

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Aislamiento y determinación de bacterias
biooxidantes del género *Acidithiobacillus* y
Leptospirillum presentes en las aguas residuales de las
unidades mineras de Recuay – Huaraz”**

Tesis para optar al Título Profesional de Licenciada en Biología

Nidia María Pérez Effio

Lima, Perú

2016

DEDICATORIA

Esta investigación es fruto de mucho trabajo, tenacidad y persistencia por lo que está dedicado a mi mami Sarita, la mujer más fuerte y obstinada que he conocido, por su ejemplo de trabajo constante que guía cada uno de mis pasos.

A cada una de las personas que me apoyaron durante el proceso de elaboración, durante las crisis y los momentos cuando pensé desistir.

AGRADECIMIENTOS

Gracias papá por apoyarme y aconsejarme, porque siempre crees en mí y confías en mis decisiones.

Gracias mamá porque a tu estilo particular, crees que todo lo puedo lograr y que no hay meta que me ponga que yo no pueda alcanzar.

Gracias a mis amigas de siempre: Cinthya y Gaby por darme ánimos en todo momento. Gracias Amy, sin tu ayuda nunca hubiera podido terminar de hacer esta tesis, nunca podré agradecerte lo suficiente amiga. Mili gracias por tu guía, tu ayuda y tu paciencia sin ellas no hubiera podido lograrlo.

La frase la persona se hizo sola no existe, carece de veracidad. Todos estamos hechos por otras miles de personas. Cada ser que hizo algo bueno por nosotros, o nos dijo alguna palabra de aliento o aprobación, influyo en nuestra personalidad y nuestros hechos. Es por eso que se vuelven parte de cualquier éxito nuestro (George Matthew Adams).

Por eso gracias a todas las personas que estuvieron conmigo este año en el laboratorio porque me hicieron sentir acompañada, por escucharme y por dejarme conocerlos.

INDICE

INDICE	4
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	6
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Planteamiento del problema.....	12
1.2. Formulación del problema	13
1.3. Justificación de la investigación	13
1.4. Objetivo General.....	13
1.5. Objetivos Específicos	14
2. MARCO TEORICO.....	15
2.1. Biolixiviación.....	15
2.2. Mecanismos de biolixiviación	15
2.3. Drenaje ácido de la minería (DAM)	16
2.4. Bacterias biolixiviantes, biooxidantes o ferrooxidantes	17
2.4.1. Género Acidithiobacillus	17
2.4.2. Género Leptospirillum	17
2.5. Metales pesados y lixiviación	18
3. ANTECEDENTES	19
4. MATERIALES Y METODOS	23
4.1. Lugar de ejecución.....	23
4.2. Tipo de investigación	23
4.3. Diseño de investigación	23
4.4. Variables	23
4.4.1. Variable independiente	23
4.4.2. Variable Dependiente.....	24
4.5. Operacionalización de variables	24
4.6. Muestreo.....	24
4.7. Procedimientos y análisis de datos	25
4.7.1. Enriquecimiento de cultivos	25
4.7.2. Aislamiento de cultivo bacteriano.....	25
4.7.3. Identificación microscópica	26

4.7.4.	Determinación del proceso de bioxidación	26
4.7.5.	Análisis de datos.....	27
5.	RESULTADOS.....	28
5.1.	Muestreo.....	28
5.2.	Enriquecimiento de cultivos	28
5.3.	Aislamiento cultivo bacteriano	29
5.4.	Identificación microscópica	31
5.5.	Determinación del proceso de bioxidación.....	32
6.	DISCUSIÓN	33
6.1.	Muestreo.....	33
6.2.	Enriquecimiento de cultivos	33
6.3.	Aislamiento de cultivo bacteriano	34
6.4.	Identificación microscópica	35
6.5.	Determinación del proceso de bio-oxidación	36
7.	CONCLUSIONES	37
8.	RECOMENDACIONES	38
9.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	39
10.	ANEXOS.....	43

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el enriquecimiento bacteriano de microorganismos biooxidantes.</i>	43
<i>Tabla 1. Composición del medio 9K Líquido.</i>	44
<i>Tabla 2. Composición del medio T&K líquido.</i>	44
<i>Tabla 3. Composición del medio 9K sólido.</i>	44
<i>Tabla 4. Medios de cultivos evaluados en el aislamiento bacteriano de microorganismos biooxidantes.</i>	45
<i>Tabla 5. Datos de pH y temperatura (°C) monitoreados en cada fecha de muestreo.</i>	45
<i>Tabla 6. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 1.*</i>	46
<i>Tabla 7. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 2.*</i>	47
<i>Tabla 8. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 3.*</i>	48
<i>Tabla 9. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 4.*</i>	49
<i>Tabla 10. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 5.*</i>	50
<i>Tabla 11. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 6.*</i>	51
<i>Tabla 12. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 7.*</i>	52
<i>Tabla 13. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 8.*</i>	53
<i>Tabla 14. Porcentaje de placas con crecimiento bacteriano y sin crecimiento bacteriano según el medio de cultivo y método de siembra.</i>	54
<i>Tabla 15. Promedio de las Unidades Formadoras de Colonias según el medio de cultivo de aislamiento bacteriano de microorganismo biooxidantes.</i>	55
<i>Tabla 16. Determinación de la Biooxidación durante 50 días según el conteo bacteriano y análisis químico.</i>	56
<i>Figura 1. Lugar de muestreo. Efluentes de aguas residuales de unidades mineras</i>	57
<i>Figura 2. Mapa del lugar de muestreo</i>	58
<i>Figura 3. Cooler con gel pack conteniendo las muestras recolectadas</i>	59
<i>Figura 4. Esterilización en frío de solución B componente del medio de cultivo 9K.</i>	59
<i>Figura 5. Medios de cultivo 9K con agar-agar y 9K con agarosa.</i>	60
<i>Figura 6. Siembra por método de estría simple</i>	60
<i>Figura 7. Siembra por método de extensión (Utilización de asa de Drigalski).</i>	61
<i>Figura 8. Evaluación química del Fe⁺² (Ión Ferroso) en la solución en g/L.</i>	61
<i>Figura 9. Evaluación química del Hierro Total en la solución en g/L.</i>	62
<i>Figura 10. Zona de muestreo demostrando proceso de oxidación natural.</i>	62
<i>Figura 11. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°1: Medio 9K-Agitación en shaker (150 rpm)-Temperatura 40°C-Inyección de Oxígeno</i>	63
<i>Figura 12. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°2: Medio 9K-Agitación en shaker (150rpm) -Temperatura 40°C.</i>	63

Figura 13. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°3: Medio 9K-Agitación en shaker (150 rpm).	64
Figura 14. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°4: Medio 9K-Temperatura 40°C - Inyección de Oxígeno.	64
Figura 15. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°5: Medio T&K-Agitación en shaker (150 rpm)-Temperatura 40°C-Inyección de Oxígeno.	65
Figura 16. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°6: Medio T&K -Agitación en shaker (150 rpm)-Temperatura 40°C.	65
Figura 17. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°7: Medio T&K -Agitación en shaker (150rpm).	66
Figura 18. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°8: Medio T&K-Temperatura 40°C- Inyección con Oxígeno.	66
Figura 19. Resumen: Concentración bacteriana (cel/ml) de los 8 tratamientos de enriquecimiento.	67
Figura 20. Resumen: Concentración bacteriana (cel/ml) de 8 tratamientos de enriquecimiento bacteriano.	68
Figura 21. Observación microscópica a un aumento de 40X.	69
Figura 22. Bacterias aisladas indicadas con las flechas	69
Figura 23. Arriba: Bacterias Gram negativas presenta una coloración rosada o fucsia. Abajo: se observan bacilos pleomórficos, característico de Thiobacillus	70
Figura 24. Desarrollo bacteriano en tubo.	70
Figura 25. Cristales de color verdoso. Sales provenientes de las sales de azufre.	71
Figura 26. (F1) Colonias color amarillo-naranja con forma circular. Punto marrón o anaranjado en el centro, superficie lisa cremosa y con bordes ondulados. Medio de cultivo 9K.	71
Figura 27. (F2) Colonias color grisáceo con forma granular y borde irregular, elevación plana, margen lobulado. Medio de cultivo 9K.	72
Figura 28. (F3) Colonias blancas de diferentes tamaños, forma circular y borde filamentosos. Presenta tricomas en los bordes. Medio de cultivo 9K.	72
Figura 29. Colonias en placas con medio 9K con agarosa.	73
Figura 30. Desarrollo bacteriano en placas de medio 9K con agarosa	74
Figura 31. Determinación de Bioxidación. Duración del ensayo 50 días. De izquierda a derecha. Erlenmayer 1: 10 días, Erlenmayer 2: 20 días de incubación, Erlenmayer 3: 30 días de incubación, Erlenmayer 4: 40 días de incubación, Erlenmayer 5: 50 días de incubación.	75
Figura 32. Determinación de Bioxidación. Los 4 ensayos después de 50 días.	75
Figura 33. Relación entre los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso), Fe^{+3} (Ión Férrico) y Fe^{total} (Fierro Total) durante el proceso de bioxidación (duración 50 días).	76
Figura 34. Población bacteriana en el proceso de bioxidación (duración de 50 días)..	77

TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

DAM Drenaje ácido de mina

T&K Medio Thiobacillus formulado por Tuovinen and Kelly (1973)

UFC Unidad Formadora de Colonias

9K Medio formulado por Silverman Lundgren (1958)

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo el aislamiento y determinación de las bacterias del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* presentes en las aguas residuales de las unidades mineras de Recuay – Huaraz. Con este fin se recolectaron 3 muestras del efluente y se llevaron al laboratorio donde fueron sometidas al enriquecimiento en medios de cultivo 9K y T&K líquidos, con un pH de 1.5 y se realizó un conteo poblacional cada 24 horas haciendo uso de la cámara de Newbauber. Se obtuvo la mayor concentración bacteriana en el tratamiento 1 con $9.33E+06$ cel/ml durante la etapa de enriquecimiento. Por otro lado, para el aislamiento del cultivo se utilizó medio 9K líquido y sólido; el primero fue incubado a temperatura ambiente por 8 días. Transcurrido este tiempo se sembró en placas Petri, por estría y por extensión. En medio sólido 9K con agar-agar se observó crecimiento bacteriano después de 14 a 25 días, en el 50% de placas sembradas por extensión y el 10% por estría. Mientras que en el medio cultivo 9K con agarosa se observó crecimiento después de 7 a 8 días en el 80% y 60% de placas por extensión y estría, respectivamente. Los resultados de la observación microscópica mostraron presencia de bacterias con morfología bacilar, carácter acidófilo por su desarrollo en medios con pH 1.5 y metabolismo quimiolitotrofo por su crecimiento y mantenimiento durante el tiempo del ensayo a expensas de compuestos inorgánicos presentes en el medio. En el medio sólido con crecimiento bacteriano después de 45 días de incubación se logró diferenciar 3 tipos de colonias que coinciden con el género de *Acidithiobacillus*. Además se obtuvieron indicios de las biotransformaciones realizadas por las bacterias lixivadoras, oxidando el sulfato ferroso a sulfato férrico durante la determinación de bioxidación, lo cual se evidenció mediante el cambio de color de verde traslúcido a naranja brillante.

Palabras clave: Biominería, biolixiviante, quimiolitotrofico, *Acidithiobacillus*.

ABSTRACT

The present investigation had as objective the isolation and determination of the species of the genus *Acidithiobacillus* and *Leptospirillum* present in the waste water of the mining units of Recuay - Huaraz. To this end, 3 samples of the effluent were collected and taken to the laboratory where they were submitted to enrichment in 9K and T & K liquid culture media, with a pH of 1.5 and a population count was done every 24 hours using the Newbauber chamber. The results showed that the best enrichment was carried out with the medium 9k in agitation 150 rpm, extra aeration and heat 40 ° C, as the bacterial growth curve occurred in ascending and sustained form, being at 432 hours where Observed the highest bacterial concentration, $9.33E + 06$ cells / ml. On the other hand, liquid and solid 9K medium were used for the isolation of the culture; The first was incubated at room temperature for 8 days. After this time was planted in Petri plates, by stria and by extension. In solid 9K medium with agar-agar bacterial growth was observed after 14 to 25 days, in 50% of plates seeded by extension and 10% by streak. While in the 9K medium agarose culture growth was observed after 7 to 8 days in 80% and 60% plates by extension and stria, respectively. The results of the microscopic observation showed the presence of bacteria with bacillary morphology, acidophilic character due to their development in media with pH 1.5 and chemiolithotroph metabolism due to their growth and maintenance during the time of the test at the expense of inorganic compounds present in the medium. In solid medium with bacterial growth after 45 days of incubation it was possible to differentiate 3 types of colonies. In addition, indications were obtained of the biotransformations performed by the leaching bacteria, oxidizing the ferrous sulfate to ferric sulfate during the determination of biooxidation. Which was evidenced by the change of color from translucent green to bright orange.

Key words: Biomining, bioleaching, chemiolithotrophic, *Acidithiobacillus*.

1. INTRODUCCIÓN

El Perú es considerado un país minero debido a que gran parte de su economía depende de esta actividad extractiva. Los métodos de extracción convencionales emplean grandes cantidades de energía y agua, lo que eleva los costos económicos y ambientales, además son aplicables solo en lugares de alta concentración de mineral para justificar el gasto de su extracción. Asimismo, como resultado del proceso de obtención de minerales se generan desechos y residuos, que son una mezcla de roca triturada, agua y reactivos químicos residuales, denominados “relaves mineros”, que en su mayoría tienen metales como oro, plata o cobre en baja concentración. Por esta razón, el sector minero requiere de la aplicación de nuevas tecnologías, como el uso de bacterias biomineras, para incrementar la recuperación de minerales, disminuir los costos y la contaminación.

La biominería es el conjunto de tecnologías que permiten explotar minerales mediante la acción de microorganismos, principalmente bacterias, para un mejor aprovechamiento de los metales de baja concentración en relativa ausencia de contaminación. Entre estas tecnologías se encuentran la biooxidación, biolixiviación y biorremediación, las cuales ya se practican en países como Sudáfrica, USA, México, Brasil, Chile y Australia a nivel industrial. La tecnología microbiana presenta ventajas como: la poca inversión de capital y el aprovechamiento los relaves mineros. En el Perú se intentó incorporar esta tecnología como proyecto piloto, tal es el caso de la experiencia de Tamboraque en 1998 donde, por lixiviación bacteriana, se logró liberar el oro a partir arsenopirita. Sin embargo, para su aplicación a gran escala, requiere mayor investigación científica.

En 1947, se determinó la primera bacteria biooxidante, denominada *Acidithiobacillus ferrooxidans* y posteriormente, en 1972, se aisló el género *Leptospirillum*. Estas bacterias habitan en estado natural en aguas ácidas y son utilizadas en la oxidación de minerales sulfurados principalmente en la extracción de metales (Au, Ag y Cu). Estudios realizados recomiendan el uso de cepas nativas y no cepas certificadas provenientes de otros países.

Motivo por el cual la presente investigación tuvo como objetivo el aislamiento y determinación de las especies del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* presentes en las aguas residuales de las unidades mineras de Recuay - Huaraz.

1.1. Planteamiento del problema

La economía en el Perú mayormente depende de la actividad minera, sin embargo en los últimos años la población ha tomado conciencia respecto al verdadero costo ambiental de la minería.

La minería tradicional contamina el aire, el suelo y el agua. Durante los últimos 2 años los conflictos socio-ambientales han sido mayormente a causa de la contaminación de fuentes de agua, ya que el agua es un insumo indispensable en esta actividad minera. Su uso es más intensivo en la fase del proceso productivo en el cual es combinada con reactivos químicos para separar el metal de la roca y así obtener el mineral con valor comercial (Herrera y Millones 2011). Durante este proceso se producen sustancias muy tóxicas y peligrosas que terminan contaminando el medio ambiente y que perjudican al hombre y a los animales de los alrededores, por lo que la población se opone cada vez más a la actividad minera. Asimismo, la crisis económica de los últimos años ha afectado de forma directa al sector minero ya que, a nivel mundial el 45% del PBI (Producto Bruto Interno) depende de la minería (MEF 2015). Este hecho se evidenció en la caída generalizada del precio de los metales, que disminuyó en un 23% en el 2015 causando una reducción del 32% en la rentabilidad neta de las mineras a nivel nacional (Gestión 2013).

Por esta razón, en el Perú las empresas y corporaciones mineras vienen desarrollando programas pilotos de biolixiviación con el objetivo de aplicar esta tecnología a nivel industrial. Por ejemplo, en Tamboraque (1998), iniciaron el uso de la biotecnología para el tratamiento de la arsenopirita aurífera y en Toquepala (1996) con el cobre, generaron expectativas ambiciosas en la aplicación de esta tecnología (Ly 2009). Sin embargo, causas tales como el mal manejo de factores ambientales indispensables para el desarrollo de poblaciones de bacterias y la ausencia de protocolos de manejo biominero, ha ocasionado que esta tecnología no se aplique a nivel industrial en el país. Los consorcios bacterianos utilizados en pilas de biolixiviación y en reactores de

bioxidación son operados y diseñados por profesionales de la rama metalúrgica con escaso conocimiento de morfología y fisiología bacteriana, para subsanar este problema se requiere más investigación y la participación de más biólogos en la biominería.

1.2. Formulación del problema

¿Las aguas residuales de las inmediaciones mineras de Recuay - Huaraz presentan bacterias biooxidantes que se puedan aislar?

1.3. Justificación de la investigación

La biominería ha encontrado su mayor obstáculo en la lentitud del proceso de adaptación de las cepas certificadas al lugar de desarrollo de los proyectos mineros en nuestro país, ya que este tipo de bacterias son sensibles a los factores ambientales como temperatura y oxigenación, entre otros. Generalmente, las cepas certificadas no cumplen con los porcentajes de recuperación de metales esperados, por ello se recomienda el uso de bacterias nativas. Ya que las bacterias hacen del proceso de lixiviación más sencillo y manejable pero, no se reproducen a la velocidad necesaria. Razón por la cual el aislamiento, manejo e identificación de bacterias biolixivantes nativas en el laboratorio permitirá desarrollar una minería limpia con bajos costos de operación e inversión y tratar el creciente cúmulo de minerales de baja ley que no son procesados por métodos tradicionales. Además permitirá realizar manipulación genética para producir microorganismos con capacidades mejoradas como: mayor producción de biomasa, alta resistencia a metales pesados y mayor porcentaje recuperación (Esparza 2014).

1.4. Objetivo General

Aislar y determinar las bacterias biooxidantes presentes en aguas residuales de las unidades mineras de Recuay.

1.5. Objetivos Específicos

Enriquecer los medios de cultivo para aumentar la población bacteriana biooxidante en la muestra recolectada.

Aislar las bacterias biooxidantes del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*.

Determinar la actividad biooxidante de las bacterias aisladas.

Describir las características de las bacterias aislados.

2. MARCO TEORICO

2.1. Biolixiviación

Consiste en una oxidación de sulfuros metálicos insolubles catalizada por microorganismos acidófilos en un medio acuoso, para volverlos solubles en forma de sulfatos. Se trata del conjunto de reacciones químicas que tienen como resultado la disolución de minerales por parte de bacterias, las cuales disuelven (lixivian) las rocas o minerales, solubilizándolos (por eso el proceso se llama Biolixiviación o Lixiviación Biológica), liberando de él cobre en mayor cantidad que con métodos convencionales (Alpaca 1998). Este pretratamiento se realiza con bacterias y minerales/concentrados refractarios de oro y cobre (arsenopirita, pirita) permitiendo que el valor metálico permanezca en fase sólida (insoluble). Es posible recuperar este valor metálico (oro y plata), a través de un proceso de cianuración. Además la solución restante se neutraliza sin contaminar las aguas ni a otros seres vivos del ecosistema (Schippers 2007).

2.2. Mecanismos de biolixiviación

Puede ser directo o indirecto. La lixiviación indirecta se realiza con $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ en ausencia de oxígeno o de bacterias, es responsable de la disolución o lixiviación de varios minerales sulfurados de importancia económica.

Dentro de este mecanismo, son importantes dos reacciones mediadas por T. ferrooxidans:



El mecanismo de lixiviación indirecta depende de la regeneración biológica del sulfato férrico (reacción 2). El azufre (S⁰) generado en las reacciones 3 y 4 puede ser convertido en ácido sulfúrico (H₂SO₄) por T. ferrooxidans según:



Este ácido sulfúrico mantiene el pH del sistema a niveles favorables para el desarrollo de la bacteria.

Las bacterias ferrooxidantes también pueden lixiviar sulfuros metálicos directamente, sin la participación del sulfato férrico producido biológicamente este proceso es llamado lixiviación directa. El proceso se describe en la siguiente reacción, donde M representa un metal bivalente:



Dado que el hierro siempre está presente en ambientes de lixiviación natural, es posible que tanto la lixiviación indirecta como la directa ocurran de manera simultánea (Ballester 2005).

2.3. Drenaje ácido de la minería (DAM)

Cuando las grandes cantidades de roca que contienen minerales sulfatados, son excavadas en tajo abierto o en vetas en minas subterráneas, estos materiales reaccionan con el aire o con el agua para crear ácido sulfúrico. Cuando el agua alcanza cierto nivel de acidez, un tipo de bacteria común llamada "Tiobacilus Ferrooxidante", puede aparecer acelerando los procesos de oxidación y acidificación, lixiviando aún más los residuos de metales de desecho.

El ácido lixiviara la roca mientras que la roca fuente esté expuesta al aire y al agua. Este proceso continuará hasta que los sulfatos sean extraídos completamente; este es un proceso que puede durar cientos, o quizás miles de años. El ácido es transportado desde la mina por el agua, las lluvias o por corrientes superficiales, y posteriormente depositado en los estanques de agua, arroyos, ríos, lagos y mantos acuíferos cercanos. El DAM degrada severamente la calidad del agua y puede aniquilar la vida acuática, así como volver el agua prácticamente inservible (Herrera y Millones 2011).

2.4. Bacterias biolixiviantes, biooxidantes o ferrooxidantes

Son microorganismos también llamados sulfoxidantes que pertenecen a los mesofilicos y termofilicos moderados. Se dividen 3 grupos: *nitrospira*, *actinobacterias* y *proteobacteria*. Todas se adhieren al mineral para lograr la solubilización de metales generando ion férrico (Fe^{3+}) y ácido sulfúrico (H_2SO_4). (Schippers 2007). Se les denomina biolixiviantes debido a que participan de bioprocesos, ya sean biolixiviación, bio-oxidación o biomineralización, siempre con el objetivo de purificar metales (Ly 2009).

2.4.1. Género Acidithiobacillus

Las bacterias Acidithiobacillus contienen un alto grado de heterogeneidad genética. Son bacilos, con forma de bastón, y gram negativo. Sus cepas tienen un solo flagelo y pili tipo IV necesario para su movilidad desplazamiento y adherencia a los minerales. Tienen un genoma de 28106 pares de bases aproximadamente y un 55-65% de bases Guanina-Citosina (Huber 1986).

2.4.2. Género Leptospirillum

Las bacterias de este género son gram negativas, pero estas se caracterizan por tener forma de espiral, con 0,3-0,5 micrones de ancho y de 0,9-4.0 micrones de largo (Huber 1986).

2.5. Metales pesados y lixiviación

La contaminación por metales pesados es causada cuando algunos metales como el arsénico, el cobalto, el cobre, el cadmio, el plomo, la plata y el zinc, contenidos en las rocas excavadas o expuestos en vetas en una mina subterránea, entran en contacto con el agua. Los metales son extraídos y llevados río abajo, mientras el agua lava la superficie rocosa. Aunque los metales pueden ser movidos en condiciones de pH neutral, la lixiviación es particularmente acelerada en condiciones de pH bajo, tales como las creadas por el drenaje ácido de la minería (Eco-sitio 2009).

3. ANTECEDENTES

HOCHENG,H; *et al.* (2012) En el presente estudio desarrollaron el proceso de fabricación de un metal innovador utilizando el *Acidithiobacillus ferrooxidans*, para remover el metal. El proceso consiste en oxidar y transformar el Fe² a Fe³, después el Fe³ producido oxida los metales. El proceso de fabricación de Cu, Ni y Al, fue investigado experimentalmente utilizando las células del *Acidithiobacillus ferrooxidans* como sobrenadante. La remoción de material de estos tres metales fueron en proporción de 2, 1.6, 0.55 y 5.5, 4.2 y 0.7 mg/cm²/h utilizando células y sobrenadante, respectivamente. Lograron remover la mayor cantidad de metal usando el cobre y cultivo sobrenadante. El *Acidithiobacillus ferrooxidans* fue cultivado en un medio basal 510 compuesto por solución A y solución B.

STAROSVETSKY, J; *et al* (2013). Desarrollaron un método más rápido para el conteo de las bacterias. Utilizaron tres tratamientos diferentes, uno con medio Agar Thiobacillus (CONTROL), T1 medio Agar Thiobacillus con verde de bromocresol y T2 con medio Agar Thiobacillus con rojo de fenol. Observaron crecimiento en el tratamiento control y uno. Mientras que el indicador de rojo de fenol inhibe el crecimiento de las bacterias.

CORRALES, L; *et al* (2006). Aislaron y fenotipificaron microorganismos de 4 minas de Colombia, para esto tomaron muestras de drenaje de agua de cada mina y también muestras de rocas, y las transportaron a temperatura ambiente. Como medio de cultivo usaron el 9K (Silverman & Lundgreen). Para su preparación utilizaron una solución A y B con agua destilada ajustaron a pH 1.5 y autoclavaron por 15 minutos. A continuación, para verificar la presencia de bacterias incubaron los cultivos en medio líquido durante 7 días, para su sembrado en placas de Petri con cultivo 9K sólido. Llegaron a la conclusión que en estas minas había microorganismos con características biolixivantes, del género *Thiobacillus*.

SUGIO,T *et al* (2008).Trabajaron con dos cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (D3-A, ATCC23270).Para el cultivo de ambas cepas usaron cultivos enriquecidos en 20 litros de medio, con aireación a 30°C por 1 semana. Sembraron en medios sulfurados al

1% y medios de Chalcopirita al 1% con 2.5 de pH para evaluar su crecimiento. Por otro lado, debido a la naturaleza de los medios, para la obtención de las células usaron papel filtro Toyo (N°5B) y centrifugaron por 15 minutos a 12000 rpm, lavaron las células 3 veces con buffer B-Alanina-SO₄ y suspendieron en el mismo.

En ambas cepas se evaluó la cantidad de cobre solubilizado, la actividad oxidativa de hierro y el efecto de la concentración del ion sulfito en la actividad sulfito oxidasa. El ion sulfito es un producto intermedio muy tóxico que inhibe la actividad oxidativa y los resultados demostraron que la cepa D3-2, que posee resistencia al ion sulfito, es capaz de solubilizar más cobre de la calcopirita que la cepa ATCC23270, que es sensible al sulfito oxidasa.

RIVERA, R; *et al* (2011). Desarrollaron la investigación con el objetivo de encontrar cepas biolixiviantes termófilas y capaces de reducir el hierro para la lixiviación de minerales de sulfuros de cobre de baja concentración. Las muestras las obtuvieron de la unidad minera La Caridad (Mexico). El medio que usaron tanto en sólido como en líquido fue el MKM (medio Kelly modificado) enriquecidos con Fe(II) y S, luego incubaron a 50°C y 70°C. Evaluaron el pH, potencial redox, conductividad y población bacteriana. Finalmente seleccionaron las cepas que mejor se adaptaron y se eligieron las mejores condiciones de adaptación para hacer pruebas de lixiviación en columnas construidas bajo la norma ASTM-D5744. Sus resultados reflejaron que a 70°C la disminución de pH y Fe (II) era mayor, aunque a 50°C la disminución de azufre y el crecimiento bacteriano era mayor.

QUINTANA, M; *et al* (2004). En esta investigación tuvieron como objetivo aislar, identificar e caracterizar molecularmente los microorganismos que participaban en la biooxidación en los tanques industriales de Tamboraque y los drenajes ácidos de la mina. Para esto utilizaron medios líquidos, el medio 9K el cual esterilizaron a 121°C x15 minutos. Incubaron los medios a temperatura ambiente con agitación de 200rpm, hasta que el medio cambio de color. Lavaron el medio sólido 9K con alcohol dos veces, sirvieron en placas e incubaron a 37°C x 24hrs. Realizaron el sembrado con un asa de vidrio e incubaron a temperatura ambiente durante dos semanas. Sus resultados mostraron que la oxidación tanto en los drenajes como en los bioreactores fueron desarrollados por un consorcio de microorganismos, entre los cuales están los géneros

Acidithiobacillus y *Leptospirillum*. Los cuales fueron cultivados en condiciones de laboratorio y les efectuaron la tinción gram.

Ossa D, *et al* (2005). En el proyecto evaluaron la acción de microorganismos acidófilos aislados en la mina el Zancudo Titiribí (Antioquia-Colombia), sobre la oxidación de la pirita y arsenopirita variando las concentraciones de sustrato, el tamaño de partículas y los medios de aislamiento ya que usaron el medio tK para el *Acidithiobacillus ferroxidans* y el 9K para *Thiooxidans*. Los parámetros que tuvieron fue el pH, el potencial Redox y las concentraciones de hierro y azufre, monitorearon por 25 días, y demostraron una actividad de oxidación eficiente ya que mostraron valores de pH 1.4 y potencial redox de 600 MVU. También observaron que la presencia del carbonato y que el tamaño de partículas retardaba la acción de las bacterias. Por último, la presencia de productos propios de la oxidación bacteriana como jarosita, arsenato de hierro y la corrosión de granos de pirita nos sirvieron para demostrar la oxidación.

SAND,W *et al* (1992). Examinaron muestras bacterianas (mixtas) de 3 diferentes biotopos biolixiviantes, para evaluar la importancia de *Leptospirillum ferroxidans* en los procesos de biolixiviación y sus diferencias con *Acidithiobacillus ferroxidans* para identificar cuál de las especies tiene mayor relevancia en este proceso. Por ello prepararon muestras purificadas y seleccionadas a partir de una solución nutritiva, suplementada con sulfuro al 1% a pH 1.8 donde incubaron a 28°C por 2 meses. Luego inocularon al 10% en tubo, monitorearon en agitación y oscuridad por 21 días para su crecimiento. Sus resultados evidenciaron que ambas especies tienen una actividad oxidativa similar, ya que los mejores resultados de biolixiviación lo obtuvieron cultivos mixtos donde se encontraban 2 o 3 especies diferentes.

MEJIA, E *et al* (2011). Evaluaron la adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferroxidans* a diferentes densidades de pulpa de calcopirita, esfalerita y galena. Por ello, recolectaron muestras bacterianas (mixtas) de 3 diferentes biotopos biolixiviantes para evaluar la importancia de *Leptospirillum ferroxidans* en los procesos de biolixiviación y sus diferencias con *Acidithiobacillus ferroxidans* con el objetivo de identificar cual especie tiene mayor relevancia en este proceso.

PEREZ, N *et al* (2005). Adaptaron y cultivaron las bacterias que se aislaron de los drenajes ácidos de minas de carbón del Norte de Santander con la finalidad de confirmar

la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y lograr que la bacteria libere el oro encapsulado en los sulfuros.

Primero utilizaron medios 9K (sólido y líquido) de Silverman Lundgren como base y usaron medios modificados (sin nitratos, sulfatos y cloruro), para evaluar el efecto de la ausencia de estos componentes. Además, usaron pruebas bioquímicas para la identificación, donde el cultivo dio un resultado positivo para tetrionato, tiosulfato y azufre, y negativo para tiocianato lo que les confirmó la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Finalmente, durante la etapa de cultivo notaron que la bacteria crece favorablemente en medio 9K con agar en una proporción mínima de 2%; en condiciones aeróbicas, de baja luminosidad y temperatura ambiente (28°C a 35°C), formando colonias de color amarillo con morfología Gram negativa y bacilos pleomórficos. Por otro lado, lograron enriquecer el cultivo mediante la realización de pasos consecutivos cada 7 días en medio líquido y cada 15 días en medio sólido.

QUINTANA, M *et. al* (2002). Aislaron y caracterizaron molecularmente microorganismos acidófilos y quimiolitotróficos biooxidantes de hierro que pertenecen al género *Acidotiobacillus* y *Leptosperillum* en cultivos de 10 ufc- ml en placa (proporción 1.5:1). Utilizaron el medio líquido 271 APH y el medio sólido compuesto por 2 soluciones: A (agarosa lavada con alcohol y esterilizada en autoclave) y medio Holmes (35 ml de 9K 10X, 7.5 ml de solución de sulfato ferroso heptahidratado a pH 2 y 407.5 ml de agua destilada ácida). Después del cultivo realizaron la genotipificación de los microorganismos biooxidantes, para identificar usaron la base de información de secuencias depositada en el GenBank del gen 16S rRNA de los géneros biooxidantes.

ARIAS, V *et al* (2012). Caracterizaron morfológicamente un consorcio de bacterias provenientes de las unidades mineras de Julcani en Huancavelica. Para ello aislaron dichas bacterias en medios de cultivo líquido 9K modificado y medio sólido de FeO, asimismo realizaron la identificación por tinción Gram y observación microscópica. Recomendaron que para obtener una cepa pura es necesario no menos de 8 resiembras en medio líquido y sólido, en modo alternante.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Lugar de ejecución

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, ubicado en la urbanización Las Gardenias en el distrito de Surco, ciudad de Lima.

4.2. Tipo de investigación

De acuerdo a la naturaleza de los objetivos esta investigación es de tipo exploratoria ya que el método para aislar y determinar bacterias biooxidantes ambientales no ha sido lo suficientemente estudiado. Además, de acuerdo al enfoque de la investigación se consideró experimental ya que se manipula una variable independiente como medio de cultivo para ver su incidencia en una dependiente como población bacteriana.

4.3. Diseño de investigación

La presente investigación desarrolla un diseño metodológico no experimental en la que el objetivo fue aislar una población bacteriana ambiental y determinar su capacidad biooxidativa. Con este fin se recolectaron datos de un solo momento por lo que es transversal, además se describieron las variables cualitativas y se analizó la incidencia e interrelación entre sí.

4.4. Variables

4.4.1. Variable independiente

Tratamientos de enriquecimiento

Medios de cultivo

Métodos de siembra

4.4.2. Variable Dependiente

Población Bacteriana

Porcentaje de bioxidación

4.5. Operacionalización de variables

Variables	Definición	Tipo de variable		Indicador
Tratamientos	Medio de cultivo con una formulacion de nutrientes especificos y diferentes factores ambientales.	Independiente	Cualitativa	T1: Medio 9K-Agitacion-temp.-O2 T2: Medio T&K-Agitacion-temp-O2 T3: Medio 9K-temp.-O2 T4:Medio T&K-temp-O2 T5:Medio 9K-Agitacion-O2 parcial T6:Medio 9K-Agitacion T7:Medio 9K-Agitacion-temp. T8:Medio T&K -Agitacion-temp. T9:Medio T&K -Agitacion-O2 parcial T10:Medio T&K -Agitacion
Medios de Cultivo	Medio 9k con dos diferentes gelificantes: Agar-Agar / Agarosa	Independiente	Cualitativa	Medio 9K (Agar-Agar) Medio 9K modificado (Agarosa)
Metodos de Siembra	Es la forma en la que se siembra una cepa microbiana, se sembro con haza de Hemle en forma de estria clasica y por extencion con haza de drigalski.	Independiente	Cualitativa	Siembra por Estria Siembra por Extención
Poblacion bacteriana	Cantidad de bacterias contadas en los 25 cuadrantes centrales de la camara de Newbaeur en un microscopio a 40x de aumento.	Dependiente	Cuantitativa	Número de celulas/mililitro.
Porcentaje de Bio-oxidacion	Es la cantidad de ferroso que fue oxidado a ferrico por accion del consorcio bacteriano del fierro total presente en el medio.	Dependiente	Cuantitativa	Del 1 al 100%

4.6. Muestreo

Se recolectaron 3 muestras en aguas arriba (100 metros) del efluente y aguas abajo (100 metros) del efluente de aguas residuales de las unidades mineras ubicadas a una altitud de 4000 msnm en las coordenadas 9°45'59.61" Latitud Sur y 77°33'25.62" Longitud Oeste de la provincia de Recuay del departamento de Ancash (Figura N° 1 y 2). En el lugar de muestreo se midió el pH y la temperatura del efluente, seguidamente las 3 muestras que fueron colectadas en frascos estériles de 100mL, a continuación se colocaron en un cooler con gel pack para mantener las muestras en condiciones similares a las ambientales durante su transporte a Lima (Figura N° 3).

4.7. Procedimientos y análisis de datos

4.7.1. Enriquecimiento de cultivos

En el laboratorio las muestras antes de ser sometidas al medio de enriquecimiento fueron observadas en un microscopio óptico marca Leica a 400X de aumento para confirmar la presencia de microorganismos.

Por otra parte, se prepararon los medios de cultivo utilizados 9K y T&K líquidos (Tablas N° 1 y 2). Una vez preparados los medios, se ajustó el pH a 1.5 utilizando H_2SO_4 5M. Seguidamente, se sirvieron 90mL de medio en 5 Erlenmeyers de vidrio de 250mL por cada medio, los cuales fueron sellados con tapón de algodón y/o papel aluminio, estos Erlenmeyers fueron rotulados y esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min a 103.4 kPa de presión.

Posteriormente, los medios fueron inoculados con 10 mL de muestra e incubados según tratamientos (Cuadro N° 1), 2 Erlenmeyers se trataron con agitación utilizando un shaker marca N-BioteK a 150 rpm, otros 2 se taparon con papel aluminio para evitar el ingreso de oxígeno y se mantuvieron en agitación y a 40 °C con luz infraroja, 2 más en agitación y con inyección de aire con una bomba de pecera. También se trataron 2 Erlenmeyers más tapados solo con algodón para permitir el ingreso de aire y en agitación, además 2 Erlenmeyer fueron tratados con agitación en shaker, inyección de aire y temperatura de 40 °C. A continuación, se mantuvieron estos tratamientos durante 20 días y se realizó un conteo poblacional cada 24 horas haciendo uso de la cámara de Newbauber.

4.7.2. Aislamiento de cultivo bacteriano

Para el aislamiento del cultivo bacteriano se utilizó medio 9K líquido y sólido. **Líquido:** Se ajustó el pH del medio 9K a 1.5 con H_2SO_4 5M. Seguidamente, se sirvió 15mL de medio en tubos de ensayo de 20 x 150 mm, los cuales fueron sellados con papel aluminio, rotulados y esterilizados en autoclave a 121°C por 15 min a 103.4 kPa de presión, a continuación, se inoculó 0.5mL de cultivo enriquecido en medio de cultivo

9K líquido, el cual fue incubado a temperatura ambiente por 8 días. En el transcurso de este periodo se monitoreó el pH con papel Pampea y la población bacteriana.

Sólido: Este medio consistió en dos soluciones: A y B (Tabla N° 3). Las sales minerales de la solución A se homogenizaron con agua destilada y se adicionó 2 agentes gelificantes, según tratamiento (Tabla N° 4), las cuales se diluyeron en microondas hasta obtener una solución homogénea. A continuación, se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min, luego de este proceso se dejó enfriar la solución hasta una temperatura de 50 °C, donde se agregó la solución B previamente filtrada (Figura N°4). Se sirvieron los medios en placas Petri 100x15mm. Los medios fueron conservados a temperatura ambiente hasta su uso (Figura N°5).

Transcurrido el tiempo de incubación del medio líquido inoculado, este se sembró en placas Petri por 2 métodos de siembra: 1) Por estría con ayuda de un asa de siembra y 2) por extensión con una pipeta y asa de Drigalski, también se sembró el cultivo resultante de la etapa de enriquecimiento, seguidamente se incubaron por 10 días a 37 °C (Figuras N° 6 y N°7). A continuación, se realizó coloración Gram de las colonias obtenidas.

4.7.3. Identificación microscópica

Para la identificación microscópica, se realizó la coloración Gram de las colonias obtenidas en medio sólido y se determinó la morfología (bacilar, vibrio, coco) de las bacterias observando en un microscopio Leica a 1000X. Después tomando una gota del cultivo líquido en un portaobjeto se observó al mismo aumento antes mencionado. Seguidamente, las placas donde hubo crecimiento se observaron en un estereoscopio marca Leica a 10X de aumento y se describió la forma de las colonias gram negativas obtenidas en cada medio, además se hizo una comparación con imágenes de colonias ya definidas en trabajos de investigación científica previos .

4.7.4. Determinación del proceso de bioxidación

Para determinar la oxidación bacteriana se llevaron a cabo 4 ensayos, donde se inoculó 10 ml de cultivo bacteriano a un matraz con 200 ml de medio 9K y se mantuvo a 40 °C,

con oxigenación en shaker a 150 rpm y con inyección de oxígeno con un aireador de pecera, durante 50 días. Cada 10 días se agregó 50 ml de medio 9K. Este proceso se repitió 2 veces y se inició un ensayo cada 5 días. Durante cada repetición se realizó un análisis químico para cuantificar la cantidad de ion ferroso (Fe^{+2}), ion férrico (Fe^{+3}) y Fierro total (Fe_{total}).

Calculo Ion Ferroso (Fe^{+2}):

Se tomó 5mL del medio y se añadió 10 mL de solución extractiva ácida. Luego se agregó 3 gotas de difenilamina. Se tituló con dicromato de potasio, hasta que la muestra se torne de color morado (Figura N° 8). Se registró la cantidad de dicromato de potasio utilizado.

Calculo del Fe Total (Fe_{total}):

Se tomó 5mL del medio y se añadió 30mL de solución férrica. Se llevó a ebullición a la solución resultante, en ese momento se agregó gota a gota cloruro estañoso hasta que se vuelva transparente. Se enfrió a baño maría. A continuación, se agregó 10mL de cloruro de mercurio. Finalmente se añadió 8 gotas de difenilamina. Se tituló con dicromato de potasio, hasta que la muestra se torne de color morado (Figura N°9). Se registró la cantidad de dicromato de potasio utilizado.

4.7.5. Análisis de datos

En la presente investigación se observó, describió y documentó aspectos esenciales de las bacterias biolixiviadoras y sus medios de cultivo. Además, cada procedimiento realizado durante la investigación se repitió 3 veces y los datos se agruparon en tablas donde se trabajó con promedios.

5. RESULTADOS

5.1. Muestreo

Las muestras utilizadas en esta investigación fueron tomadas de 3 puntos del efluente con un pH de 3.0, 2.98 y 3.05; y una temperatura de 15, 18 y 16 ° C respectivamente (Tabla N° 5). Además, se observaron piedras de color naranja alrededor del efluente lo que nos dio indicio de un posible proceso de oxidación natural, este criterio se tuvo en cuenta para elegir este lugar de muestreo (Figura N° 10).

5.2. Enriquecimiento de cultivos

Los resultados obtenidos en el enriquecimiento con el tratamiento 1 en la que el medio 9k se sometió a agitación, aireación y temperatura luego de haber sido inoculado, tuvo una concentración bacteriana de $1.50E+05$ cel./ml, a las 24 horas disminuyó a $1.10E+05$ cel/ml, mientras que a las 48 horas esta población bacteriana se duplicó a $2.40E+05$ cel/ml. La curva de crecimiento se dio forma ascendente, siendo a las 432 horas donde se observó la mayor concentración bacteriana, $9.33E+06$. (Tabla N°6, Figura N°11)

En el tratamiento 2, se observó que a las 24 horas se obtuvo una concentración bacteriana de $2.00E+04$ cel/ml, mientras que sólo a las 72 horas alcanzó $4.00E+04$ cel/ml. A partir de las 96 horas la concentración bacteriana disminuye a $2.00E+04$ cel/ml, reportándose a las 120 horas muerte bacteriana $0.00E+00$ cel/ml. (Tabla N°7 , Figura N°12)

En el tratamiento 3 se observó la misma tendencia siendo su máxima concentración bacteriana $8.00E+04$ cel/ml a las 144 horas de incubación, a las 168 horas se reportó muerte bacteriana $0.00E+00$ cel/ml. (Tabla N°8, Figura N°13)

A las 24 horas, el tratamiento 4 tuvo una concentración bacteriana de $4.00E+04$ cel/ml, mientras que, a las 192 horas se obtuvo la mayor concentración bacteriana, $8.00E+05$ cel/ml. A partir de las 216 horas, la concentración bacteriana empezó a disminuir

considerablemente, a $2.30E+05$ cel/ml. A las 360 horas se reportó muerte bacteriana $0.00E+00$ cel/ml. (Tabla N°9, Figura N°14)

A partir del tratamiento 5 se utilizó como medio base el T&K. En este tratamiento, se observó en las primeras 24 horas una concentración bacteriana de $7.00E+04$ cel/ml. A las 264 horas se cuantificó la mayor concentración bacteriana, $1.58E+06$ cel/ml. A partir de 288 horas la concentración bacteriana fue disminuyendo gradualmente hasta llegar a $7.00E+05$ a las 480 horas, culminado el ensayo. (Tabla N°10, Figura N°15)

El tratamiento 6 y 7 alcanzaron su máxima concentración bacteriana a las 48 horas con $2.00E+04$. En ambos ensayos se reportó muerte bacteriana a las 120 horas y 144 horas, respectivamente. (Tablas N°11 y N°12, Figuras N°16 y N°17)

En el tratamiento 8, se observa a las 24 horas una concentración bacteriana de $3.00E+04$ cel./ml. A las 192 horas se obtuvo una concentración de $6.7E+05$ cel/ml. Luego de las 216 horas a concentración disminuyó has $1.50E+05$ cel./ml a las 336 horas. A partir de las 360 horas, la concentración bacteriana comenzó a aumentar, teniendo como máxima concentración $8.80E+05$, a las 432 horas. (Tabla N°13, Figura N°18)

Se observó que el tratamiento 1 y el tratamiento 5 evidenciaron una mayor concentración bacteriana durante las 480 horas de ensayo. A partir de las 192 horas se mantuvo esta tendencia en comparación con los otros tratamientos. Es importante resaltar que durante el desarrollo del ensayo hubo evaporación de los medios de enriquecimiento y a mayor tiempo de incubación los medios cambiaron de color desde transparente a tonalidades de anaranjado. (Figuras N°19 y N°20).

5.3. Aislamiento cultivo bacteriano

Durante el ensayo de aislamiento de bacterias biooxidantes, se evaluó la presencia y ausencia de crecimiento bacteriano en los medios de cultivos líquidos y sólidos (9K y 9K modificado). En los tubos inoculados se evidenció un desarrollo bacteriano lento que se evidenció claramente después de 45 días (Figura N°24). En las placas con medio de cultivo 9K sólo se observó crecimiento bacteriano en el 50% de placas sembradas por método de siembra por extensión y el 10% de crecimiento bacteriano por método de siembra por estría con 14 a 25 días de incubación, mientras que en el medio cultivo 9K

modificado, se observó crecimiento bacteriano en el 80% de las placas sembrada por método de siembra por extensión y 30% de crecimiento bacteriano por método de siembra por estría con 7 a 8 días de incubación. (Tabla N°14, Figura N°30)

Asimismo en el medio de cultivo 9K se observaron 342 UFC (unidades formadoras de colonias) en promedio y 935 UFC (unidades formadoras de colonias) en promedio en el medio de cultivo 9K modificado. (Tabla N°15)

5.4. Identificación microscópica

Los resultados de la observación microscópica mostraron presencia de bacterias con morfología bacilar, carácter acidófilo por su desarrollo en medios con pH 1.5 y metabolismo quimiolitotrofo por su crecimiento y mantenimiento durante el tiempo del ensayo a expensas de compuestos inorgánicos presentes en el medio (Figuras N°21 y N°22).

Las láminas sometidas a coloración Gram muestran bacterias Gram negativas ya que tienen una coloración rosada o fucsia producto de la acción de la fucsina en la pared celular (Figura N°23). En las láminas se observaron bacilos pleomórficos, característicos de *Thiobacillus* y cristales con color verdoso al parecer son provenientes de las sales de azufre que componen el medio (Figura N°25).

En la observación de las placas con crecimiento bacteriano después de 45 días de incubación se logró diferenciar 3 tipos de colonias. Las colonias (F1) en el medio 9K con agar-agar eran de color amarillo-naranja con forma circular, elevación convexa acuminada ya que tenían un punto marrón o anaranjado en el centro además superficie lisa cremosa y con bordes ondulados (Figura N°26). También se observaron otras colonias (F2) de color grisáceo con forma granular y borde irregular, elevación plana, margen lobulado y superficie rugosa brillante (Figura N°27). Por otra parte, se observan colonias blancas (F3) de diferentes tamaños, de forma circular y borde filamentoso, elevación convexa pulvinada y superficie rugosa mate que presentan tricomas en los alrededores (Figura N°28). Asimismo las colonias en el medio 9K con agarosa presentaban color (F4) amarillo forma circular y del tamaño de un punto, También se observaron (F5) colonias de color marrón con forma granular, borde irregular pero de mayor tamaño y elevación convexa. Además se identificaron unas colonias (F6) blancas convexas de bordes ondulados y forma circular irregular pero mucho más grandes que las del medio 9K con agar-agar y finalmente se reportaron unas (F7) colonias de forma circular irregular de color marrón claro y con halo (Figura N°29)

5.5. Determinación del proceso de bioxidación

Para el proceso de bioxidación se tuvieron en cuenta los resultados del período de enriquecimiento. Por ello se usaron los parámetros que corresponden al tratamiento 1 con medio 9K que proporcionaba compuestos con azufre que permitieron la conservación y desarrollo del cultivo bacteriano por lo que se obtuvieron indicios de las biotransformaciones realizadas por las bacterias lixivadoras, oxidando el sulfuro a sulfito y el sulfito a sulfato lo cual se evidenció mediante el cambio de color de verde translucido a amarillo turbio, naranja brillante y finalmente a marrón oscuro en los medios líquidos utilizando el blanco como control (Figuras N°31 y N°32).

Los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso) al tiempo 0, en los 4 ensayos realizados fueron: 8g/L, 7.10g/L, 7.90 g/L y 8.1 g/L respectivamente. A los 10 días los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso) fueron: 5.60g/L, 6.90g/L, 5.80g/L y 7 g/L. En el día 20, los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso) fueron: 4.8g/L, 6g/L, 5.5g/L, y 6 g/L. En el día 30. los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso) fueron: 4.0g/L, 5.5g/L, 5g/L y 5.2g/L. En el día 40, los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso) fueron: 3.9g/L, 5g/L, 4.6g/L y 4.5g/L. Finalmente en el día 50, los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso) fueron: 2.6g/L, 3.6g/L, 4g/L y 2.7g/L. Conforme avanzan los días el valor de Fe^{+2} (Ión Ferroso) va disminuyendo, mientras que los valores de Fe^{+3} (Ión Férrico) y Fe^{total} (Fierro Total) van incrementándose, esta tendencia se observa en la Tabla 16, (Figura N° 33).

Asimismo este incremento de Fe^{+2} (Ión Ferroso) estuvo relacionado con el aumento de la población bacteriana, en el tiempo 0 la concentración de la población bacteriana era $3.50\text{E}+05$ cel/ml, a los 10 días fue $4.50\text{E}+05$ cel/ml, en el día 20 alcanzó un $6.90\text{E}+05$ cel/ml, en el día 30 $1.04\text{E}+06$ cel/ml mientras que el día 50 se obtuvo $1.54\text{E}+06$ cel/ml, la tendencia ascendente se puede observar en la Figura N°34.

6. DISCUSIÓN

6.1. Muestreo

En esta investigación las muestras se tomaron teniendo en cuenta los criterios de autores como Norberto *et. al* (2015) y Arias *et. al* (2012) quienes describieron las características del lugar de muestreo donde encontraron bacterias biooxidantes. Los criterios a tener en cuenta fueron: los efluentes y drenajes de minas que son caracterizados por su acidez y contenido de metales disueltos con un pH entre 3 y 5. También se observó coloración naranja en las rocas rodeaban el efluente similar al crecimiento de serpentina naranja en las rocas que atravesaban la mina reportado por Jhonson (1998) lo que nos indicaba una posible oxidación natural.

6.2. Enriquecimiento de cultivos

Según las investigaciones realizadas por Quintana *et. al* (2002) y sus colaboradores reportaron crecimiento bacteriano después de 14 días de incubación a T° ambiente con medio 9K, sin embargo en nuestra investigación no se evidenció la presencia de bacterias en cultivos de enriquecimiento con medio 9K y T&K incubados bajo las mismas condiciones, este hecho puede deberse a que la población bacteriana que contenía la muestra era muy baja.

Al mismo tiempo, Arias *et. al* (2012) incubó en agitación 180 rpm a T ° ambiente logrando aislar bacterias biooxidantes sin embargo en nuestra investigación los ensayos llevados a cabo a temperatura ambiente en agitación a 150 rpm no alcanzaron la densidad bacteriana recomendada por Mejia *et. al* (2011) para el aislamiento (10^7 - 10^8 cel/ml), esto quiere decir que este tipo de cultivos requieren una mayor cantidad de oxigenación por agitación en rpm para su desarrollo.

Por otra parte, los investigadores como Jagnow (2003) mencionan que las bacterias acidófilas del género *Thiobacillus* son mesófilas caracterizadas por su evolución favorable con temperatura de 40°C - 50°C según Dopson (1999). Teniendo en cuenta esta investigación se incubó a 40°C y en agitación en shaker (150 rpm), pero estas

condiciones de incubación tampoco lograron un crecimiento bacteriano sostenible. Lo que podría explicarse por la incapacidad de los microorganismos de superar la fase de adaptación o fase Lag donde su metabolismo debió adaptarse a las nuevas condiciones ambientales del medio, debido a la insuficiencia de oxígeno, temperatura o agitación en la etapa de incubación. Además, Abanto (2008) consideró a las bacterias pertenecientes al género *Leptospirillum* como aerobias estrictas por lo que requieren oxígeno para su desarrollo. Por esta razón, en nuestro ensayo los cultivos se incubaron a 40°C, con agitación de 150 rpm y con inyección de aire, se observó un crecimiento sostenido en la población bacteriana que alcanzó la densidad poblacional necesaria para el aislamiento y se mantuvo los que nos podría indicar que estas son las condiciones de incubación adecuadas.

Por otro lado, Esparza (2015) determinó que las bacterias extremo acidófilas presentan un crecimiento poblacional lento (días-semanas) por esta razón en este ensayo el conteo bacteriano se llevó a cabo cada 24 horas.

6.3. Aislamiento de cultivo bacteriano

En la etapa de aislamiento de esta investigación se ha llevado cabo a T° ambiente en donde se observó crecimiento de 15 a 22 días, sin embargo, Arias *et. al* (2012) incubaron a 28°C el crecimiento fue a 5 días lo cual explica el lento desarrollo de las colonias sembradas en esta investigación a la falta de uso de una incubadora.

Respecto al método de sembrado algunos autores recomiendan sembrar por estría y extensión, entre estos dos métodos el mejor desarrollo se observó con el método por extensión lo que corrobora los trabajos realizados por Starosvetsky *et. al* (2013). Mientras que el método de siembra por estría solo creció el 20% lo que corrobora los métodos de siembra por estría sencilla utilizado por Corrales (2006) quien reportó un bajo desarrollo de colonias por este método.

Por otro lado, el mayor número de colonias bacterianas reportadas en placas con medio 9K fue 336 que es menor al número de colonias bacterianas encontradas en placas con medio 9K modificado, una de las probables causas es que el agente gelificante Agar-agar está compuesto por 70% agarosa que es un polímero lineal sólido libre de sulfatos

y 30% agaropectina que es producto de un alga y que posee entre sus componentes sales que pudieron afectar el metabolismo de las bacterias dificultando el desarrollo de las colonias bacterianas, ya que crearon un ambiente de estrés en el medio sólido. A diferencia del medio 9k modificado que utilizo solo agarosa que es un gelificante neutral que no tiene compuestos extras ni sales, brindando así un medio más accesible para el desarrollo de las bacterias inoculadas. Este hecho corrobora lo mencionado por Johnson *et. al* (2005) quien en sus investigaciones observa que la metodología de siembra de doble capa resulta útil para aumentar la eficiencia en el crecimiento de organismos quimiolitotrofos cultivables que fueran sensibles a los compuestos orgánicos resultantes de la hidrólisis que sufre la agarosa a bajos valores de pH.

Seguidamente si observamos el medio sólido 9K el momento de servir tenía una coloración transparente en cambio con el paso del tiempo de incubación el medio 9K presentó un cambio de color (naranja- amarillo) lo que evidencia la oxidación del sulfato ferroso presente en el medio a sulfuro férrico.

6.4. Identificación microscópica

En esta investigación las bacterias que fueron expuestas a coloración Gram muestran bacillus pleomórficos que coinciden con las investigaciones de Quintana *et. al* (2002) en su forma y naturaleza gram negativa reportada para bacterias biooxidantes , además son similares a las fotografías de Arias *et. al* (2012) en las que se observa microorganismos de forma bacilar y color fucsia debido que este tipo de bacterias tiene dos capas celulares entre las cuales se encuentra el peptidoglucano y a la acción de un colorante orgánico con este último. Asimismo, en estas láminas también se observaron presencia de residuos de safranina y cristal violeta que ya han sido reportadas en esta clase de ensayos.

Por otro lado, el crecimiento en medio sólido resulto sencillo lo que contradice a Rossi (1990) quien encontró dificultades al implementar el crecimiento en este tipo de medio. De los tres tipos de colonias presentes en el medio 9K la F1 presentó una morfología característica de *At. ferroxidans* según las previas descripciones de Jhonson *et al.* (2005) y a las fotografías de Corrales *et. al* (2006), en las investigaciones de realizadas por Osorio *et. al* (2007) describe la formación de colonias grandes y algodonosas,

translucidas e irregulares que coinciden en morfología con las colonias tipo F2 obtenidas en nuestro ensayo, mientras que la colonia F3 que creció formando una morfología plana, granular e irregular no coincide con ninguna descripción previa. Sin embargo, la presente investigación nos permitió reconocer un bacilo acidófilo, mesófilo con la capacidad de oxidar hierro lo que nos sugiere que este microorganismo aislado es de la especie *At. ferroxidans*. La presencia de colonias con diferentes morfologías sugeriría la existencia del polimorfismo mencionado por Karavaiko *et al* (2003) quien explica que esta variedad de formas es producto del polimorfismo genético previamente observado en esta especie en sus investigaciones.

Finalmente, la presencia de cristales en el medio puede deberse al pH del medio utilizado en esta investigación como lo explica Arias *et al* (2012) quien reporta que el pH ideal rodea el 1.8 ya que cuando el medio es más ácido provoca precipitación de insolubles.

6.5. Determinación del proceso de bio-oxidación

En la determinación de biooxidación de esta investigación se calculó la cantidad de Fe^3 presente en el cultivo a lo largo de 50 días y se observó que la cantidad de Fe^2 disminuía y el Fe^3 aumentaba, lo que corrobora las investigaciones realizadas por Gleysner *et. al* (2006) donde mencionan que los biorreactores con pirita, siendo este último mineral el que provee de sulfato ferroso a la solución, es oxidada a Fe^3 y que existe una correlación entre la concentración de este ión y el oxígeno disuelto de la solución. Asimismo, la concentración bacteriana está también correlacionada con la liberación de ion férrico lo que coincide con los resultados en las investigaciones de Pesic *et al.* (1989) y sus colaboradores quienes indicaron que la concentración bacteriana de *A. ferroxidans*, ion férrico, oxígeno e ion hidrógeno son directamente proporcionales.

7. CONCLUSIONES

Se logró aislar cepas nativas compatibles con el género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* del efluente minero de Recuay Huaraz.

Las cepas aisladas revelan actividad oxidativa de sulfuros, mediante la reducción de 8 g/L de ion ferroso a 2.6 g/L y el aumento de 1.5 g/L de ion férrico a 32.4 g/L, después de 50 días de monitoreo.

Se logró obtener $9.33E+06$ cel/ml durante el enriquecimiento en el tratamiento 1 que es mayor a la concentración bacteriana obtenida con los tratamientos 2,3,4,5,6,7 y 8 que fue $4.00E+04$, $8.00E+04$, $8.00E+05$, $1.58E+06$, $2.00E+04$, $2.00E+04$ y $8.80E+05$ respectivamente.

El mejor método de siembra fue por extensión ya que produjo un 50% y 80% de placas con presencia de desarrollo bacteriano a diferencia del método de siembra por estría simple en el que se obtuvo un 10% y 30% de placas con presencia de crecimiento bacteriano.

En el medio 9K con agarosa se desarrollaron en promedio 935 UFC/ml que es mucho mayor a las 342 UFC/ml obtenidas en el medio 9K con agar-agar.

Los parámetros controlados bajo los que se evidenció bioxidación bacteriana fueron en agitación (shaker) a 150 rpm a 40°C de temperatura y la inyección de aire.

8. RECOMENDACIONES

Llevar a cabo el conteo bacteriano de células/mililitro haciendo uso de una cámara de Petroff – Hausser que es específico para suspensiones bacterianas.

Filtrar las muestras recolectadas del efluente y del enriquecimiento para evitar la presencia de cristales y precipitados durante la coloración gram.

Medir la concentración de oxígeno disuelto en las soluciones durante la determinación de bioxidación.

Realizar caracterización molecular para determinar la pertenencia de las bacterias aisladas a los géneros *Acidithiobacillus* o *Leptospirillum*.

Agregar un indicador de pH al medio sólido para facilitar la detección de crecimiento bacteriano.

Evaluar la capacidad bio-oxidativa de las cepas aisladas en relaves mineros sulfurados (calcopirita).

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Alpaca M. Biolixiviación nueva: La opción Metalúrgica. Revista de instituto de investigación de la facultad de geología, minas, metalurgia y ciencias geográficas [Internet].1998, diciembre [agosto 2016]; I(2)[6 pantallas]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/publicaciones/geologia/v01_n2/biolix.htm
2. Arias V, Rodríguez C, Ramírez P, Nonones E, Salazar D, Gil J, Paredes J, Jamanca G. Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. Rev del Instituto de Investigación (RIIGEO). 2012;15(30):59–66.
3. Ballester A.Mecanismos de la biolixiviación. En: Acevedo F, Gentina J.Fundamentos y perspectivas de tecnologías biomineras. Chile: Ediciones universitarias de Valparaíso; 2005.pp.9-24
4. Corrales LC, Sánchez LC, Sánchez PS, Sánchez AS, Sánchez V. Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del Departamento de Boyacá. Nova - Publicación Científica ISSN 1794-2470. 2006;4(5):57–63.
5. Eco-sitio. Portal de Medio Ambiente y Ecología. Contaminación del agua a causa de la minería [Internet]. Argentina, 2009. Disponible en: <http://www.eco-sitio.com.ar/node/1000>
6. Esparza Mantilla M, Biotecnología minera y lixiviación microbiana [diapositiva].Universidad de Antofagasta, Chile ;2014.[6 juegos de 50 diapositivas]
7. Gleisner M, Herbert R, Frogner P. Pyrite oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* at various concentrations of dissolved oxygen. Chemical Geology 225 (2006)16-29.

8. Herrera P, Millones O; ¿Cuál es el costo de la contaminación ambiental minera sobre los recursos hídricos del Perú? N° 321; Lima, PUC Departamento de Economía 2011.10 – 25
9. Hocheng H, Chang JH, Hsu HS, Han HJ, Chang YL, Jadhav UU. Metal removal by *Acidithiobacillus ferrooxidans* through cells and extra-cellular culture supernatant in biomachining. CIRP J Manuf Sci Technol. 2012;5:137–141.
10. Huber G, Huber H, Stetter O. Isolation and characterization of new metal-mobilizing bacteria. Biotechnology and Bioengineering. 1986; Symp No. 16: 239-251.
11. Informe de Moody's. Calidad crediticia de empresas peruanas se mantendrá estable hasta fines del 2017 [artículo]. Gestión 2016 agosto 2; sección "Negocios":4-5.
12. Johnson, D. Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. Journal of Microbiological Methods. 1995; 23(2): 205-218.
13. Johnson D, Hallberg K. The microbiology of acidic mine waters. Research in Microbiology. 2003;(154) 466-473.
14. Johnson D, Okibe N, Hallberg K. Differentiation and identification of iron-oxidizing acidophilic bacteria using cultivation techniques and amplified ribosomal DNA restriction enzyme analysis. Journal of Microbiological Methods. 2005; 60 (3): 299-313.
15. Karavaiko G, Smolskaja L, Golyshina O, Jagovkina M, Egorova E. Bacterial pyrite oxidation: Influence of morphological, physical and chemical properties. Rusia, Moscu. Fuel Processing Technology 40, Elsevier 1994 p.151-165.
16. Karavaiko G, Turova T, Kondrat'eva T, Lysenko A, Kolganova T, Ageeva S, Muntyan L, Pivovarova T. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003; 53: 113-119.

17. Ly Arrascue M, Perspectivas de la biominería en el Perú. En: 1er Congreso de biotecnología. Universidad Cayetano Heredia.2009, Mayo, Lima.
18. Mejía E, Ospina J.D, Osorno B, Márquez M, Morales A. Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS_2), esfalerita (ZnS) y galena (PbS).Rev. Colomb. Biotecnol. 2011; XIII(1):132–143.
19. [MEF] Ministerio de Economía y Finanzas, Marco macroeconómico mundial 2016-2018, Aprobado en sesión de consejos de ministros. República del Perú; 2015.Pag. 28-35.
20. Ossa DM, Márquez MA. Biooxidación de sulfuros mediante cepas nativas de acidófilos compatibles con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *thiooxidans*, mina de oro El Zancudo (Titiribí, Colombia). Rev Colomb Biotecnol. 2005;VII(2):55–66.
21. Osorio V, Márquez E, Márquez M. Caracterización por Ardea de microorganismos acidófilos aislados en minas de oro de Marmato, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología. 2007; IX (1): 14-21.
22. Pérez N, Vásquez A, García-Páez I. Adaptación de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* a partir de drenajes ácidos de minas de carbón para su uso en la recuperación de oro diseminado en concentrados gravimétricos. En: II Semana Internacional, X Semana de Ciencia, Tecnología e Innovación. San José de Cúcuta: Universidad Francisco de Paula Santander; 2005. p. 81–85.
23. Quintana M, Ly M, Bauer J, Espinoza M. 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. Inf Científico Tecnológico ISSN 1684-1662. 2004;4:166–171.
24. Quintana M, Ly M, Bauer J, Montoya Y, Comallonga L, Vassel B, et al. Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos biooxidantes de arsenopirita. Inf Científico Tecnológico ISSN 1684-1662. 2002;2:142–146.

25. Rivera RE, Camejo PY, Moya FJ, López-Méndez JL, Munguía-Bravo M. Estudio de biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias Tio- y Ferro-oxidantes en condiciones termófilas. Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Atacama Chile. 2011; 26:65–73.
26. Rossi G. Biohydrometallurgy. Hamburg; Mc Graw-Hill.1990.
27. Sand W, Rohde K, Sobotke B, Zenneck C. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. Appl Environ Microbiol. 1992;58(1):85–92.
28. Schippers A. Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid-based molecular methods for their identification and quantification. En: Donati E, Sand W. Microbial processing of metal sulfides. Alemania, Hannover: Springer 2007.pp.3 -33.
29. Starosvetsky J, Zukerman U, Armon RH. A simple medium modification for isolation, growth and enumeration of *Acidithiobacillus thiooxidans* (syn. *Thiobacillus thiooxidans*) from water samples. J Microbiol Methods. 2013;92:178–182.
30. Sugio T, Wakabayashi M, Kanao T, Takeuchi F. Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain D3-2 active in copper bioleaching from a copper mine in Chile. Biosci Biotechnol Biochem. 2008;72(4):998–1004.
31. Zarate H. Ganancias de empresas mineras se redujeron en S/4,359 mlls [artículo]. Gestión 2013 marzo 6; sección "Empresas". Disponible en: <http://gestion.pe/empresas/ganancias-empresas-mineras-se-redujeron-s4359-mlls-2060755>

10. ANEXOS

10.1. Cuadros

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en el enriquecimiento bacteriano de microorganismos biooxidantes.

Tratamiento	Descripción
1	Medio 9K-Agitación (150 rpm)-Temperatura (40°C)-Suplementado con Oxígeno
2	Medio 9K-Agitación (150 rpm)-Temperatura (40°C)
3	Medio 9K-Agitación (150 rpm)
4	Medio 9K-Temperatura(40°C) - Suplementado con Oxígeno

5	Medio T&K-Agitación (150 rpm)-Temperatura (40°C)-Suplementado con Oxígeno
6	Medio T&K -Agitación (150 rpm)-Temperatura(40°C)
7	Medio T&K -Agitación (150 rpm)
8	Medio T&K-Temperatura (40°C)-Suplementado con Oxígeno

10.2.Tablas

Tabla 1. Composición del medio 9K Líquido.

Medio 9K líquido (250 ml)	
0.025 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
0.01 g	K ₂ HPO ₄
0.025 g	MgSO ₄ . 7H ₂ O
9 g	Fe ₂ SO ₄ . 7H ₂ O
250 ml	Agua destilada

Tabla 2. Composición del medio T&K líquido.

Medio T&K líquido (250ml)	
0.5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
0.125 g	K ₂ HPO ₄
0.125 g	MgSO ₄
0.025 g	KCl
0.025 g	Ca(NO ₃) ₂
2 g	FeSO ₄ . 7H ₂ O
250 ml	Agua destilada

Tabla 3. Composición del medio 9K sólido.

Medio 9K sólido (1L)		
Solución A	3 g	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0.1 g	KCl
	0.5 g	K ₂ HPO ₄
	0.5 g	MgSO ₄ . 7H ₂ O
	0.01 g	Ca(NO ₃) ₂
	700 ml	Agua destilada
	20 - 24 g	Agar
Solución B	44.2 g	FeSO ₄ . 7H ₂ O
	300 ml	Agua destilada

Tabla 4. Medios de cultivos evaluados en el aislamiento bacteriano de microorganismos biooxidantes.

Medio	Descripción del Medio de Aislamiento
Medio 1	Medio 9K + Agar Agar
Medio 2	Medio 9K + Agarosa

Tabla 5. Datos de pH y temperatura (°C) monitoreados en cada fecha de muestreo.

Fecha de Muestreo	pH	Temperatura(°C)
13/08/2016	3	15
13/08/2016	2.98	18
13/08/2016	3.05	16

Tabla 6. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 1.*

Horas de Incubación	de Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas en Cámara de Newbauer ***A=0.1cm ²	de Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₁		11	1.10E+05
48	T ₁		24	2.40E+05
72	T ₁		26	2.60E+05
96	T ₁		28	2.80E+05
120	T ₁		32	3.20E+05
144	T ₁		80	8.00E+05
168	T ₁		69	6.90E+05
192	T ₁		130	1.30E+06
216	T ₁		162	1.62E+06
240	T ₁	Medio 9K**+Agitación en shaker (150rpm)+Temp.	220	2.20E+06
264	T ₁	40°C+ Inyección de O ₂	264	2.64E+06
288	T ₁		248	2.48E+06
312	T ₁		205	2.05E+06
336	T ₁		253	2.53E+06
360	T ₁		366	3.66E+06
384	T ₁		632	6.32E+02
408	T ₁		636	6.36E+06
432	T ₁		933	9.33E+06
456	T ₁		522	5.22E+06
480	T ₁		226	2.26E+06

* Tratamiento 1: Medio 9K+Agitación en shaker (150 rpm)+Temperatura 40°C+Inyección Oxígeno

**Medio 9K: 0.025g (NH₄)₂SO₄, 0.01 g K₂HPO₄, 0.025 g MgSO₄. 7H₂O, 9 g Fe₂SO₄. 7H₂O, 250 ml Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 7. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 2.*

Horas de Incubación	de Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas en Cámara Newbauer *** A=0.1cm ²	Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₂		2	2.00E+04
48	T ₂		3	3.00E+04
72	T ₂		4	4.00E+04
96	T ₂		2	2.00E+04
120	T ₂		0	0.00E+00
144	T ₂		0	0.00E+00
168	T ₂		0	0.00E+00
192	T ₂		0	0.00E+00
216	T ₂		0	0.00E+00
240	T ₂	Medio 9K**+Agitación en shaker (150rpm)+Temp. 40°C	0	0.00E+00
264	T ₂		0	0.00E+00
288	T ₂		0	0.00E+00
312	T ₂		0	0.00E+00
336	T ₂		0	0.00E+00
360	T ₂		0	0.00E+00
384	T ₂		0	0.00E+00
408	T ₂		0	0.00E+00
432	T ₂		0	0.00E+00
456	T ₂		0	0.00E+00
480	T ₂		0	0.00E+00

* Tratamiento 2: Medio 9K+Agitación en shaker (150 rpm) + Temperatura 40°C

**Medio 9K: 0.025g (NH₄)₂SO₄, 0.01 g K₂HPO₄, 0.025 g MgSO₄. 7H₂O, 9 g Fe₂SO₄. 7H₂O, 250 ml Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 8. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 3.*

Horas de Incubación	de Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas en Cámara de Newbauer ***A=0.1cm ²	de Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₃		2	2.00E+04
48	T ₃		2	2.00E+04
72	T ₃		4	4.00E+04
96	T ₃		5	5.00E+04
120	T ₃		7	7.00E+04
144	T ₃		8	8.00E+04
168	T ₃		0	0.00E+00
192	T ₃		0	0.00E+00
216	T ₃		0	0.00E+00
240	T ₃	Medio 9K** + Agitación en shaker (150 rpm)	0	0.00E+00
264	T ₃		0	0.00E+00
288	T ₃		0	0.00E+00
312	T ₃		0	0.00E+00
336	T ₃		0	0.00E+00
360	T ₃		0	0.00E+00
384	T ₃		0	0.00E+00
408	T ₃		0	0.00E+00
432	T ₃		0	0.00E+00
456	T ₃		0	0.00E+00
480	T ₃		0	0.00E+00

* Tratamiento 3: Medio 9K + Agitación en shaker (150 rpm)

**Medio 9K: 0.025g (NH₄)₂SO₄, 0.01 g K₂HPO₄, 0.025 g MgSO₄. 7H₂O, 9 g Fe₂SO₄. 7H₂O, 250 ml Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 9. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 4.*

Horas de Incubación	de Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas en Cámara de Newbauer*** A=0.1cm ²	de Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₄		4	4.00E+04
48	T ₄		7	7.00E+04
72	T ₄		9	9.00E+04
96	T ₄		16	1.60E+05
120	T ₄		17	1.70E+05
144	T ₄		10	1.00E+05
168	T ₄		10	1.00E+05
192	T ₄		80	8.00E+05
216	T ₄		23	2.30E+05
240	T ₄	Medio 9K** + Temp. 40°C + Inyección de O ₂	22	2.20E+05
264	T ₄		20	2.00E+05
288	T ₄		18	1.80E+05
312	T ₄		10	1.00E+05
336	T ₄		8	8.00E+04
360	T ₄		0	0.00E+00
384	T ₄		0	0.00E+00
408	T ₄		0	0.00E+00
432	T ₄		0	0.00E+00
456	T ₄		0	0.00E+00
480	T ₄		0	0.00E+00

*Tratamiento 4: Medio 9K + Temperatura 40°C + Inyección de Oxígeno

**Medio 9K: 0.025g (NH₄)₂SO₄, 0.01 g K₂HPO₄, 0.025 g MgSO₄. 7H₂O, 9 g Fe₂SO₄. 7H₂O, 250 ml Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 10. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 5.*

Horas de Incubación	Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas en Cámara de Newbauer ***A=0.1cm ²	Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₅		7	7.00E+04
48	T ₅		10	1.00E+05
72	T ₅		18	1.80E+05
96	T ₅		23	2.30E+05
120	T ₅		29	2.90E+05
144	T ₅		10	1.00E+05
168	T ₅		15	1.50E+05
192	T ₅		93	9.30E+05
216	T ₅		150	1.50E+06
240	T ₅	Medio T&K**+ Agitación en shaker (150rpm) + Temp.	155	1.55E+06
264	T ₅	40°C+ Inyección de O ₂	158	1.58E+06
288	T ₅		126	1.26E+06
312	T ₅		120	1.20E+06
336	T ₅		98	9.80E+05
360	T ₅		80	8.00E+05
384	T ₅		115	1.15E+05
408	T ₅		95	9.50E+05
432	T ₅		98	9.80E+05
456	T ₅		90	9.00E+05
480	T ₅		70	7.00E+05

*Tratamiento 5: Medio T&K + Agitación en shaker (150rpm)+ Temperatura 40°C + Inyección de Oxígeno

** Medio T&K: 0.5 g (NH₄)₂ SO₄, 0.125 g K₂HPO₄, 0.125 g MgSO₄, 0.025 g KCl, 0.025 g Ca(NO₃)₂, 2 g FeSO₄ · 7H₂O, Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 11. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 6.*

Horas de Incubación	de Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas Cámara Newbauer*** A=0.1cm ²	de Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₆		2	2.00E+04
48	T ₆		2	2.00E+04
72	T ₆		2	2.00E+04
96	T ₆		1	1.00E+04
120	T ₆		0	0.00E+00
144	T ₆		0	0.00E+00
168	T ₆		0	0.00E+00
192	T ₆		0	0.00E+00
216	T ₆		0	0.00E+00
240	T ₆	Medio T&K** +Agitación en shaker (150 rpm)+Temp. 40°C	0	0.00E+00
264	T ₆		0	0.00E+00
288	T ₆		0	0.00E+00
312	T ₆		0	0.00E+00
336	T ₆		0	0.00E+00
360	T ₆		0	0.00E+00
384	T ₆		0	0.00E+00
408	T ₆		0	0.00E+00
432	T ₆		0	0.00E+00
456	T ₆		0	0.00E+00
480	T ₆		0	0.00E+00

*Tratamiento 6: Medio T&K + Agitación en shaker (150 rpm) + Temperatura 40°C

** Medio T&K: 0.5 g (NH₄)₂ SO₄, 0.125 g K₂HPO₄, 0.125 g MgSO₄, 0.025 g KCl, 0.025 g Ca(NO₃)₂, 2 g FeSO₄ . 7H₂O, Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 12. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 7.*

Horas de Incubación	de Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas en Cámara Newbauer*** A=0.1cm ²	Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₇		2	2.00E+04
48	T ₇		2	2.00E+04
72	T ₇		2	2.00E+04
96	T ₇		1	1.00E+04
120	T ₇		1	1.00E+04
144	T ₇		1	1.00E+04
168	T ₇		0	0.00E+00
192	T ₇		0	0.00E+00
216	T ₇		0	0.00E+00
240	T ₇	Medio T&K** + Agitación en shaker (150 rpm)	0	0.00E+00
264	T ₇		0	0.00E+00
288	T ₇		0	0.00E+00
312	T ₇		0	0.00E+00
336	T ₇		0	0.00E+00
360	T ₇		0	0.00E+00
384	T ₇		0	0.00E+00
408	T ₇		0	0.00E+00
432	T ₇		0	0.00E+00
456	T ₇		0	0.00E+00
480	T ₇		0	0.00E+00

*Tratamiento 7: Medio T&K+ Agitación en shaker (150 rpm)

** Medio T&K: 0.5 g (NH₄)₂ SO₄, 0.125 g K₂HPO₄, 0.125 g MgSO₄, 0.025 g KCl, 0.025 g Ca(NO₃)₂, 2 g FeSO₄ · 7H₂O, Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 13. Concentración bacteriana (cel/ml) obtenido cada 24 horas con el Tratamiento 8.*

Horas de Incubación	Tratamiento	Descripción del Tratamiento	Número de Bacterias contadas en Cámara de Newbauer*** A=0.1cm ²	Concentración de Bacteriana cel/ml
24	T ₁₀		3	3.00E+04
48	T ₁₀		5	5.00E+04
72	T ₁₀		6	6.00E+04
96	T ₁₀		7	7.00E+04
120	T ₁₀		8	8.00E+04
144	T ₁₀		8	8.00E+04
168	T ₁₀		12	1.20E+05
192	T ₁₀		67	6.70E+05
216	T ₁₀		14	1.40E+05
240	T ₁₀	Medio T&K** +Temp. 40°C + Inyección de O ₂	20	2.00E+05
264	T ₁₀		17	1.70E+05
288	T ₁₀		14	1.40E+05
312	T ₁₀		9	9.00E+04
336	T ₁₀		15	1.50E+05
360	T ₁₀		34	3.40E+05
384	T ₁₀		34	3.40E+05
408	T ₁₀		55	5.50E+05
432	T ₁₀		88	8.80E+05
456	T ₁₀		77	7.70E+05
480	T ₁₀		33	3.30E+05

*Tratamiento 8: Medio T&K+ Temperatura 40°C+ Inyección de Oxígeno

** Medio T&K: 0.5 g (NH₄)₂ SO₄, 0.125 g K₂HPO₄, 0.125 g MgSO₄, 0.025 g KCl, 0.025 g Ca(NO₃)₂, 2 g FeSO₄ . 7H₂O, Agua destilada

***Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

Tabla 14. Porcentaje de placas con crecimiento bacteriano y sin crecimiento bacteriano según el medio de cultivo y método de siembra.

Medio de Cultivo	Métodos de siembra	Número de Placas Sembradas	Porcentaje de placas con crecimiento bacteriano (Presencia)	de Porcentaje de placas con crecimiento bacteriano (Ausencia)	de sin Días de incubación
Medio 9K*	Extensión	10	50%	50%	14
	Estría	10	10%	90%	25
Medio 9K modificado**	Extensión	10	80%	20%	7
	Estría	10	30%	70%	8

*Medio 9K: Solución A 3 g (NH₄)₂ SO₄, 0.1 g KCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄· 7H₂O, 0.01 g Ca (NO₃)₂, 700 ml H₂O destilada, 20 - 24 g Agar Agar

Solución B: 44.2 g FeSO₄· 7H₂O, 300 ml H₂O destilada.

**Medio 9K modificado: Solución A: 3 g (NH₄)₂ SO₄, 0.1 g KCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄· 7H₂O, 0.01 g Ca (NO₃)₂, 700 ml H₂O destilada, 10g Agarosa

Solución B: 44.2 g FeSO₄· 7H₂O, 300 ml H₂O destilada.

Tabla 15. Promedio de las Unidades Formadoras de Colonias según el medio de cultivo de aislamiento bacteriano de microorganismo biooxidantes.

Medio de Cultivo	UFC/ml ***
Medio 9K*	317
	335
	355
	340
	365
Promedio	342
Medio 9K modificado*	945
	925
	923
	940
	920
	943
	952
Promedio	935

*Medio 9K: Solución A 3 g (NH₄)₂ SO₄, 0.1 g KCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g Ca (NO₃)₂, 700 ml H₂O destilada, 20 - 24 g Agar Agar
 Solución B: 44.2 g FeSO₄ · 7H₂O, 300 ml H₂O destilada.

**Medio 9K modificado: Solución A: 3 g (NH₄)₂ SO₄, 0.1 g KCl, 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g Ca (NO₃)₂, 700 ml H₂O destilada, 10g Agarosa
 Solución B: 44.2 g FeSO₄ · 7H₂O, 300 ml H₂O destilada.

***UFC/ml: Unidades Formadoras de Colonias (número relativo de microorganismos en un volumen determinado) por cada mililitro.

Tabla 16. Determinación de la Bioxidación durante 50 días según el conteo bacteriano y análisis químico.

Ensayo	Día	CONTEO BACTERIANO		ANÁLISIS QUÍMICO		
		Número de Bacterias en Cámara **Newbauer(cel/ml) A=0.1 cm ²	Concentración Bacteriana Cel/ml	Fe ^{+2***} (g/L)	Fe ^{+3***} (g/L)	Fe ^{total***} (g/L)
Ensayo 1*	0	35	3.50E+05	8.00	1.5	9.50
	10	45	4.50E+05	5.60	12.4	18.00
	20	69	6.90E+05	4.8	17.2	22
	30	104	1.04E+06	4	21.1	25.1
	40	131	1.31E+06	3.9	23.1	27
	50	154	1.54E+06	2.6	32.4	35.00
Ensayo 2*	0	53	5.30E+05	7.10	1.4	8.50
	10	54	5.40E+05	6.90	9.1	16.00
	20	60	6.00E+05	6	11.6	17.6
	30	110	1.10E+06	5.5	14.5	20
	40	140	1.40E+06	5	18	23
	50	166	1.66E+06	3.6	29.40	33.00
Ensayo 3*	0	44	4.40E+05	7.90	1.20	9.10
	10	48	4.80E+05	5.80	11.7	17.50
	20	74	7.40E+05	5.5	15.5	21
	30	108	1.08E+06	5	19	24
	40	136	1.36E+06	4.6	23.4	28
	50	160	1.60E+06	4	34.00	38.00
Ensayo 4*	0	37	3.70E+05	8.1	2.1	10.2
	10	44	4.40E+05	7	10.6	17.6
	20	82	8.20E+05	6	16.3	22.3
	30	111	1.11E+06	5.2	21	26.2
	40	142	1.42E+06	4.5	25.5	30
	50	157	1.57E+06	2.7	37.3	40

* El intervalo de tiempo entre cada uno de los ensayos fue de 2 días. **Cámara de Newbauer *improved*. Marca Boeco. Deep 1/10mm

*** Fe⁺² (Ión Ferroso), Fe⁺³ (Ión Férrico), Fe^{total} (Fierro Total). La unidad de medida es g/L. Estas tres partículas se relacionan de la siguiente manera: Fe⁺² + Fe⁺³ = Fe^{total}

10.3.Figuras



Figura 1. Lugar de muestreo. ▼ Efluentes de aguas residuales de unidades mineras



Figura 2. Mapa del lugar de muestreo



Figura 3. Cooler con gel pack conteniendo las muestras recolectadas



Figura 4. Esterilización en frío de solución B componente del medio de cultivo 9K.

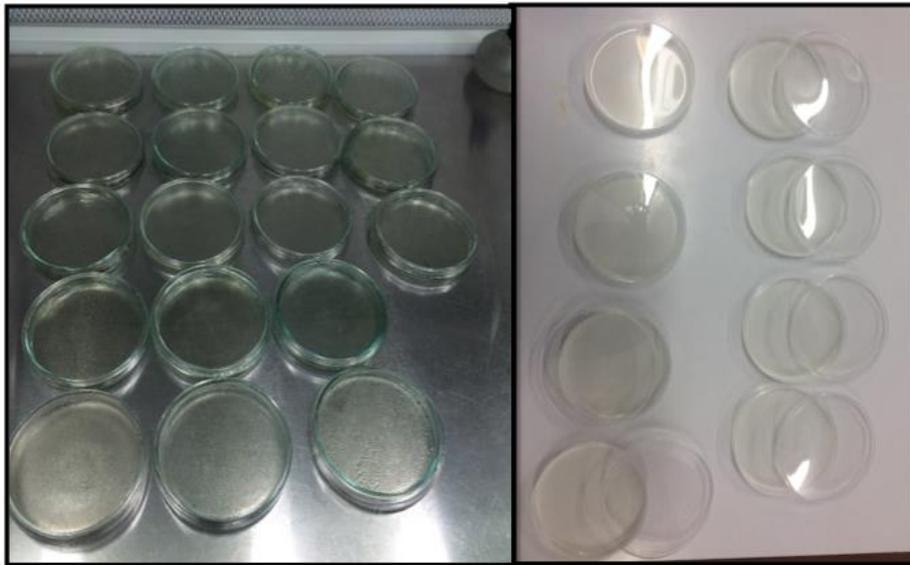


Figura 5. Medios de cultivo 9K con agar-agar y 9K con agarosa.

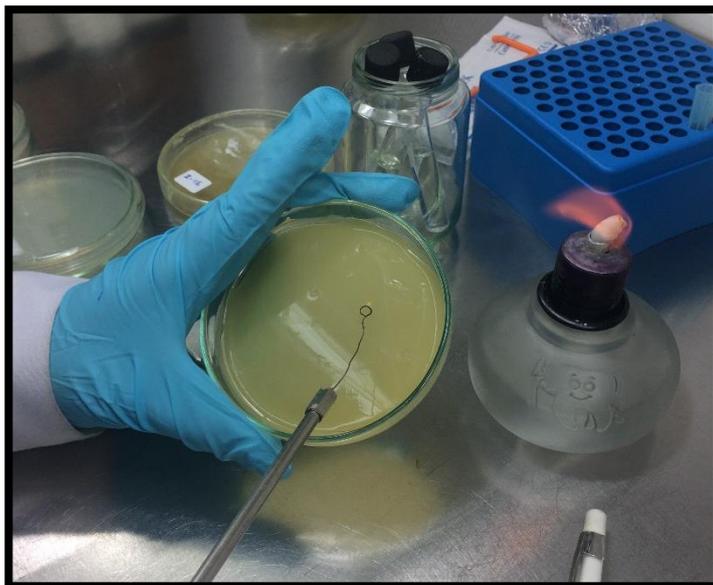


Figura 6. Siembra por método de estría simple

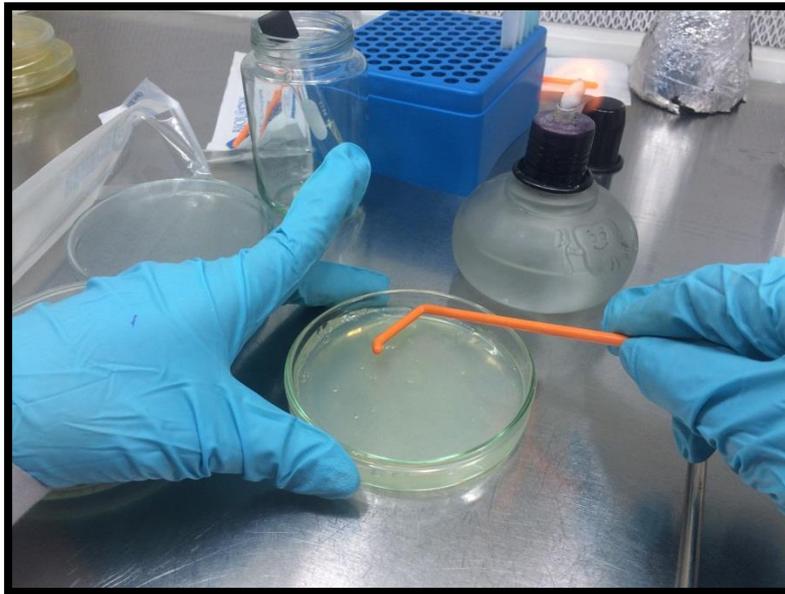


Figura 7. Siembra por método de extensión (Utilización de asa de Drigalski).

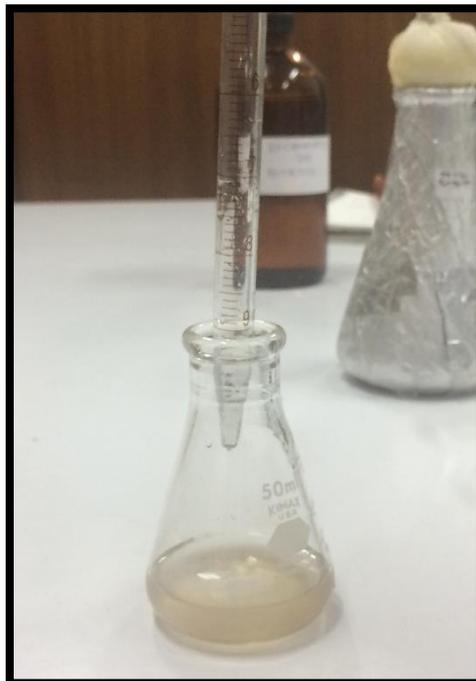


Figura 8. Evaluación química del Fe^{+2} (Ión Ferroso) en la solución en g/L.



Figura 9. Evaluación química del Hierro Total en la solución en g/L.



Figura 10. Zona de muestreo demostrando proceso de oxidación natural.

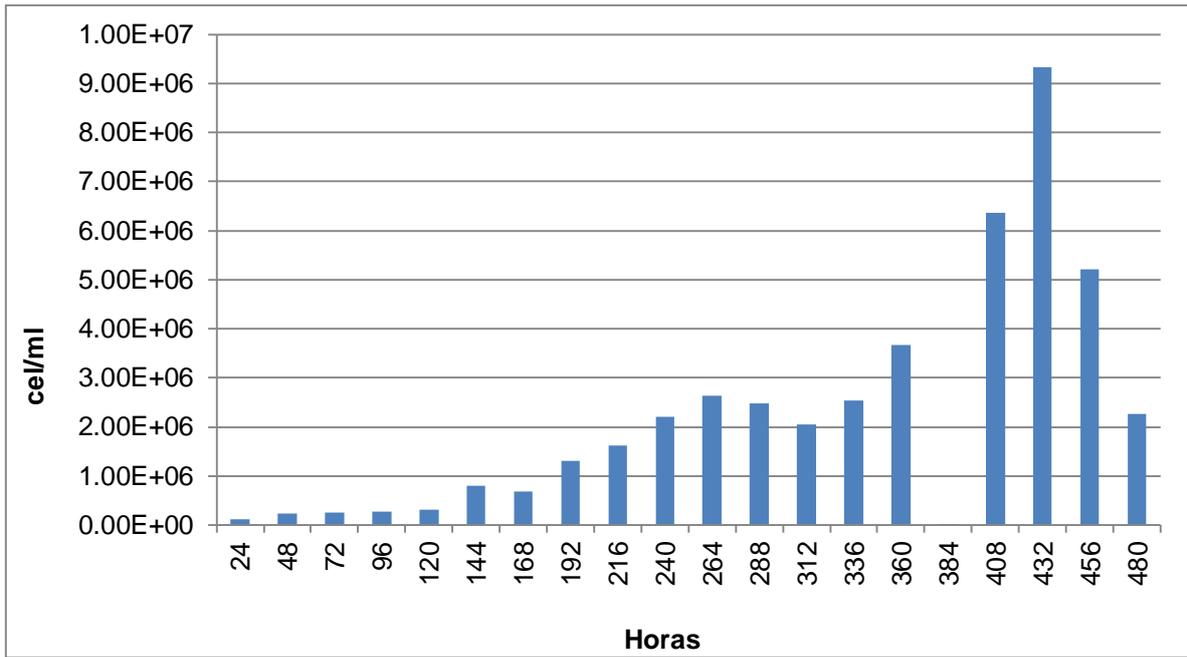


Figura 11 . Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°1: Medio 9K-
Agitación en shaker (150 rpm)-Temperatura 40°C-Inyección de Oxígeno

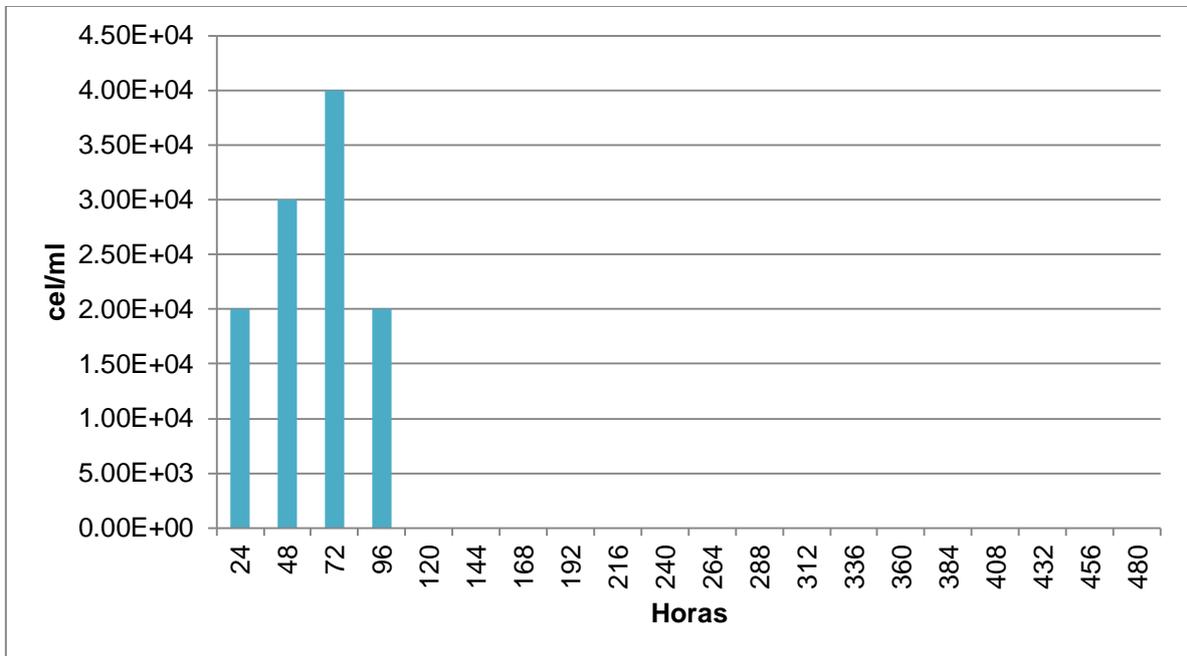


Figura 12. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°2: Medio 9K-
Agitación en shaker (150rpm) -Temperatura 40°C.

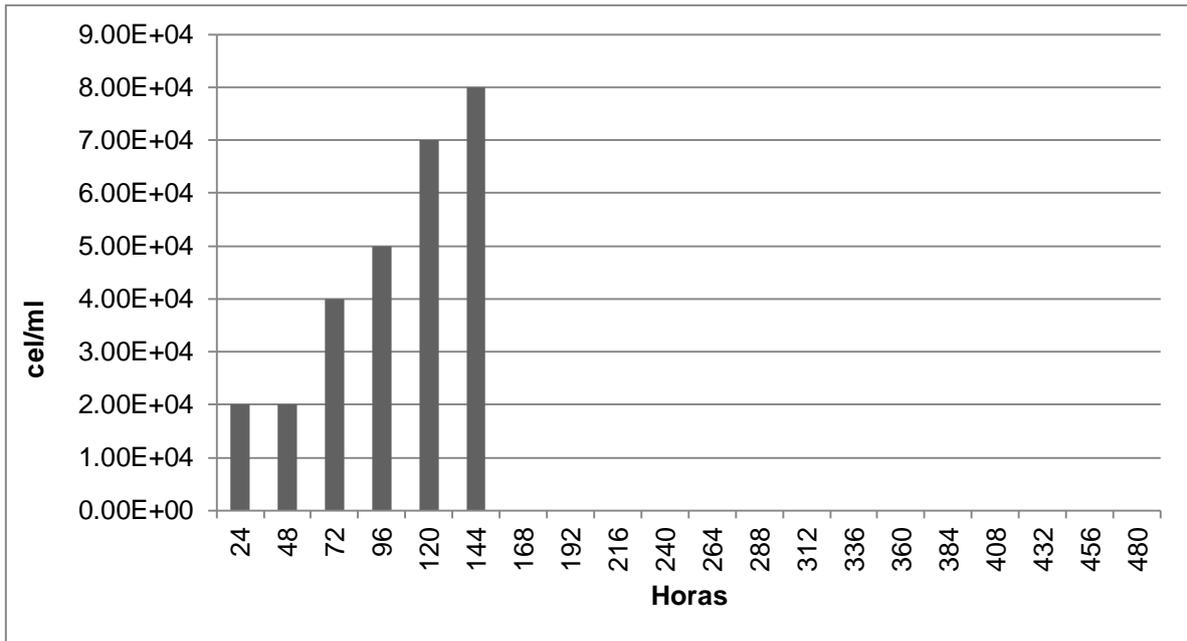


Figura 13. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°3: Medio 9K-
Agitación en shaker (150 rpm).

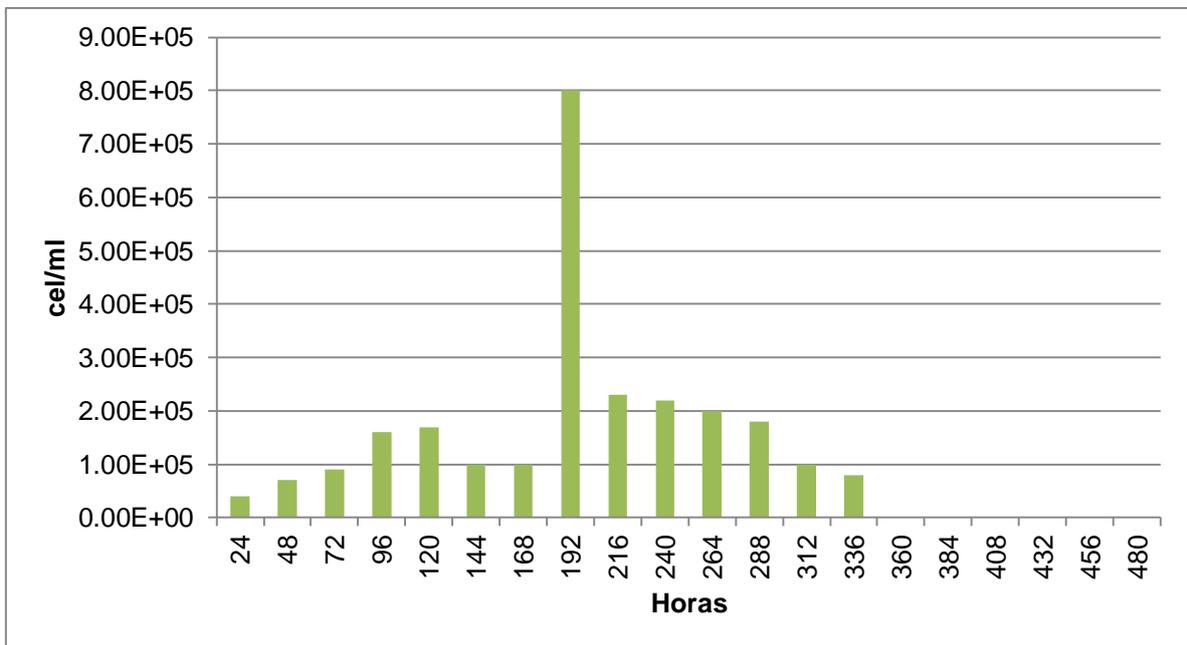


Figura 14. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°4: Medio 9K-
Temperatura 40°C - Inyección de Oxígeno.

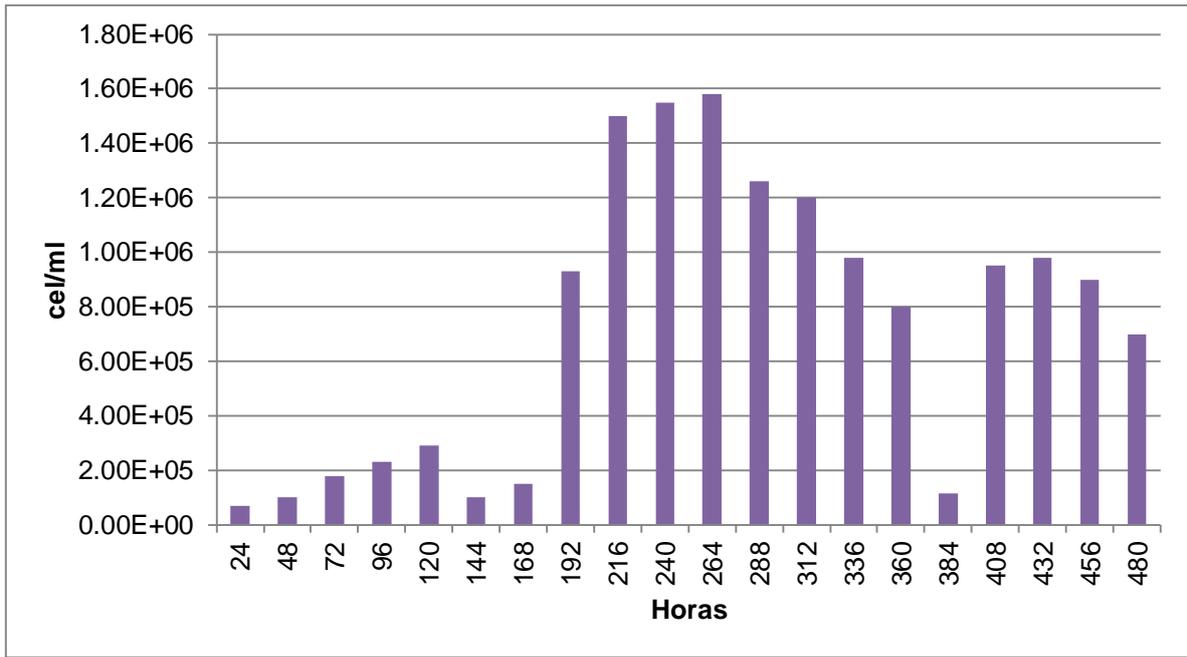


Figura 15. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°5: Medio T&K-
Agitación en shaker (150 rpm)-Temperatura 40°C-Inyección de Oxígeno.

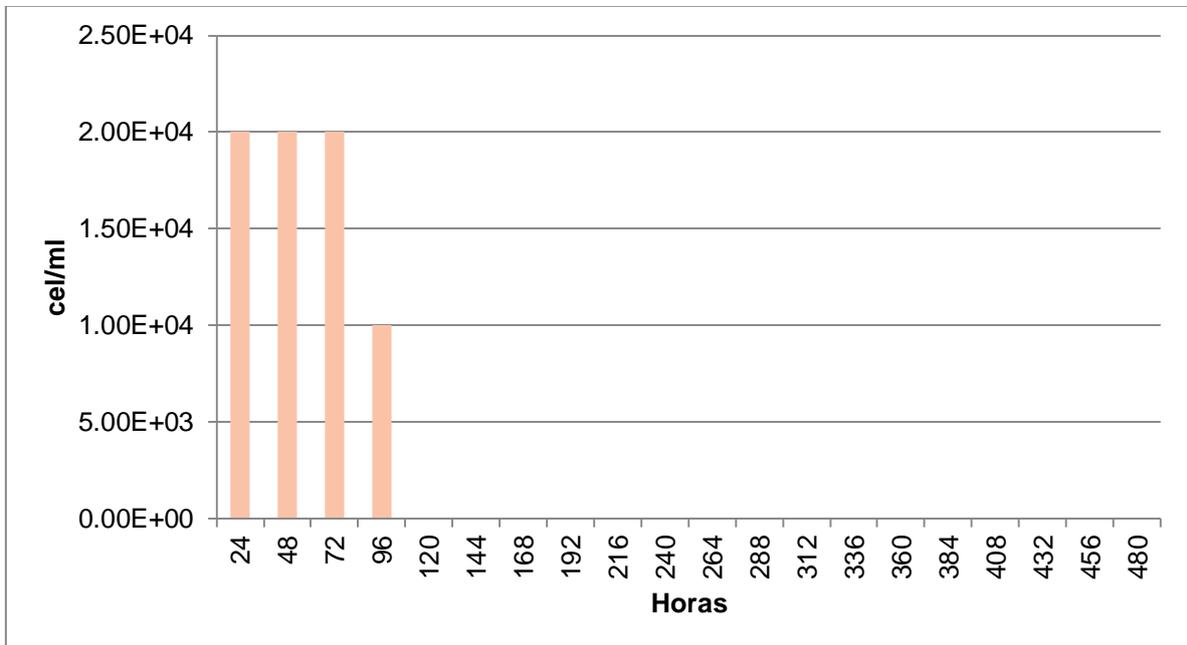


Figura 16 . Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°6: Medio T&K
-Agitación en shaker (150 rpm)-Temperatura 40°C.

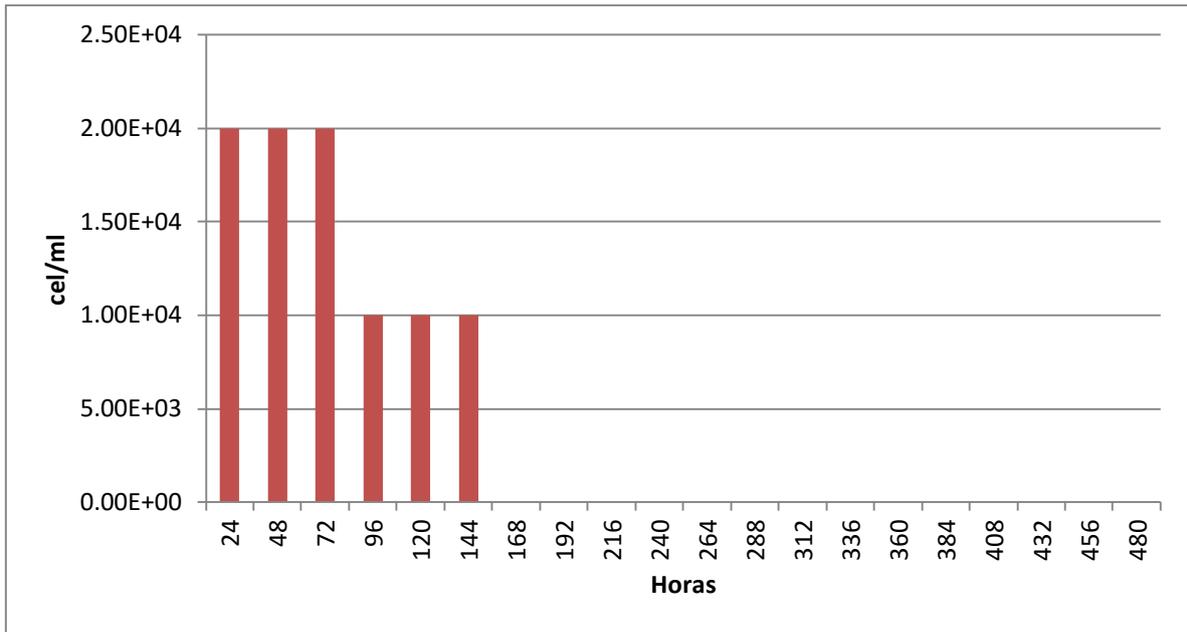


Figura 17. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°7: Medio T&K -Agitación en shaker (150rpm).

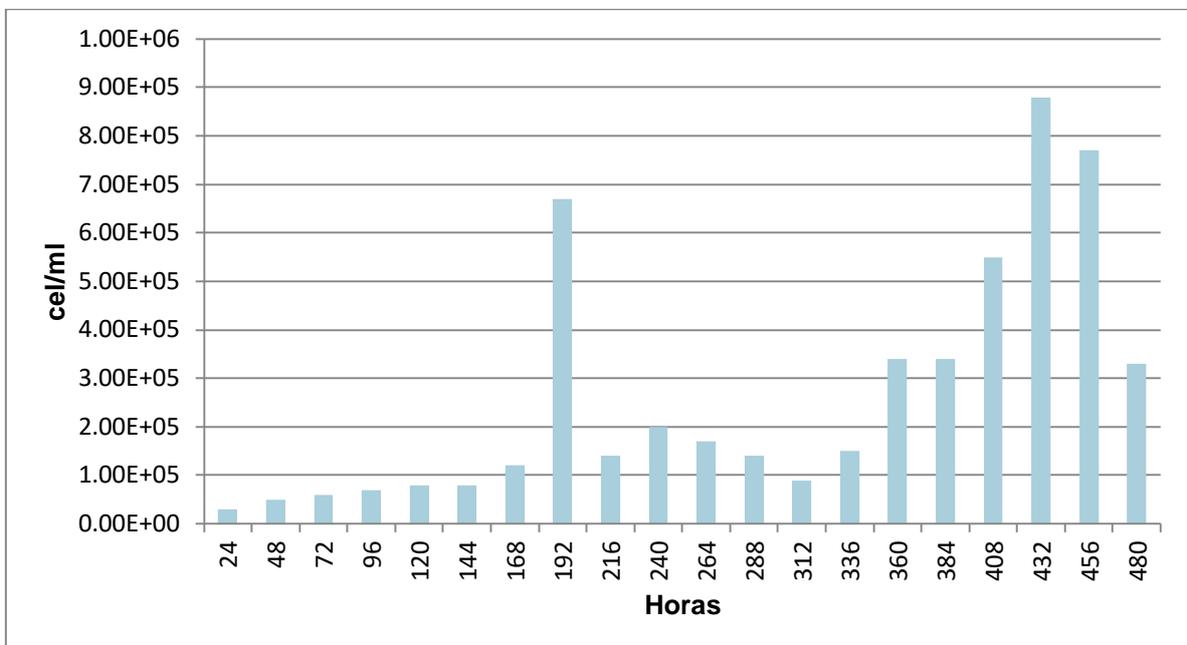


Figura 18. Concentración bacteriana (cel/ml) cada 24 horas en Tratamiento N°8: Medio T&K- Temperatura 40°C- Inyección con Oxígeno.

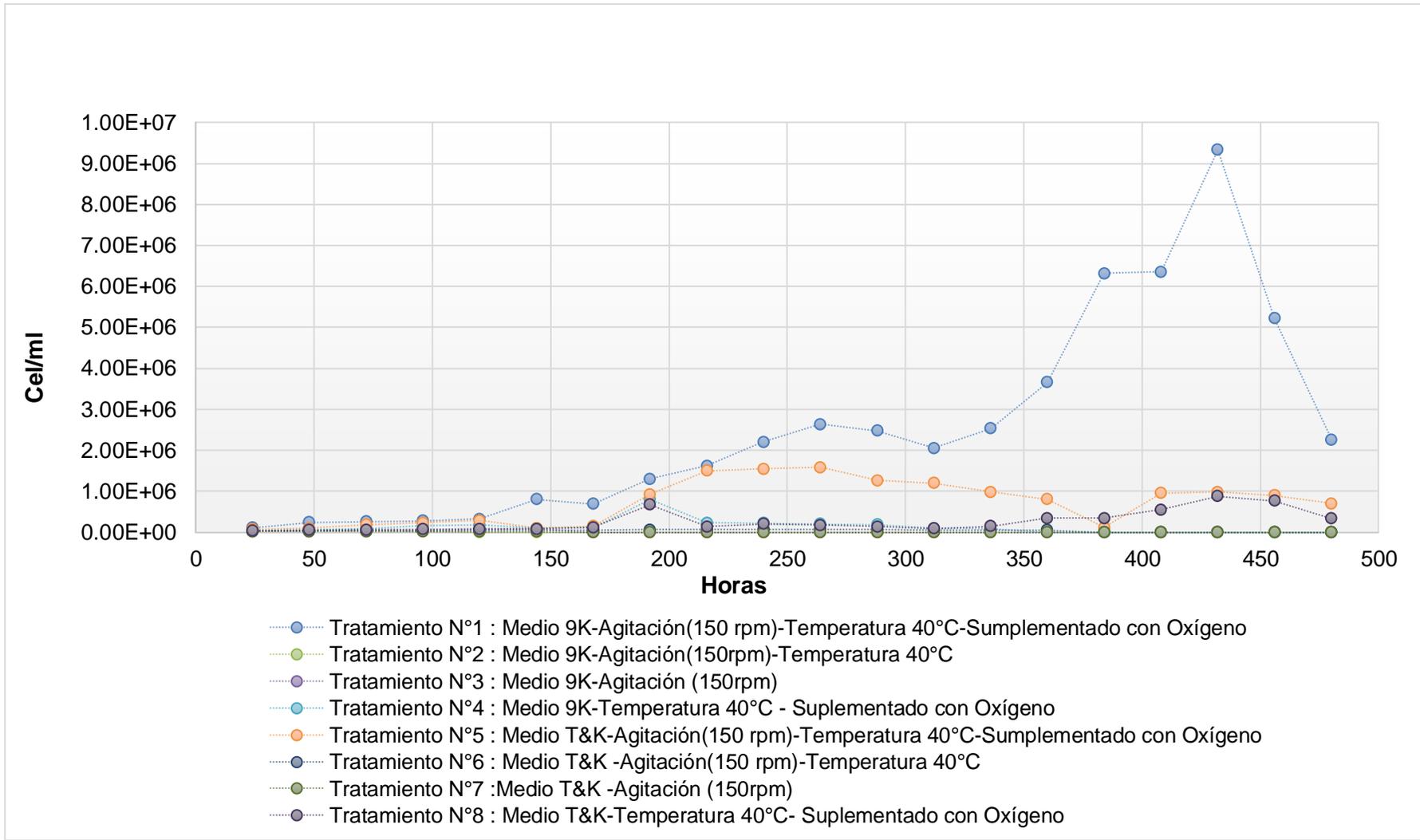


Figura 19. Resumen: Concentración bacteriana (cel/ml) de los 8 tratamientos de enriquecimiento.

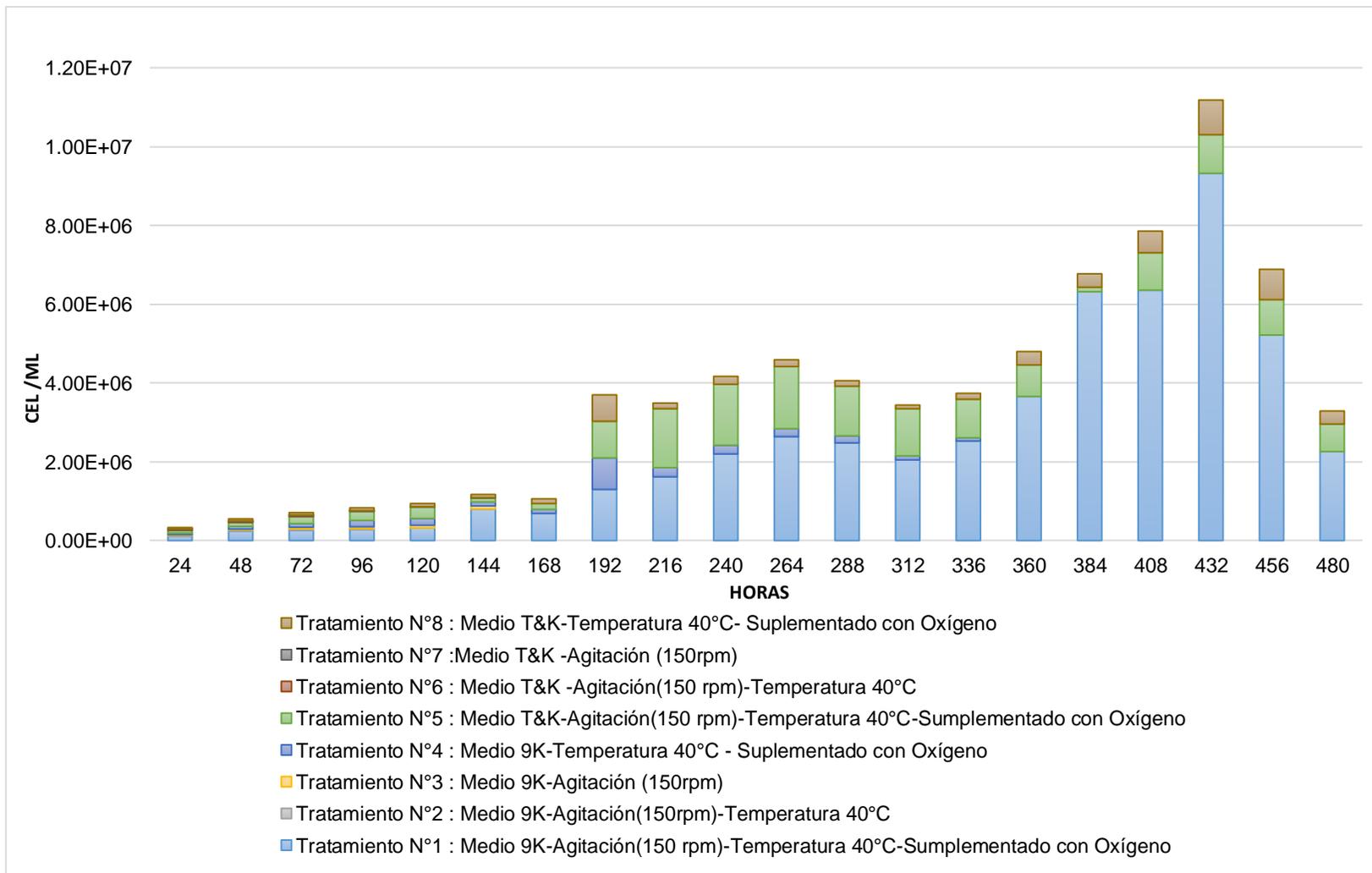


Figura 20. Resumen: Concentración bacteriana (cel/ml) de 8 tratamientos de enriquecimiento bacteriano.

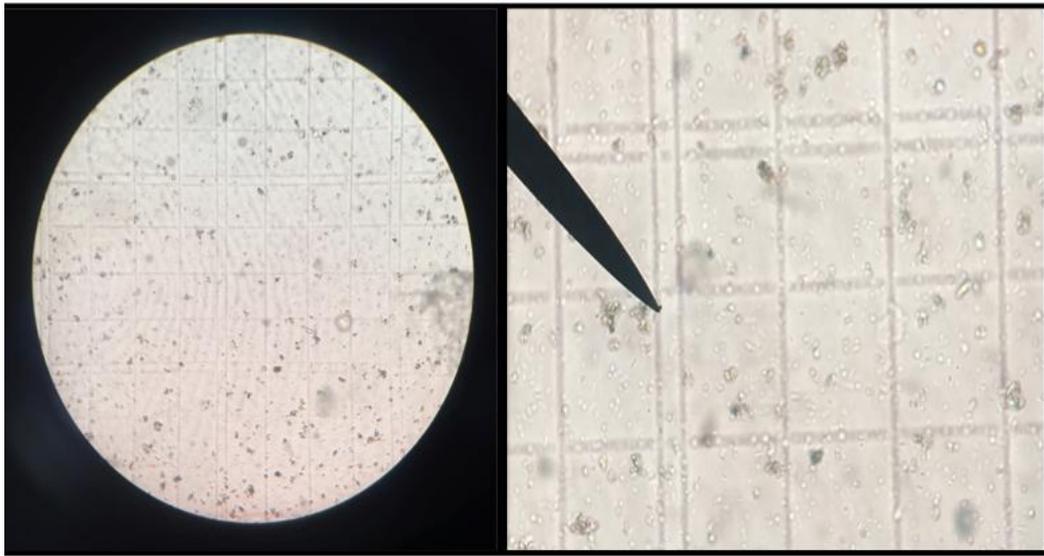


Figura 21. Observación microscópica a un aumento de 40X.

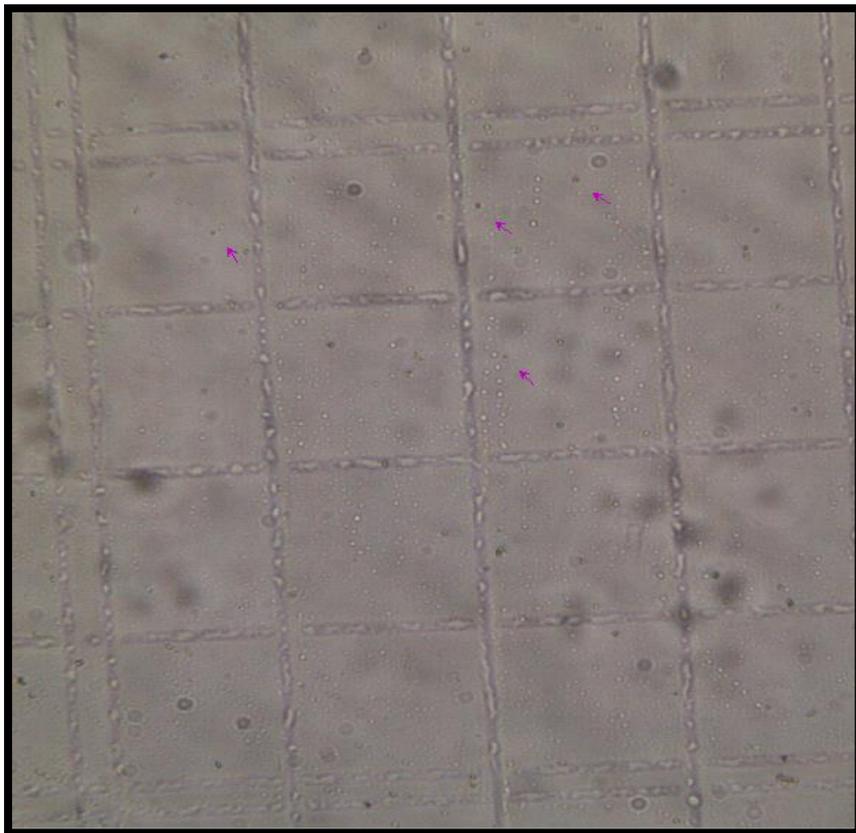


Figura 22. Bacterias aisladas indicadas con las flechas



Figura 23. Arriba: Bacterias Gram negativas presenta una coloración rosada o fucsia. Abajo: se observan bacilos pleomórficos, característico de Thiobacillus

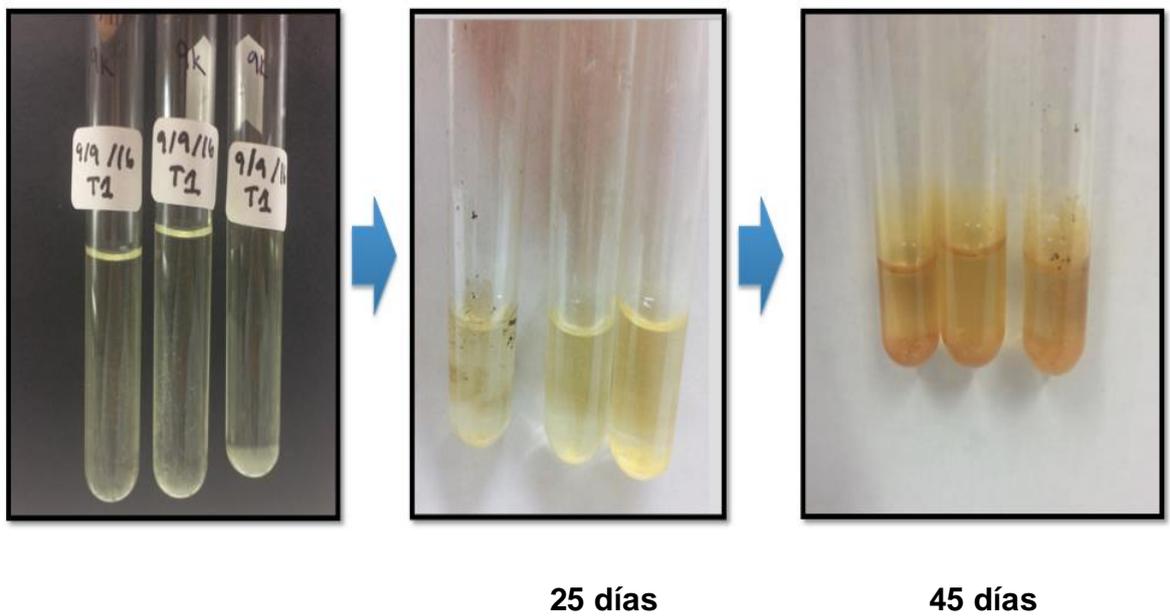


Figura 24. Desarrollo bacteriano en tubo.

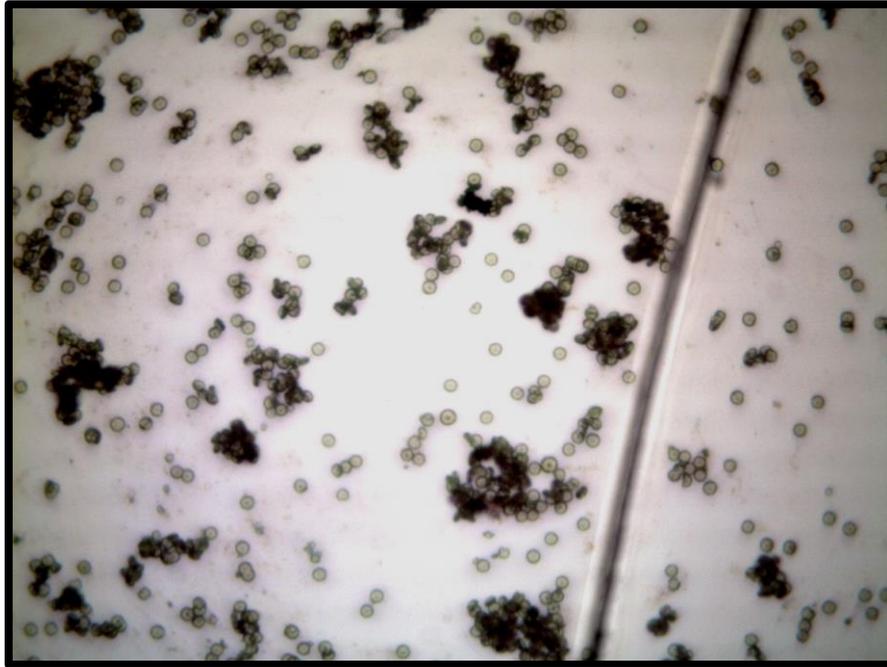


Figura 25. Cristales de color verdoso. Sales provenientes de las sales de azufre.

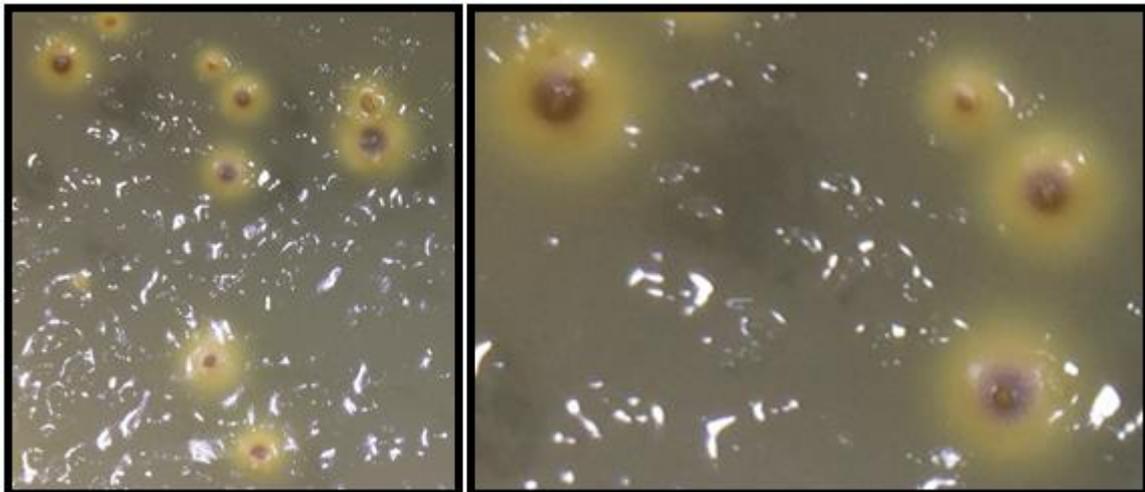


Figura 26. (F1) Colonias color amarillo-naranja con forma circular. Punto marrón o anaranjado en el centro, superficie lisa cremosa y con bordes ondulados. Medio de cultivo

9K.

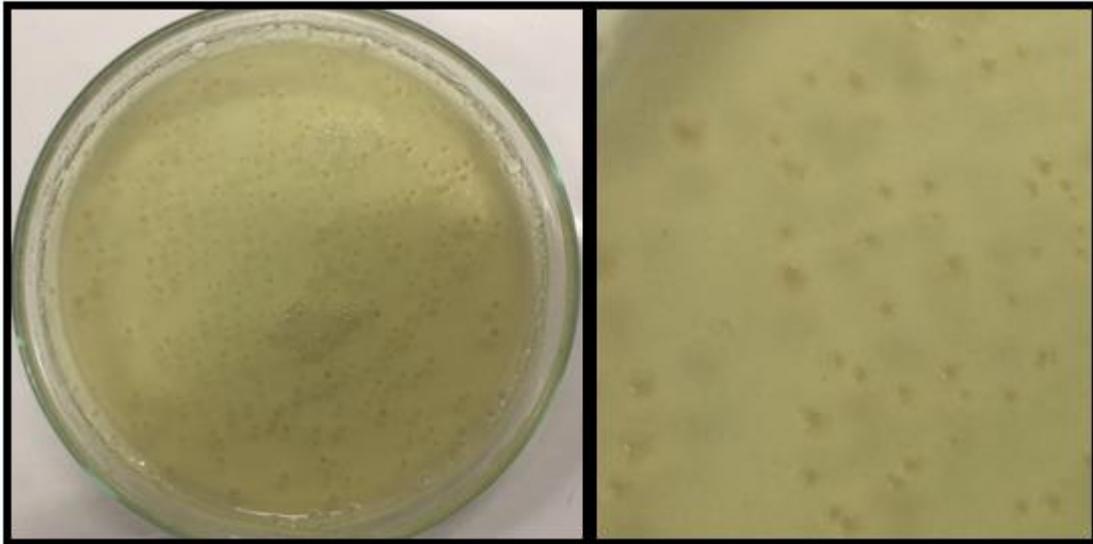


Figura 27. (F2) Colonias color grisáceo con forma granular y borde irregular, elevación plana, margen lobulado. Medio de cultivo 9K.

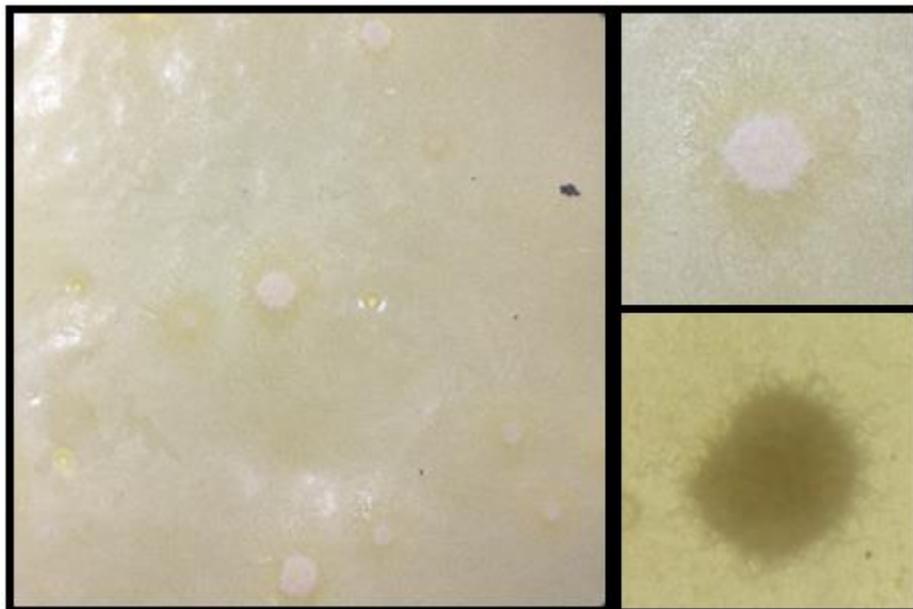


Figura 28. (F3) Colonias blancas de diferentes tamaños, forma circular y borde filamentosos. Presenta tricomas en los bordes. Medio de cultivo 9K.

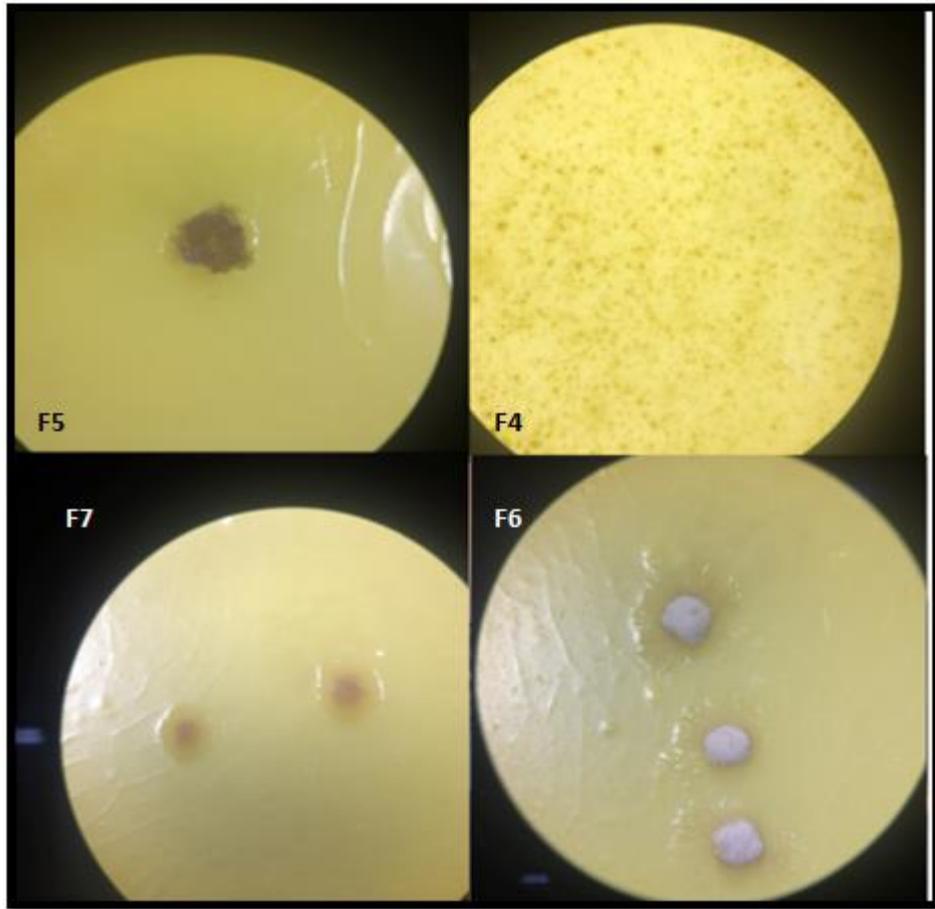


Figura 29. Colonias en placas con medio 9K con agarosa.

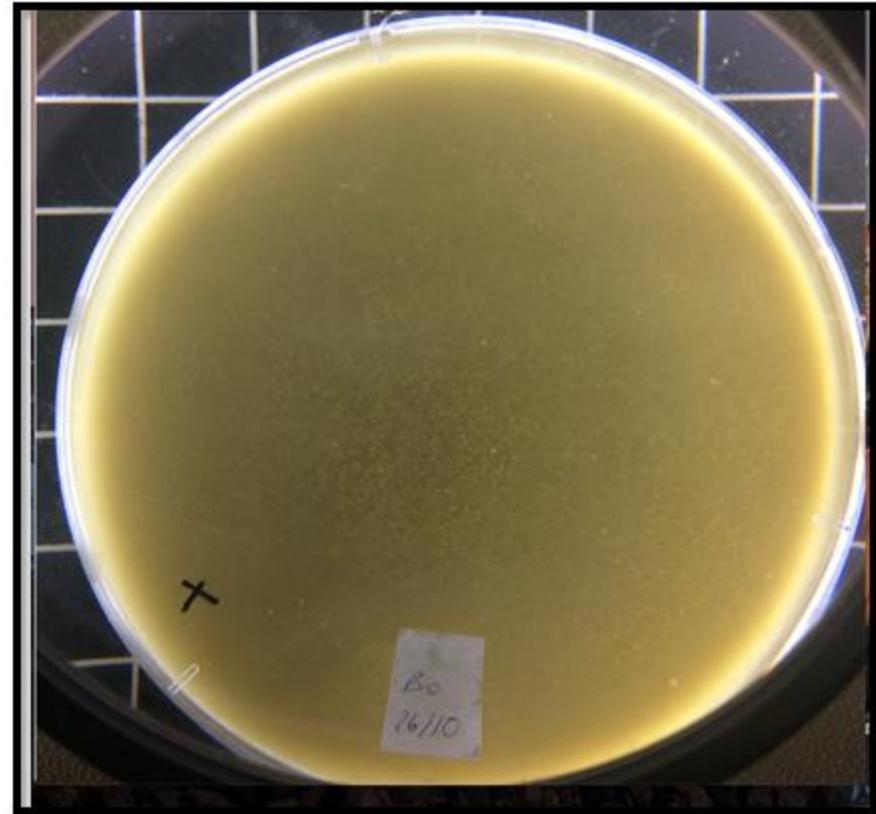


Figura 30. Desarrollo bacteriano en placas de medio 9K con agarosa

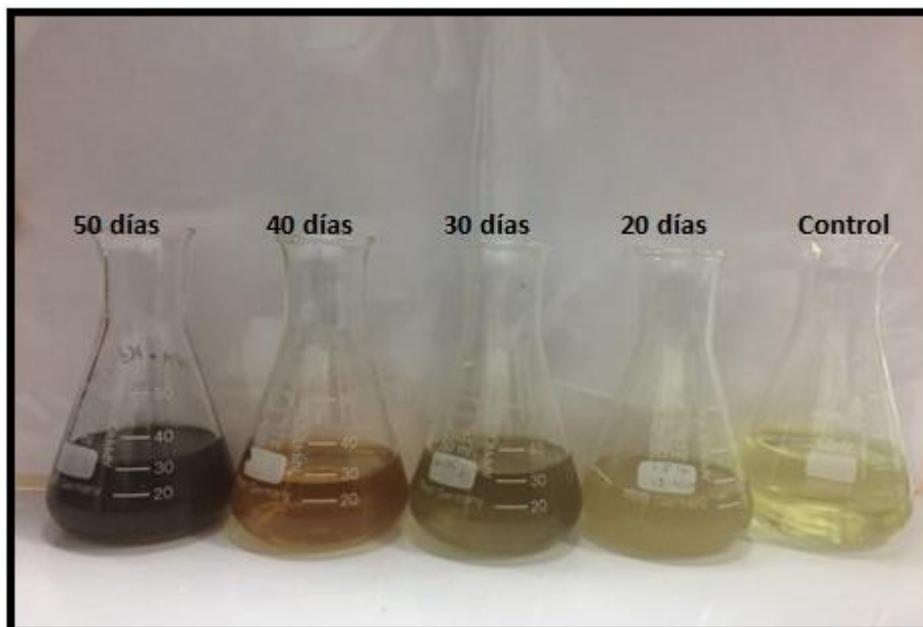


Figura 31. Determinación de Biooxidación. Duración del ensayo 50 días. De izquierda a derecha. Erlenmayer 1: 10 días, Erlenmayer 2: 20 días de incubación, Erlenmayer 3: 30 días de incubación, Erlenmayer 4: 40 días de incubación, Erlenmayer 5: 50 días de incubación.

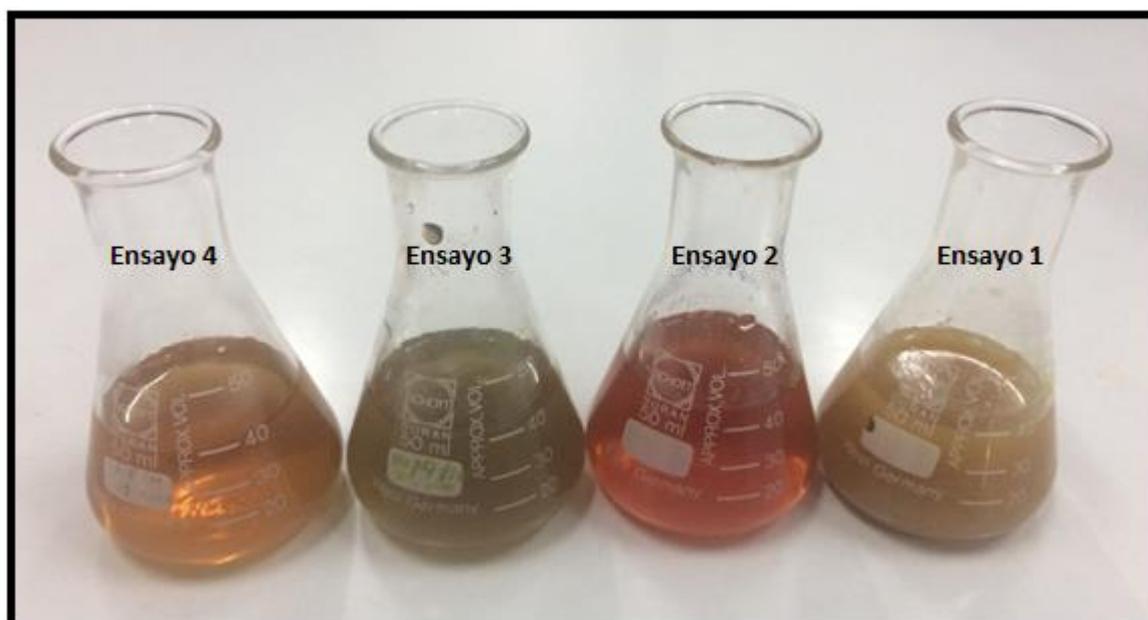


Figura 32. Determinación de Biooxidación. Los 4 ensayos después de 50 días.

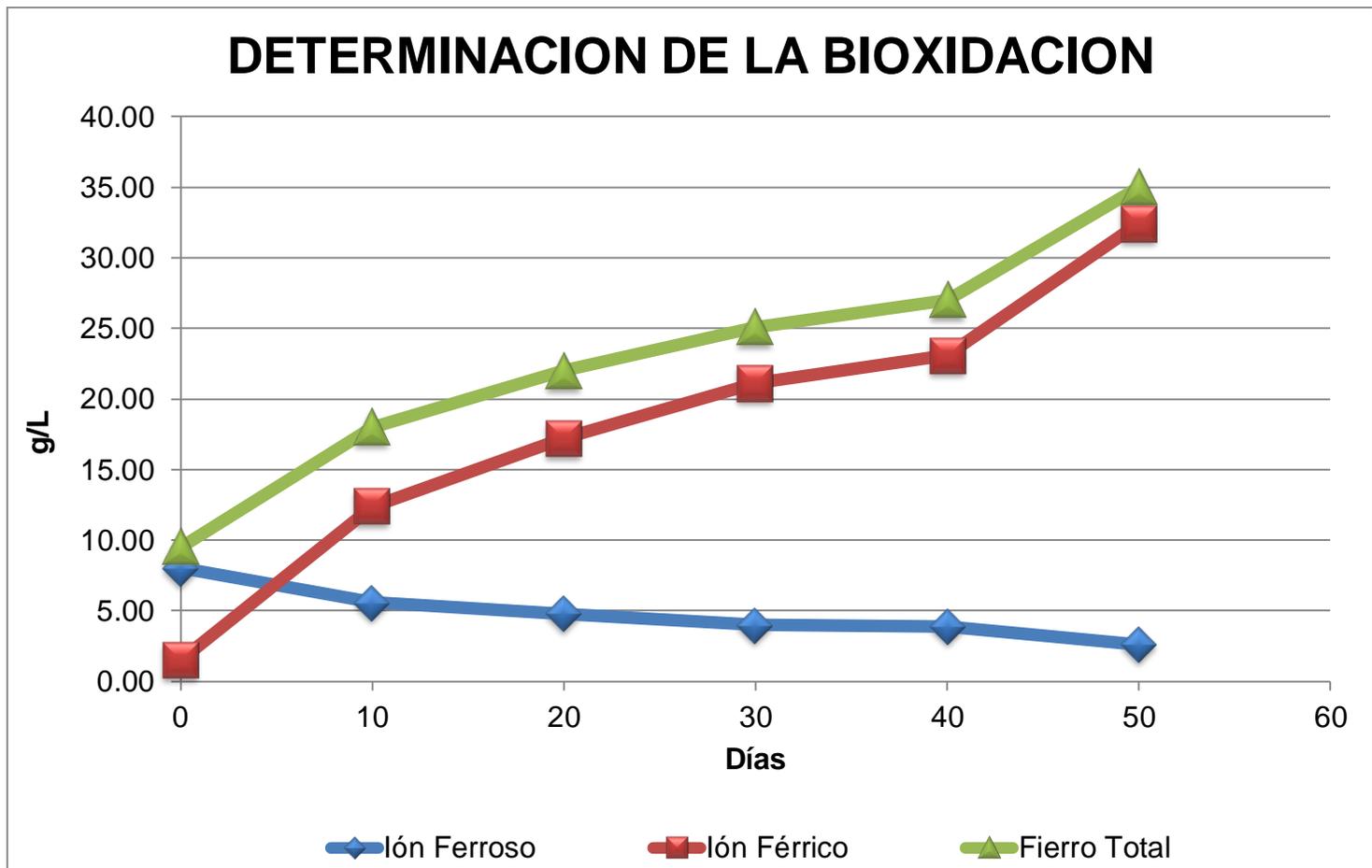


Figura 33. Relación entre los valores de Fe^{+2} (Ión Ferroso), Fe^{+3} (Ión Férrico) y Fe^{total} (Fierro Total) durante el proceso de bioxidación (duración 50 días).

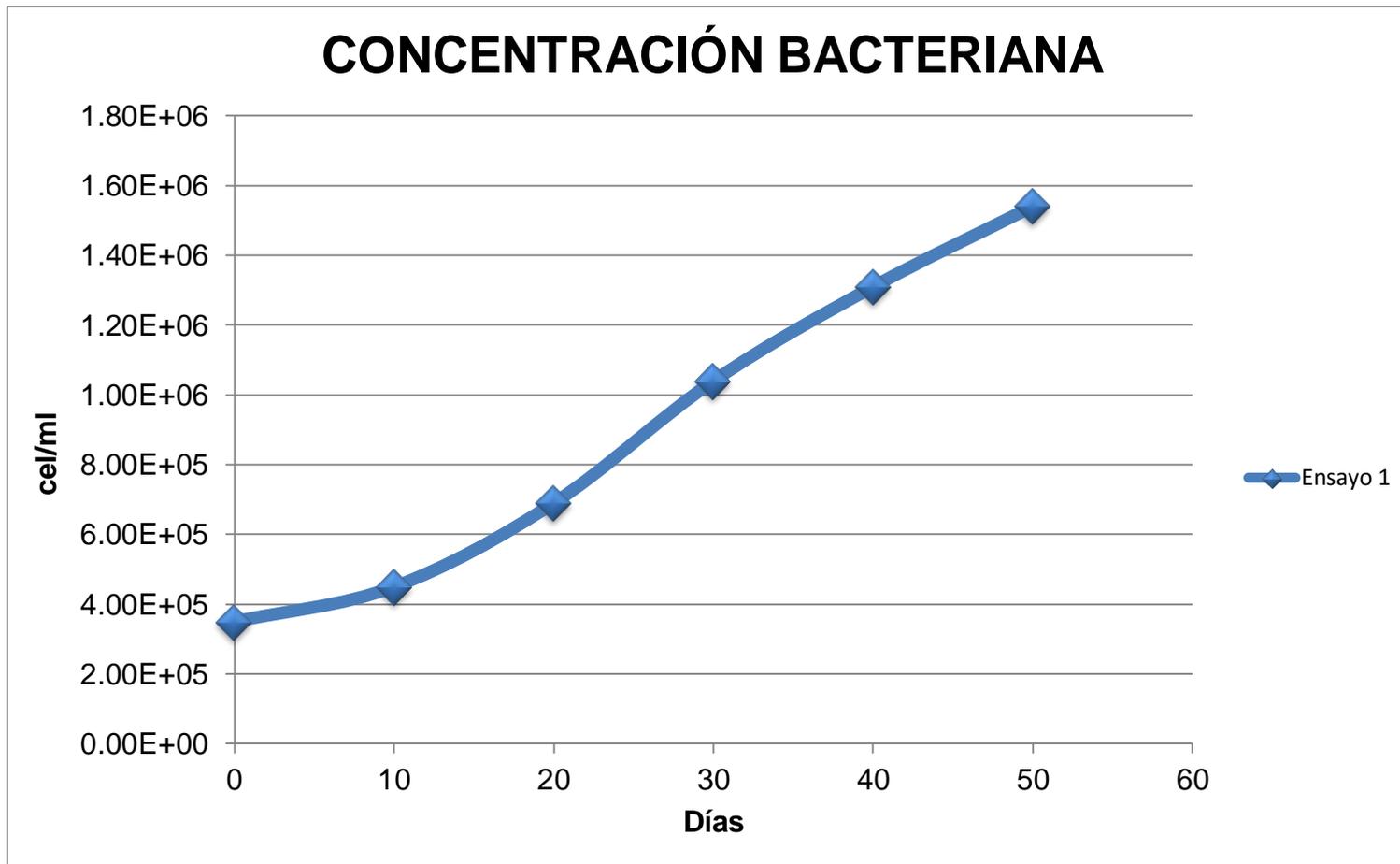


Figura 34. Población bacteriana en el proceso de biooxidación (duración de 50 días)..