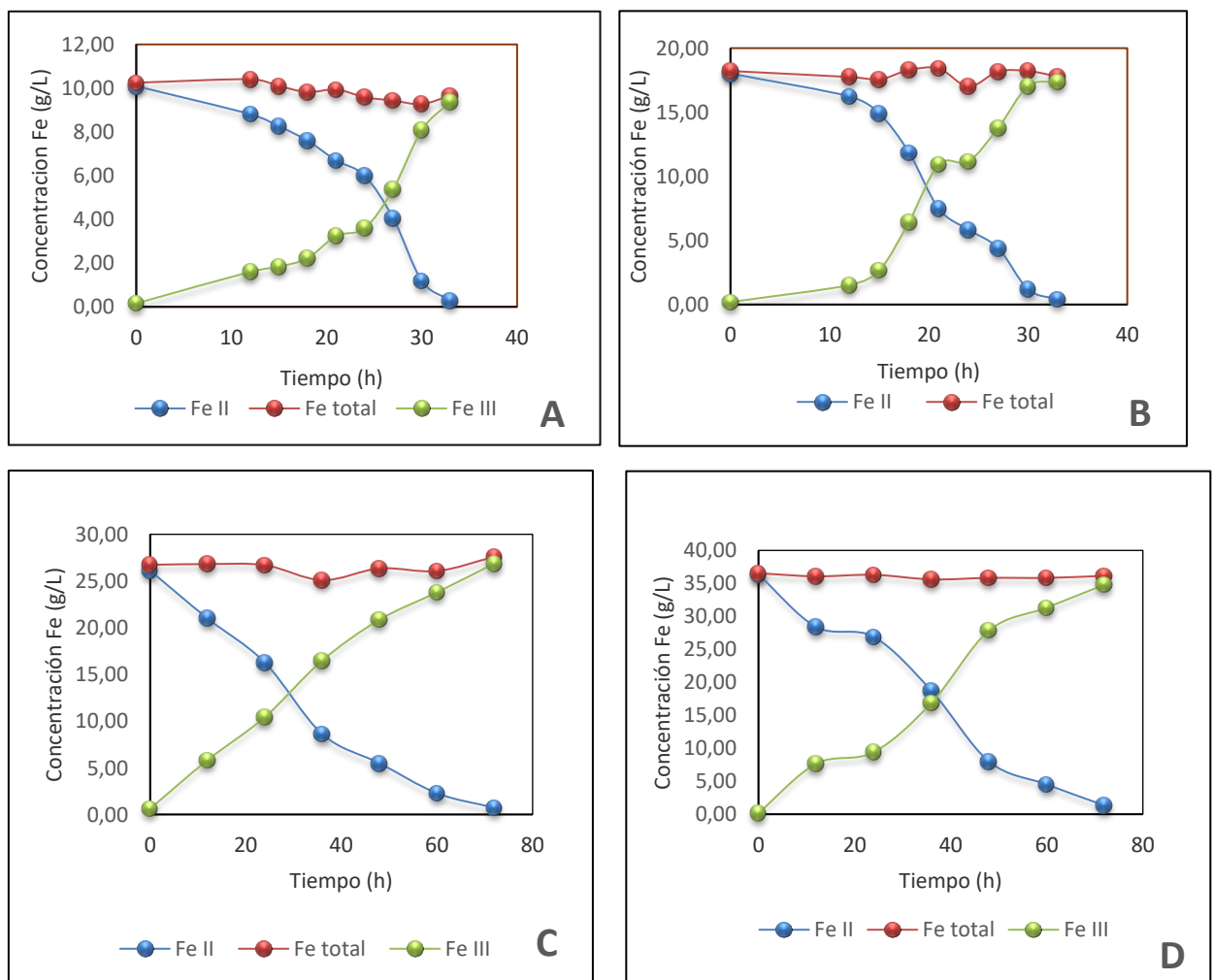
A continuación se elaboró la curva de calibrado, la cual se encuentra especificada en la siguiente tabla:

**Tabla 5.1.** Curva de calibrado para medición de proteínas.

<b>mg/L CONCENTRACIÓN + ESTÁNDAR (µL)</b>	<b>SOLUCIÓN DE BSA 1000 + MG/L (µL)</b>	<b>H<sub>2</sub>O DEST. SOLUCIÓN + BUFFER (µL)</b>	<b>REACTIVO BRADFORD (mL)</b>
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 7. CONCENTRACIÓN DE HIERRO II, HIERRO III Y HIERRO TOTAL (MG/L) EN CULTIVOS DE *L. FERROOXIDANS* DSM 2705<sup>T</sup> A CONCENTRACIONES DE HIERRO DE 9 (A), 18 (B), 27 (C) Y 36 G/L (D) A PH 1.8 Y 30°C.**

Concentración de hierro II, hierro III y hierro total en función del tiempo (h) para cultivos de *L. ferrooxidans* adaptados a concentraciones de hierro de 9, 18 (A), 27 y 36 g/L (B), donde podemos observar que las concentraciones de Fe<sup>3+</sup> va aumentando en comparación con la de Fe<sup>2+</sup> la cual va disminuyendo, donde es evidente la oxidación biológica de Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup>.



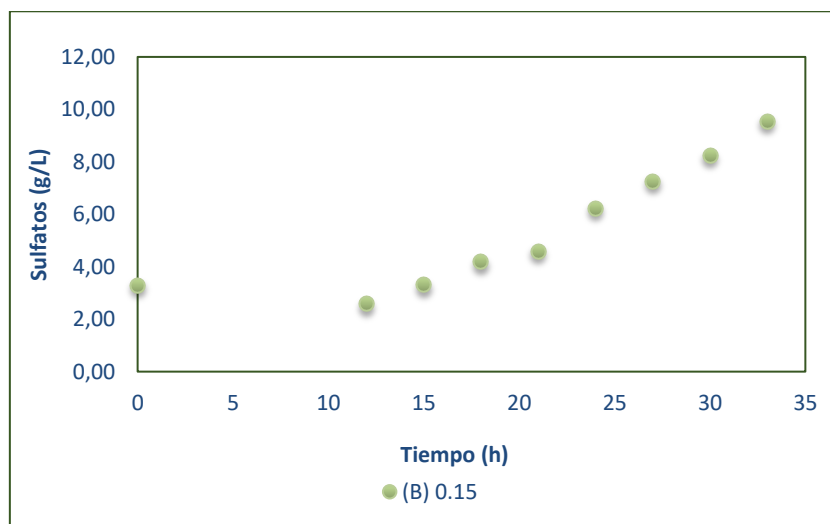
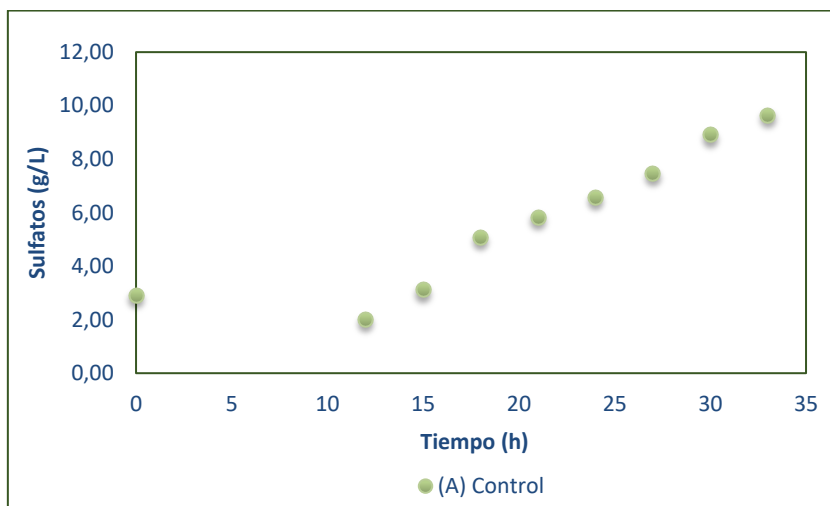
**Figura.6.1.** Concentración de hierro II, hierro III y hierro total (g/L) en cultivos de *L. ferrooxidans* DSM 2705<sup>T</sup> a concentraciones de hierro de 9 (A), 18 (B), 27 (C) y 36 g/L (D) a pH 1.8 y 30°C.

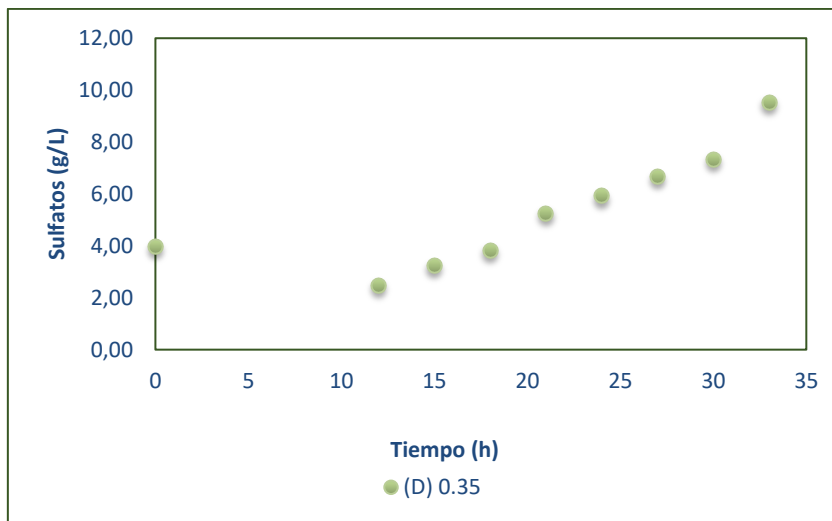
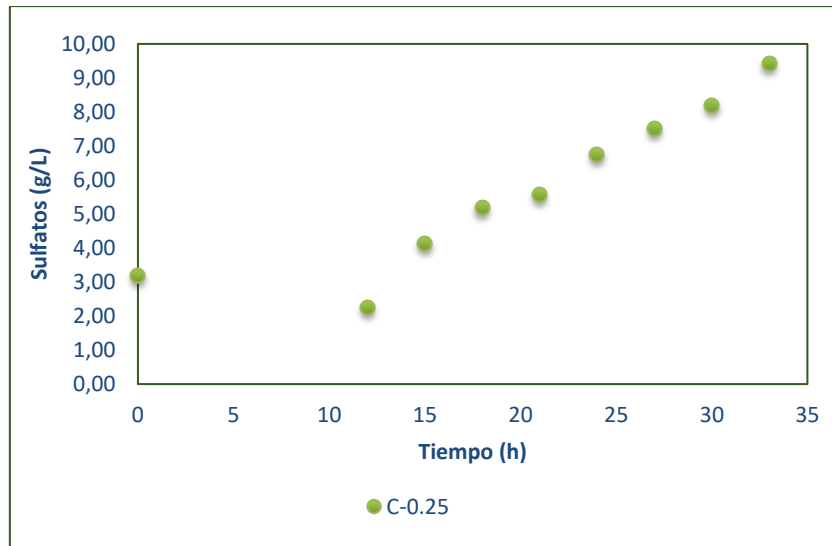
**Elaborado por:** María Maldonado



**Anexo 8. 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:** María Maldonado

## Anexo 9. ANÁLISIS POST-HOC DE TUKEY

En la tabla 8.1 nos indica las diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de galactosa las cuales son (0, 0.15, 0.25, 0.35)

**Tabla 8.1.** Análisis post-hoc de Tukey velocidad de crecimiento en cultivos *Acidithiobacillus thiooxidans* a diferentes concentraciones de galactosa

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Velocidad

HSD de Tukey

(I) Galactosa	(J) Galactosa	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	,15	,009500	,002872	,094	-,00219	,02119
,00	,25	,007500	,002872	,179	-,00419	,01919
	,35	,006000	,002872	,295	-,00569	,01769
	,00	-,009500	,002872	,094	-,02119	,00219
,15	,25	-,002000	,002872	,894	-,01369	,00969
	,35	-,003500	,002872	,649	-,01519	,00819
	,00	-,007500	,002872	,179	-,01919	,00419
,25	,15	,002000	,002872	,894	-,00969	,01369
	,35	-,001500	,002872	,949	-,01319	,01019
	,00	-,006000	,002872	,295	-,01769	,00569
,35	,15	,003500	,002872	,649	-,00819	,01519
	,25	,001500	,002872	,949	-,01019	,01319

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

**Elaborado por:** María Maldonado

En la tabla 8.2 nos indica las diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de hierro las cuales son (0, 18, 27 y 36)

**Tabla 8.2.** Análisis post-hoc de Tukey velocidad de crecimiento en cultivos *Leptospirillum ferrooxidans* a diferentes concentraciones de hierro.

(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	,039000*	,003536	,001	,02461	,05339
	27,00	,050000*	,003536	,001	,03561	,06439
	36,00	,057000*	,003536	,000	,04261	,07139
18,00	9,00	-,039000*	,003536	,001	-,05339	-,02461
	27,00	,011000	,003536	,000	-,00339	,02539
	36,00	,018000*	,003536	,024	,00361	,03239
27,00	9,00	-,050000*	,003536	,001	-,06439	-,03561
	18,00	-,011000	,003536	,000	-,02539	,00339
	36,00	,007000	,003536	,000	-,00739	,02139
36,00	9,00	-,057000*	,003536	,000	-,07139	-,04261
	18,00	-,018000*	,003536	,024	-,03239	-,00361
	27,00	-,007000	,003536	,000	-,02139	,00739

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: María Maldonado

**Tabla 8.3.** Análisis post-hoc de Tukey para producción de EPS en cultivos *Acidithiobacillus thiooxidans* a diferentes tiempos de crecimiento microbiano

(I)Tiempo	(J)Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
24,00	72,00	-49,9238*	9,05068	0,001	-74,0697	-25,7778
	96,00	-16,6450	9,05068	0,199	-40,7910	7,5010
72,00	24,00	49,9238*	9,05068	0,001	25,7778	74,0697
	96,00	33,2788*	9,05068	0,008	9,1328	57,4247
96,00	24,00	16,6450	9,05068	0,199	-7,5010	40,7910
	72,00	-33,2788*	9,05068	0,008	-57,4247	-9,1328

Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: María Maldonado

La tabla 8.4 nos indica las diferencias significativas entre los diferentes tiempos de crecimiento microbiano los cuales son ( $\mu$ , 72 y 96 horas), donde  $\mu$  y 72,  $\mu$  y 96, existe significancia ya que el valor es  $<0.05$

**Tabla 8.4.** Análisis post-hoc de Tukey para producción de EPS en cultivos *Leptospirillum ferrooxidans* a diferentes tiempos de crecimiento microbiano

(I)Tiempo	(J)Tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
24,00	72,00	11,9063*	1,23841	0,01	8,6023	15,2102
	96,00	9,5938*	1,23841	0,01	6,2898	12,8977
72,00	24,00	-11,9063*	1,23841	0,01	-15,2102	-8,6023
	96,00	-2,3125	1,23841	0,19	-5,6164	,9914
96,00	24,00	-9,5938*	1,23841	0,01	-12,8977	-6,2898
	72,00	2,3125	1,23841	0,19	-,9914	5,6164

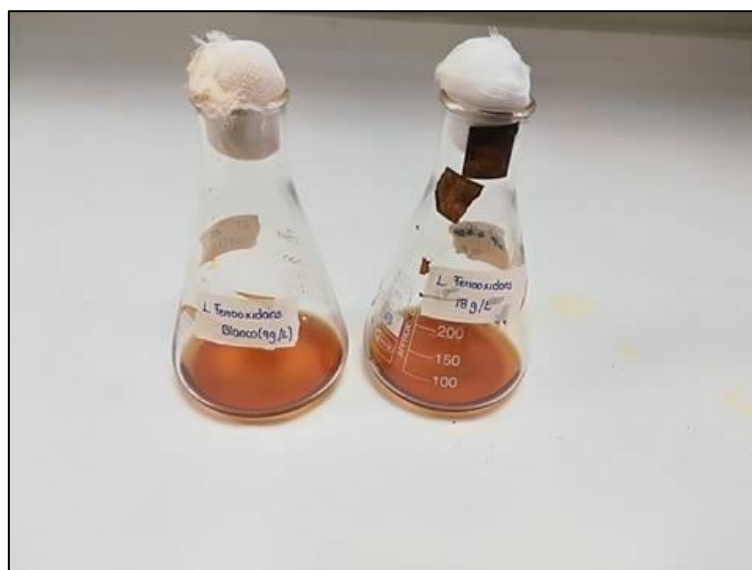
Fuente: Programa estadístico IBM SPSS Statistics 21

Elaborado por: María Maldonado

Anexo 10. FOTOS



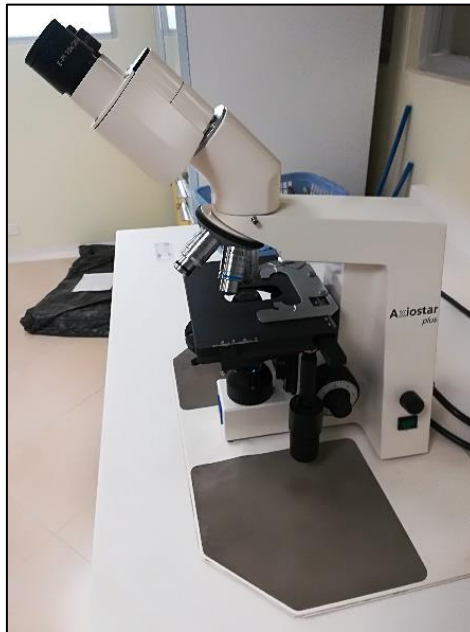
**Figura 9.1.** Cultivos *A. thiooxidans* adaptados a galactosa  
**Elaborado por:** María Maldonado



**Figura 9.2.** Cultivos *L. ferrooxidans* adaptados a hierro  
**Elaborado:** María Maldonado



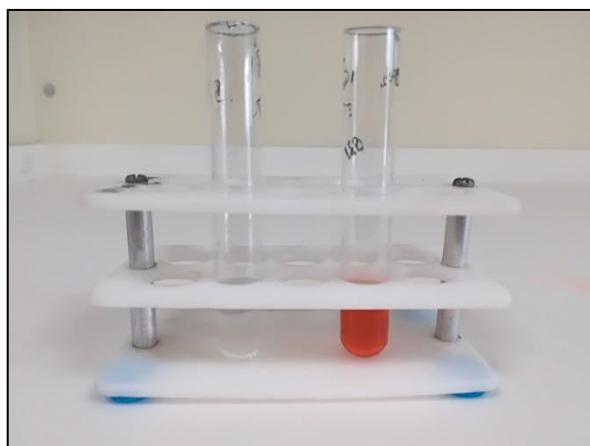
**Figura. 9.3.** Cámara de Petroff-Hausser  
**Elaborado por:** María Maldonado



**Figura 9.4.** Microscopio para recuento de bacterias  
**Elaborado por:** María Maldonado



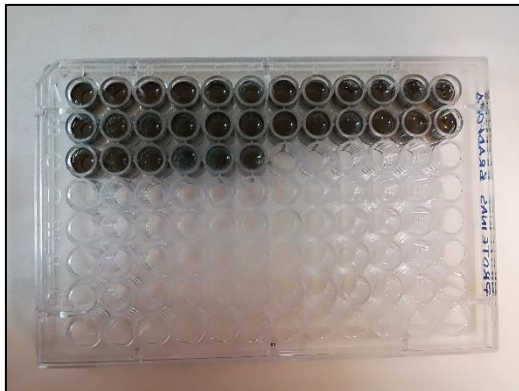
**Figura. 9.5.** Determinación de pH  
**Elaborado por:** María Maldonado



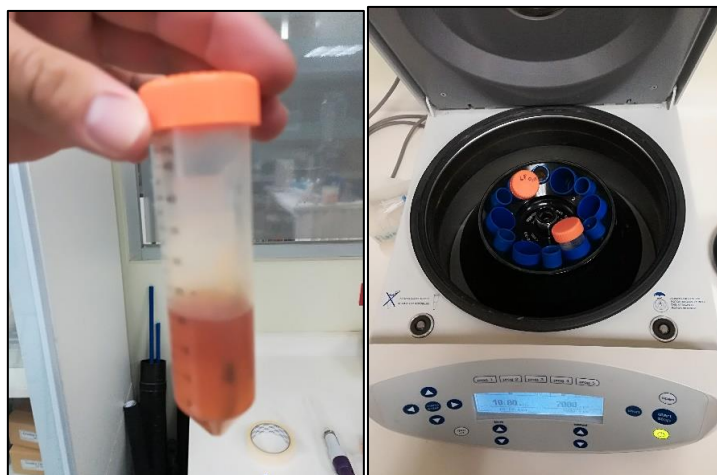
**Figura. 9.6.** Determinación de Hierros  
**Elaborado por:** María Maldonado



**Figura 9.7.** Determinación de sulfatos  
**Elaborado por:** María Maldonado



**Figura 9.8.** Determinación de proteínas por el método de Bradford  
**Elaborado por:** María Maldonado



**Figura 9.9.** Extracción de EPS  
**Elaborado por:** María Maldonado