

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Estandarización y Evaluación de Técnicas Analíticas para
Medir el Crecimiento de un Cultivo Mixto para Biolixiviación
de Minerales**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

**Que para obtener el Título de
QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO**

Presenta:

Miguel Zepeda Núñez

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional Práctica de Miguel Zepeda Núñez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Esther Carrillo Pérez
Presidente

M.C. Alejandro Monserrat García Alegría
Secretario

Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez
Vocal

M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su comprensión y por estar siempre ahí para apoyarme en todos y cada uno de los proyectos que empiezo y motivarme día con día para terminarlos.

A la Dra. Esther Carrillo Pérez por darme la oportunidad para desarrollar esta investigación, por todas sus enseñanzas y apoyo.

Al comité de tesis: Dra. Esther Carrillo Pérez, Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, M.C. Alejandro Monserrat García Alegría y a la M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña, por todas sus observaciones, recomendaciones y aportaciones a este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio por brindarme su ayuda cuando la necesite.

A todas las personas que de una u otra manera me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo.

A Dios por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida y darme la salud y fuerza para terminarla con bien y empezar una nueva.

DEDICATORIA

A mi madre por su infinita paciencia, incondicional apoyo y por todo su esfuerzo y trabajo que me ayudo a llegar hasta aquí

Gracias Chief

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
General	4
Particulares	4
REVISIÓN DE LA LITERATURA	5
Industria Minera	5
Minería en México	6
Importancia Económica de la Minería en México	6
Metales de Baja Ley	7
Biolixivación	8
Microorganismos Utilizados en la Biolixivación	9
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	10
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	12
Formación de Jarositas	14
Uso del Quelante Etilendiaminotetracético – disódico	15
Crecimiento Bacteriano	16
Curva de Crecimiento	17
Fase de adaptación (lag)	18
Fase exponencial (log)	18
Fase estacionaria	19
Fase de declive (muerte)	19
Técnicas para Medir el Crecimiento Bacteriano	20
Métodos Directos	20
Conteo celular con hematocitómetro	20
Peso seco	21
Métodos Indirectos	21
Componentes celulares específicos	22
Ácidos nucleicos	22

Polisacáridos	22
Lípidos	22
Proteínas	23
Métodos espectrofotométricos	23
Consumo de sustrato	24
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Descripción General del Trabajo	27
Microorganismos	30
Medio de Cultivo	30
Solución de Sales Minerales	30
Condiciones de Cultivo	31
Técnicas Analíticas	33
Lavado de Cristalería	33
Estandarización de la Medición del Ion Ferroso (Fe^{2+})	33
Determinación del Ion Ferroso (Fe^{2+})	33
Lavado del Paquete Celular	34
Medición Espectrofotométrica	35
Cuenta Directa al Microscopio	35
Determinación de Proteínas	36
Curva de calibración de proteínas	36
Preparación de la muestra	36
Diseño de Experimentos	37
Análisis Estadístico	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
Estandarización de Técnicas para Medir el Crecimiento	39
Estandarización de Consumo de Fe^{2+}	39
Estandarización de la Medición Espectrofotométrica del Contenido de Células	40
Estandarización del Método de Determinación de Proteína	41
Resultados Experimentales	43
Cuantificación del Consumo de Sustrato	43
Concentración Celular	47
Análisis de Concentración Celular Contra Absorbancia	50
Estimación Teórica de la Concentración Celular	51

Determinación de Proteína	53
Cinética de Crecimiento	56
CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Producción mineralometalúrgica en México.	7
2.	Composición de medio de cultivo 9K.	30
3.	Composición de la solución de sales minerales.	31
4.	Parámetros cinéticos de crecimiento de cultivo experimental de CLV.	59
5.	Parámetros cinéticos de crecimiento de cultivo experimental de CSL.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura química del EDTA en su forma libre y coordinada con un metal.	16
2.	Curva de crecimiento de un microorganismo.	17
3.	Cámara de conteo de Neubauer.	21
4.	Esquema de un espectrofotómetro.	24
5.	Preparación y valoración de KMnO_4 .	26
6.	Esquema de la estandarización de técnicas para medir el crecimiento del cultivo.	28
7.	Diagrama de flujo de los parámetros evaluados.	29
8.	Reactivación del cultivo.	32
9.	Sistema experimental del cultivo mixto.	32
10.	Correlación de concentración de Fe^{2+} calculada contra concentración experimental.	40
11.	Estandarización de conteo celular contra absorbancia.	41
12.	Curva patrón de albúmina suero de bovina.	42
13.	Correlación de concentración de proteína contra número de células.	43
14.	Correlación de consumo de sustrato calculado contra consumo de sustrato experimental.	43
15.	Rendimiento celular por gramo de sustrato consumido.	45
16.	Correlación de absorbancia de CLV contra CSL.	47
17.	Correlación de concentración celular de CLV contra CSL.	48
18.	Comparación de conteo de CLV contra CSL.	49
19.	Correlación de concentración celular contra densidad óptica.	51
20.	Correlación de concentración de CLV experimental contra concentración calculada.	52
21.	Correlación de concentración de CSL experimental contra concentración calculada.	53
22.	Correlación de concentración de proteína contra número de células de CLV.	55
23.	Correlación de concentración de proteína contra número de células de CSL.	56
24.	Seguimiento del crecimiento celular y consumo de sustrato	57
25.	Cinética de crecimiento de CLV	58
26.	Cinética de crecimiento de CSL	58

RESUMEN

La evaluación del crecimiento de cultivos biolixiviadores de metales se ve afectada por la producción de precipitados del ion férrico (Fe^{3+}) producido en la reacción de oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}) durante el crecimiento del cultivo. En este trabajo se investigó el efecto del lavado de células con solución de sales minerales y solución de EDTA-NaCl en la determinación de los parámetros cinéticos de un cultivo mixto de microorganismos para biolixiviación obtenido de un efluente minero de la planta ESDE de Nacozari de García, Sonora, México. El cultivo creció en el medio mineral 9K. Para la evaluación de los parámetros cinéticos de crecimiento del cultivo mixto, se utilizaron dos grupos de células, uno con células lavadas (CLV) y el otro con células sin tratamiento de lavado (CSL). La concentración de las CLV y de las CSL se correlacionó con las medidas de absorbancia, concentración de sustrato y concentración de proteína. Los resultados mostraron que el tratamiento de lavado de células tuvo un efecto positivo tanto en el conteo celular como en la concentración de proteína. Las concentraciones máximas fueron 4.27×10^9 células/mL para las CLV mientras que para las CSL fue de 3.27×10^8 células/mL, siendo la concentración de CLV 3.88 veces mayor. Para la proteína se realizó una comparación entre las pendientes obtenidas en el análisis de resultados, siendo seis veces mayor la proteína para las CLV. La evaluación de los parámetros cinéticos de crecimiento también mostró un efecto positivo con el tratamiento de lavado de las células. La estimación del tiempo de la fase *lag* de crecimiento mejoró al disminuir 1.3 veces en comparación con el tiempo de la fase *lag* para las CSL. La velocidad específica de crecimiento (μ) se incrementó 2.44 veces, el tiempo de doblado fue de 2.4 veces menor y el rendimiento (Y) fue siete veces mayor para las CLV en relación con los resultados obtenidos para las células CSL. Los sólidos presentes en el cultivo representan un interferente para la estimación real de los parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias hierro-oxidantes. Los resultados mostraron que el tratamiento de lavado de células fue efectivo en la eliminación de 5.7 veces la cantidad de sólidos que se forman en el cultivo durante el crecimiento debido a la oxidación del hierro. Esto se vio reflejado en los valores obtenidos para los parámetros evaluados como el conteo celular, la densidad óptica y la concentración de proteína. Se observó que hasta las 48 horas de crecimiento no existe gran diferencia entre el conteo celular para las CLV y CSL. La técnica para la determinación del consumo del ion ferroso en el medio de cultivo resultó ser sencilla, confiable, rápida y económica.

INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos ha tomado relevancia en la recuperación de metales con alto valor económico a partir de minerales de baja ley, ya que no es posible extraerlos por el método tradicional de lixiviación química, en el cual se utilizan soluciones ácidas para disolver las sales metálicas donde viene unido el metal. Dado que en las compañías mineras cuentan con una acumulación considerable de terreros conteniendo metales de baja ley, se ha recurrido al uso de un grupo de bacterias que tienen la habilidad de oxidar minerales sulfurados, permitiendo liberar los metales contenidos en ellos. El producto final de este proceso biológico es una solución ácida que contiene metal en su forma soluble, proceso conocido como biolixiviación (Zhu y col., 2013; Chowdhury y Ojumu, 2014).

La estimación de la concentración de sustrato, de proteína, de biomasa y de células, son parámetros empleados para medir el crecimiento de los cultivos de hongos y bacterias. El conteo celular de un cultivo es una de las técnicas analíticas directas más importantes para calcular los parámetros cinéticos como velocidad específica de crecimiento, rendimiento celular y la productividad específica, las cuales sirven para aplicar un control de estrategias basadas en el consumo de sustrato, así como para analizar y diagnosticar el estado del cultivo y así poder decidir cuándo se cosechara la biomasa (Kennedy y col., 1992).

Acidithiobacillus ferrooxidans crece en el medio definido 9K, el cual contiene sulfato ferroso que es utilizado por el microorganismo como fuente de energía. Durante el crecimiento de este microorganismo, se da una continua oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}), produciendo ion férrico (Fe^{3+}) el cual forma precipitados minerales conocidos como jarositas. El incremento de las jarositas es acumulativo a medida que el cultivo va creciendo, su presencia produce turbidez y cambios de color en el caldo de cultivo de verde claro transparente a un café rojizo opaco (Shuler y Kargi, 2002; Nazari y col., 2014).

Los cultivos biolixiviadores de cobre durante el crecimiento de las bacterias tienden a unirse a los sólidos que se van formando como es el sulfato férrico, que se produce como resultado de la oxidación del ion ferroso, esta adherencia de las bacterias aumenta al incrementarse la formación de dichos sólidos, lo cual disminuye el número de bacterias en la fase líquida del medio de cultivo, lo que ocasiona tener una percepción de la disminución de bacterias en el cultivo al realizar los conteos de bacterias (Song y col., 2014; Wang y Zhou, 2012; Zhu y col., 2013).

La principal problemática para evaluar el crecimiento de estos microorganismos es que se adhieren a las partículas sólidas de sulfato férrico (jarositas). Esto inhabilita la estimación de

los parámetros básicos de crecimiento como son número de células y masa celular, así como el uso de métodos electrónicos, además dificulta el uso de una cámara de conteo (Nazari y col., 2014). Estos factores probablemente han impedido investigar la significativa economía de estos microorganismos, ya que tienen la capacidad de recuperar metales de baja ley, como oro, cobre, entre otros metales de importancia económica en la formación de drenajes ácidos de minas (Kennedy y col., 1992).

La desventaja de la observación directa al microscopio es que en algunos casos las células se unen a la superficie de las jarositas y esto hace difícil el conteo. Esta técnica es de una labor muy intensiva y con la fatiga del operador puede disminuir la confiabilidad de los resultados. Una posible solución en esta situación parece ser la disolución o eliminación de estos precipitados para que el número de células o la biomasa celular puedan ser determinados, así como otros parámetros asociados al crecimiento.

Por lo que en esta investigación se han propuesto evaluar y estandarizar técnicas para la medición del crecimiento celular de un cultivo mixto para biolixiviación de minerales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar y evaluar técnicas para la medición del crecimiento celular de un cultivo mixto para biolixiviación de minerales.

Objetivos Particulares

1. Estandarizar y evaluar una técnica de lavado de células con EDTA-NaCl para el desprendimiento de células adheridas a jarositas.
2. Contar células antes de los lavados y después de los lavados
3. Cuantificar el consumo del sustrato durante el crecimiento celular.
4. Correlacionar el conteo de células durante el crecimiento del cultivo con la densidad óptica, concentración de proteína; así como con los parámetros cinéticos de crecimiento.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Industria Minera

La minería es la obtención selectiva de los minerales y otros materiales de la corteza terrestre. También se denomina así a la actividad económica primaria relacionada con la extracción de elementos de los cuales se puede obtener un beneficio económico. Dependiendo del tipo de material a extraer la minería se divide en metálica y no metálica. Los métodos de explotación pueden ser a cielo abierto o subterráneo. Los factores que determinan esto son principalmente la geología, geometría del yacimiento y la característica geomecánica del mineral (Economía 0208, 2012).

Existe una amplia variedad de minerales en la tierra. Los hay sólidos, líquidos, quebradizos. La naturaleza los presenta acumulados en lugares conocidos como yacimientos. Los minerales se clasifican en energéticos, no metálicos y metálicos. Los metálicos a su vez se clasifican en metales preciosos, metales industriales no ferrosos y metales siderúrgicos (Jornada UNAM, 2013).

Otra manera de clasificar a los minerales, se basa en si requieren o no permiso del gobierno para ser explotados. Los minerales concesibles son los minerales que, de acuerdo con la Ley de minería, solo pueden ser explotados con el permiso o concesión otorgada por la Secretaria de Economía como el oro, plata, cobre, zinc, entre otros. Por otro lado, los minerales no concesibles no requieren de un permiso por parte del gobierno para ser explotados, estos son los que se utilizan para la construcción como arena, mármol, cantera, entre otros (INEGI, 2010).

La minería genera el 45% del Producto Interno Bruto (PIB) a nivel mundial, en forma directa o a través del uso de productos que son facilitados a otras industrias. Esto se debe a que los ingresos que se generan en esta industria contribuyen con el 11.5% del PIB global, los servicios a la minería aportan del 21 al 23%, además junto con los fertilizantes para agricultura, el combustible para transporte y los materiales para la construcción, combinados llevan a que la contribución supere el 45% (Conciencia Minera, 2012).

América Latina y el Caribe se caracterizan por poseer una gran variedad y cantidad de recursos mineros. Muchos de estos países explotan estos recursos desde hace siglos constituyendo una fuente de ingresos importante para la economía regional. La mayor inversión en proyectos de explotación minera a nivel mundial se lleva a cabo en América Latina, a continuación se muestran algunas de estas cifras: América Latina 32%, Oceanía 20%, África

16%, Asia 13%, Norteamérica 12% y Europa 7%. Entre los tres minerales de mayor demanda global que se producen, en mayor o menor medida en América Latina se encuentran el carbón, el cobre y el mineral de hierro. La actividad minera tiene un gran impacto en el mercado laboral, así como en la actividad económica local, impulsando la multiplicación de proveedores de la enorme diversidad de bienes y servicios que requiere (Bancomext, 2013).

Minería en México

México ha logrado consolidarse como uno de los países más importantes del ramo de la minería a escala mundial, tanto en los aspectos de producción y valor, como en los montos de inversión. De acuerdo con la Cámara Minera de México, en el país existen 23 yacimientos clasificados como gigantes y seis más que se clasifican como súper gigantes, lo cual coloca a nuestro país a la cabeza de los países de América Latina en el rubro de gastos de exploración, también es la cuarta economía del sector, con un 6% del total de los recursos mundiales, tan sólo debajo de Canadá, Australia y Estados Unidos.

Las características naturales de México son propicias para constituirse como una de las naciones líderes en materia de minería. En el territorio mexicano existen yacimientos de minerales metálicos y no metálicos de clase mundial; el país destaca por ser uno de los principales productores de plata en el mundo. En la actualidad México ocupa el segundo lugar como productor de plata a nivel mundial, el tercero de bismuto, el quinto de plomo, el noveno de oro y el undécimo de cobre. Destaca también en la producción de arsénico, plomo, cadmio, antimonio, zinc, barita, grafito y yeso (Bancomext, 2013).

Importancia Económica de la Minería en México

La industria minera contribuye con el 1.5% del PIB de la nación. Si se toma en cuenta la minería ampliada, la cual incluye la extracción de petróleo y gas, esta llega a contribuir con 5% del PIB total en los últimos años. Además de la importancia económica, las actividades mineras son una de las principales fuentes de empleo, principalmente en los estados del norte del país y en localidades aisladas (Bancomext, 2013).

Durante la última década los principales estados productores del sector de minería en México fueron: Sonora (23%), Zacatecas (23%), Chihuahua (14%), Coahuila (11%), San Luis Potosí (6%) y Durango (6%) (INEGI, 2015).

El índice de volumen físico de la producción minerometalúrgica del país creció 1.33% con base en cifras desestacionalizadas en el mes de diciembre de 2014 con respecto al mes de noviembre de ese mismo año. En su comparación anual, la producción de cobre, yeso, carbón no coquizable y oro, aumentó de manera considerable; en tanto que disminuyó la de azufre, zinc, coque, plomo, fluorita, plata y pellets de fierro. En la Tabla 1 se muestran algunos de estos datos. La mayor producción de oro se concentró en Zacatecas que aportó el 26.4% del total nacional, mientras que Sonora aportó un 24.3%. En cuanto a la extracción de plata se realizó principalmente en cuatro estados: Zacatecas que contribuyó con 45.2%, Chihuahua con 17%, Durango con 11.7% y Sonora con un 6%. Para el cobre, la producción se llevó a cabo básicamente en Sonora, con una aportación del 79.8% del total extraído en el país (INEGI 2015).

Tabla 1. Producción Minerometalúrgica en México (Toneladas)

Mineral	Diciembre 2013	Diciembre 2014	Variación % anual
Cobre	26,559	38,732	45.8
Yeso	378,312	419,805	11.0
Carbón no coquizable	933,929	998,612	6.9
Oro	8,490	8,828	4.0
Pellets de fierro	668,075	663,236	(-) 0.7
Plata	426,302	419,467	(-) 1.6
Fluorita	100,676	97,251	(-) 3.4
Plomo	16,766	16,051	(-) 4.3
Coque	192,771	180,188	(-) 6.5
Zinc	43,125	37,988	(-) 11.9
Azufre	91,477	74,571	(-) 18.5

Fuente: INEGI, Estadística de la Industria Minerometalúrgica (2015)

Metales de Baja Ley

La ley, en minería es una medida que describe el grado de concentración de recursos naturales valiosos como los metales o minerales disponibles en una mena. Se utiliza para determinar la viabilidad económica de una operación de explotación minera. El costo de extraer recursos

naturales desde su yacimiento se relaciona directamente con su concentración. Por ello el costo de extracción debe ser menor que el valor comercial del material que es extraído para que la operación sea económicamente factible.

Para los metales preciosos y las gemas se expresa generalmente en una cantidad de material por tonelada de mena, mientras que para otros metales y los minerales industriales se expresan como porcentaje (Gilbert y col. 1986).

Biolixiviación

Por cientos de años se han obtenido metales de alto valor a partir de minerales por medio de lixiviación. Se creía que este proceso era ocasionado por una reacción química entre el agua y oxígeno. Fue hasta 1947, cuando se demostró el efecto catalizador de las bacterias en la oxidación de hierro y la formación de ácido sulfúrico en agua de las minas. Sin embargo, la producción microbiana de ácido sulfúrico en agua de las minas ya se había sugerido 15 años antes, pero no se logró tipificar ni aislar las cepas responsables de la acidificación (Saavedra y Cortón, 2014).

Existe una variedad de microorganismos conocidos que catalizan la lixiviación de metales, principalmente de depósitos de minerales y de los drenajes de las minas. Dentro de los más estudiados se encuentran especies autótrofas como la bacteria *Thiobacillus spp.*, así como algunas especies heterótrofas como el hongo *Aspergillus spp.* (Gentina y Acevedo, 2013).

La habilidad que tienen los microorganismos de lixiviar y extraer metales de materiales sólidas comprende tres principios; reacciones de óxido reducción, la formación de ácido orgánico e inorgánico y la excreción de agentes complejos. La mediación por reacciones de óxido-reducción (redox) se basa ya sea en la transferencia de electrones de minerales al microorganismo en el caso de que exista contacto físico entre los organismos y los sólidos o en la oxidación bacteriana del ion ferroso (Fe^{2+}) a ion férrico (Fe^{3+}) donde el hierro férrico cataliza la solubilización del metal como un agente oxidante (Krebs y col., 1997; Acevedo y Gentina, 2005).

Biolixiviación de minerales se refiere a la solubilización oxidativa selectiva de distintos tipos de minerales mediada por la acción de microorganismos (Gentina y Acevedo, 2013). Las bacterias se alimentan de nutrientes presentes en el mineral y de esta manera separa los metales de este. Estos microorganismos son catalizadores ya que aceleran los procesos de oxidación en el mineral en comparación de cómo se lleva a cabo un proceso natural. Los tipos de bacterias más utilizados en este proceso incluyen *Leptospirillum ferrooxidans*,

Acidithiobacillus ferrooxidans y ciertas especies de *Acidianus spp.*, *Sulfolobus spp.* y *Sulfobacillus spp.* (Daoud y Karamanev, 2006).

Existen nombres alternativos para este proceso tales como lixiviación bacteriana, lixiviación microbiana y biooxidación, todos ellos parten de lo que se conoce como biohidrometalurgia o biominería. Este proceso permite el tratamiento de sulfuros insolubles y de óxidos insolubles por medio de la hidrometalurgia a diferencia de tecnología más tradicional como la pirometalurgia (Saavedra y Cortón, 2014).

El empleo de microorganismos en el procesamiento del mineral posee varias ventajas sobre los métodos fisicoquímicos tradicionales. De manera general, se trata de una tecnología más barata y limpia por varios motivos (Rawlings y col., 1999). Por un lado, requiere el consumo de una menor cantidad de energía y además no produce residuos en forma de emisiones gaseosas contaminantes. El drenaje ácido generado durante las operaciones de biominería, puede ser gestionado convenientemente con el fin de limitar el impacto sobre el medio ambiente. No sucede lo mismo, con el drenaje generado por la actividad biológica natural sobre los taludes y residuos minerales expuestos tras una explotación mediante procesos convencionales. Por otro lado, debido a las características del proceso, tiene la ventaja de permitir la extracción de metales a partir de minerales de baja ley que de otra forma no serían económicamente recuperables y producirían contaminación al ser abandonados. La mayor parte de las operaciones pueden ser llevadas a cabo *in situ*, ahorrando costos en transporte e impactos añadidos al entorno. Por último, su principal desventaja son las bajas velocidades de reacción y de productividad, se requieren terrenos extensos y la insuficiencia para tratar sulfuros primarios (García-Moyano y col., 2008).

Microorganismos Utilizados en la Biolixiviación

Las bacterias utilizadas en el proceso de biolixiviación habitan frecuentemente ambientes ácidos y ricos en metales, generalmente asociados con la oxidación de sulfuros metálicos. Las actividades mineras relacionadas con la extracción de metales o carbón generan acumulaciones de residuos y exponen el mineral a factores ambientales como el viento y la lluvia. A partir de estos residuos se producen lixiviados caracterizados por un pH muy bajo y concentraciones elevadas de metales pesados disueltos. Este tipo de drenajes se conocen como aguas ácidas de minas y no fue hasta la década de los 50, cuando se descubrió que eran debidas a la actividad metabólica de microorganismos, principalmente quimiolitótrofos, capaces

de obtener energía a partir de la oxidación de sulfuros metálicos (Johnson y Hallberg, 2003). También son elementos fundamentales en procesos de biominería.

El grupo de bacterias utilizadas para biolixiviación de minerales, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldos* y *Leptospirillum ferrooxidans* son un grupo de microorganismos Gram negativos, extremadamente acidófilos, mesófilos y quimiolitotrófos que se encuentran generalmente en ambientes ácidos como los efluentes de las minas (Wang y Zhou, 2012). Debido a su capacidad para realizar la biolixiviación se han vuelto parte importante de consorcios microbianos involucrados en la recuperación industrial de metales.

Estas bacterias al igual que otras hierro-oxidantes crecen bajo condiciones óptimas de temperatura a 35 °C, en el medio inorgánico 9K, a un pH extremadamente bajo (1.0 - 2.0) y con una alimentación continua de CO₂ y aire. Este grupo de microorganismos obtienen su energía de la oxidación de compuestos de azufre y del ion ferroso (Fe²⁺), formando así sulfato (SO₄)²⁻ y sulfato férrico (Fe₂(SO₄)₃), respectivamente (Harneit y col., 2006).

Estas bacterias son capaces de obtener energía de compuestos inorgánicos reducidos como sustratos y utilizarla en el metabolismo respiratorio. Es una facultad conocida con el nombre de quimiosíntesis. Estos microorganismos pueden ser quimioautótrofos o quimioheterótrofos. Al igual que los fotoautótrofos como algas y plantas, estos utilizan CO₂ como fuente principal de carbono, pero a diferencia de ellos, no utilizan luz como fuente de energía, sino que la obtienen por oxidación de compuestos inorgánicos reducidos, tales como amonio (NH₄), dióxido de nitrógeno (NO₂), hidrógeno molecular (H₂), formas reducidas del azufre o como en este caso el ion ferroso (Fe²⁺). Su carbono celular deriva del dióxido de carbono (CO₂) y es asimilado mediante las reacciones del ciclo de Calvin, de modo análogo a las plantas. Como resultado de su capacidad distintiva de crecer en medios estrictamente minerales, en ausencia de luz, estos organismos son denominados como quimiolitótrofos (Daoud y Karamanev, 2006).

En este trabajo las principales bacterias presentes en el cultivo mixto utilizado fueron *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*.

***Acidithiobacillus ferrooxidans*.** Esta bacteria fue descubierta por Colmer en 1940 al estudiar el problema de drenaje ácido en las minas. *Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar con un tamaño que varía entre los 0.5 a 1.0 micrómetros, es móvil por un flagelo polar y se le puede encontrar solo o en pares (Barron y Lueking, 1990). Esta bacteria es extremadamente acidófila, mesófila, quimiolitótrofa y es el

organismo acidófilo más estudiado, el cual se encuentra generalmente en ambientes ácidos como en drenajes ácidos de las minas. Debido a sus capacidades biolixivantes es un miembro importante de un consorcio microbiano utilizado en la recuperación industrial de metales. Al igual que otras bacterias ferro-oxidantes, crece en condiciones óptimas de temperatura de aproximadamente 35 °C en el medio inorgánico 9K a pH extremadamente bajo de entre 1.0 y 2.0 y obtiene carbono de la atmósfera y nitrógeno a partir de sales minerales de amonio (Chen y col., 2015).

Acidithiobacillus ferrooxidans crece en tiosulfato o en agar de tetrionato, donde forma colonias pequeñas de un diámetro de 0.5 a un milímetros, de forma circular, algunas veces con márgenes irregulares y de color blanco en presencia de azufre. En un medio sólido de agarosa con sulfato ferroso (FeSO_4) forma colonias microscópicas, las cuales tienen baja concentración de hierro, y se pueden observar zonas de color ámbar alrededor del medio con altas concentraciones de hierro (Campodonico y col., 2016).

Este microorganismo es autótrofo, y más específicamente quimiolitótrofo. *Acidithiobacillus ferrooxidans* es el único entre las bacterias quimioautótrofas que presentan la capacidad de usar cualquiera de los iones ferroso o compuestos de azufre reducidos como una fuente de energía. Cuando crece en una mezcla de sales de ion ferroso y azufre, este utiliza primero todo el ion ferroso y después utiliza el azufre. Estudios manométricos demostraron que el hierro es utilizado antes que el azufre (Arias y col., 2015).

Las condiciones para el crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* representan un ambiente extremo. El pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 1.9 y 3.5 y conforme crece produce ácido sulfúrico el cual hace que disminuya el pH. A un pH tan bajo el dióxido de carbono (CO_2) es liberado de la solución, es por esto que necesita una agitación constante ya que de no haberla el ambiente de crecimiento puede estar limitado de CO_2 . Estas bacterias fijan el CO_2 por medio del ciclo de Benson-Calvin (Konetzka, 1977).

Esta bacteria puede metabolizar una variedad de compuestos ferrosos acumulados en cultivos de laboratorio, cantidades substanciales de hidróxido férrico, aun cuando también pueden precipitar otro tipo de sales como lo son el óxido férrico y fosfatos, esto debido a que la mayoría de ellas son insolubles. El pH tan bajo al cual crece este organismo impide que se lleve a cabo una oxidación química rápida del ion ferroso es por esto que el microorganismo es capaz de oxidarlo de manera enzimática. El mecanismo exacto de la oxidación del hierro no se ha elucidado pero la oxidación ocurre en la cubierta celular de esta bacteria (Nuñez y col., 2016).

No se han observado diferencias estructurales significativas en la cubierta celular de esta bacteria cuando se compara con la cubierta de bacterias Gram negativas típicas, sin embargo, deben de existir diferencias estructurales y funcionales muy grandes a nivel molecular. La membrana y pared celular deben de ser inertes al hidróxido férrico que se acumula o bien la célula debe de estar incrustada con el compuesto. Al crecer en pH tan bajo la membrana obviamente debe excluir y ser resistente a altas concentraciones de ion hidrógeno, ya que la oxidación del hierro en cubiertas celulares aisladas se lleva a cabo a pH de 3.0 a 3.5 y en las células intactas el pH está entre 2.0 y 2.5, la oxidación toma lugar en la membrana y el organismo puede utilizar sustratos insolubles como FeS y azufre elemental, las capas celulares externas deben poseer algunas moléculas que les permitan llevar a cabo esta función (Xenofontos y col., 2015). Aun cuando no se han identificado en esta bacteria proteínas específicas de unión para el hierro, si se aisló y purificó parcialmente un complejo lipopolisacárido-fosfolípido-ferro pero no se le atribuyó ninguna función fisiológica. Los iones ferrosos se unen rápidamente a las células intactas y la oxidación de hierro es resistente a altas concentraciones de otros iones, estas observaciones sugieren que, o bien la bacteria posee un potente sitio de unión a hierro o que dicho sitio está bien protegido así que, en cualquiera de los casos dicha proteína de unión a hierro deberá poseer propiedades interesantes (García-Moyano y col., 2008; Liu y col., 2015)

Leptospirillum ferrooxidans. El género *Leptospirillum* fue descrito por primera vez en el año 1972 por Markosyan en un artículo para la revista Biological Journal of Armenia. La cepa tipo *L. ferrooxidans* L15 fue aislada a partir de agua de una mina de cobre de Armenia y caracterizada como una bacteria acidófila, quimiolitótrofa, oxidadora de hierro.

Las bacterias del género *Leptospirillum* son Gram negativas con una morfología típica de vibrio a espirilo, aunque puede variar a coco o pseudococos. Por ello, se dice que posee un carácter pleomorfo, esto es, una morfología variable dependiendo de las condiciones ambientales y de la etapa de crecimiento del cultivo. Los cocos pueden aparecer a partir de una célula madre helicoidal que no se divide de manera uniforme, aunque también se ha observado su formación mediante la contracción de una célula con forma de Vibrio. Este último fenómeno, se ha relacionado con el déficit de oxígeno promovido por la acumulación de depósitos de hierro en la superficie de la pared bacteriana. La formación de pseudococos se produce por el enrollamiento de un Vibrio al aproximar sus extremos. Estas formas son predominantes en los cultivos que están en la fase de crecimiento logarítmica o cuando las condiciones del medio se vuelven más ácidas (Pivovarova y col., 1981). La aparición de los espirilos se produce en las

etapas tardías de crecimiento o cuando se les somete a temperaturas inferiores a la óptima. Las células permanecen unidas cuando se dividen, llegando a formar cadenas espirales de hasta 12 células en cultivos de dos semanas. En su forma más habitual de *Vibrio*, tienen un tamaño comprendido entre las 0.2 a 0.6 μm de ancho por 0.9 a 3.5 μm de largo y son móviles por medio de un único flagelo en posición polar. Sin embargo, en algunos aislados la inserción del flagelo puede ser subpolar o incluso poseer dos (Harneit y col., 2006; Sand y Gehrke, 2006).

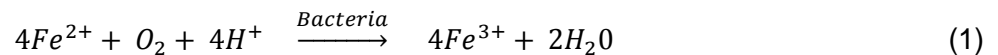
Se trata de un microorganismo acidófilo, que crece en rangos de pH óptimos comprendidos entre 1.3 y 4.0 con un límite inferior de 1.1. Sin embargo, existen diferencias entre las distintas especies, así las cepas pertenecientes a *L. ferrooxidans* parecen tener un pH óptimo más alto, comprendido entre 2.5 y 3.0 comparado con *L. ferriphilum*, que tiene óptimos entre 1.4 y 1.8. En general, *Leptospirillum spp* tiene pH óptimos más ácidos que otros oxidadores de hierro característicos de aguas ácidas de minas, como *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Sand y col., 1992).

Son mesófilos o moderadamente termófilos, con un límite superior de crecimiento a 55°C aproximadamente. Las cepas de *L. ferrooxidans* poseen una temperatura óptima de crecimiento alrededor de los 30°C. Son quimiolitótrofos que crecen mediante la oxidación de hierro, pero no crecen con compuestos reducidos del azufre. El hierro puede proporcionarse como sulfato ferroso, o en forma mineral, como sulfuros metálicos como la pirita (FeS_2). La oxidación de la pirita y los sulfuros metálicos insolubles en ácido, se produce mediante un ataque químico promovido por el ion férrico. Éste actúa como oxidante químico del mineral produciendo ion ferroso que es usado como fuente de energía por *Leptospirillum spp*. No es necesario, por tanto, un contacto directo entre la bacteria y el mineral. Sin embargo, *Leptospirillum spp.*, al igual que otros microorganismos involucrados en procesos de biolixiviación, tiene una marcada tendencia a adherirse a la superficie del mismo a través de una matriz de exopolisacáridos que acelera su disolución (Sand y col., 1995). Aunque se desconoce el mecanismo en detalle, se cree que la capa de exopolisacáridos podría jugar un papel como espacio de reacción. De hecho, la composición de los exopolisacáridos varía en función del sustrato sobre el que crecen los microorganismos e incluso se asemeja en microorganismos no relacionados que crecen sobre un mismo tipo de sustrato. Las células de *Leptospirillum spp*. creciendo sobre pirita generan una matriz de exopolisacáridos que contiene, además de azúcares neutros y lípidos, residuos de ácido glucurónico conjugados con iones férricos según la estequiometría 2:1 y que podrían estar involucrados en el proceso de oxidación del mineral, actuando como intermediarios entre la bacteria y el mineral (Chowdhury y Ojumu, 2014).

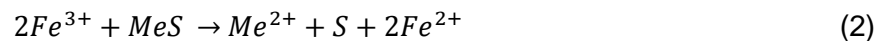
Formación de Jarositas

La precipitación de jarositas es un fenómeno muy importante que se observa en muchos cultivos bacterianos. En muchas aplicaciones que involucran *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* como en la biolixiviación y la desulfuración del carbón es crucial la disminución de jarositas para poder aumentar la eficiencia. Esta precipitación también representa el mayor interferente para realizar una correcta estimación del crecimiento de los cultivos y de los parámetros cinéticos de crecimiento de este tipo de bacterias (Daoud y Karamanev, 2006; Kaksonen y col., 2014).

Las bacterias biolixiviantes pueden obtener energía a partir de la oxidación de diferentes sustancias inorgánicas, siendo la más utilizada el sulfato ferroso. La reacción bioquímica general de la oxidación de iones ferroso es:



La biolixiviación de minerales involucra la disolución de sulfuros metálicos por medio de un mecanismo indirecto que involucra la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} por medio de bacterias biolixiviantes en la fase líquida. Seguido de esta oxidación, el Fe^{3+} lixivia el metal por medio de una reacción química (Jensen y Webb, 1995).

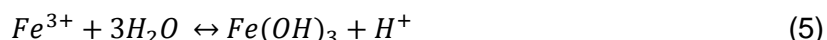
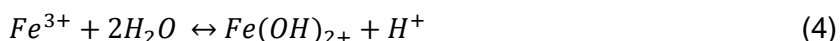
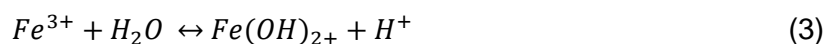


Existen diversos factores que juegan un papel importante en la cantidad de iones ferroso que oxidan las bacterias involucradas en la biolixiviación. Estos factores incluyen la concentración de iones ferroso y férrico, concentración celular y de oxígeno, pH, temperatura y el tipo de reactor. Estudios previos han demostrado que los iones férricos inhiben competitivamente la oxidación de iones ferroso, este efecto inhibitorio puede ser reducido aumentando la concentración celular (Nyavor y col., 1996).

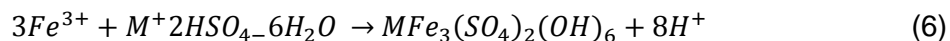
El pH y la temperatura tienen efecto significativo en la cinética de oxidación de hierro tanto por *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*. Por medio de varios estudios se concluyó que el pH y temperatura óptimos para el crecimiento bacteriano y oxidación son aproximadamente 2.0 y entre 30 y 35 °C, respectivamente (Jensen y Webb, 1995; Asokan y col., 2006)

A. ferrooxidans y *L. ferrooxidans* crecen comúnmente en el medio 9K desarrollado por Sulverman y Lundgreen en 1959. La oxidación del hierro ferroso ocurre por medio de la reacción (1).

Debido a que existe consumo de iones de hidrógeno, el pH del medio líquido aumenta. Sin embargo, este aumento en el pH es contrarrestado por la hidrólisis del hierro ferroso:



Es notable que el pH del sistema tenga efecto en las reacciones de oxidación y de hidrólisis. Además, existe una reacción compitiendo con la reacción de hidrólisis donando productos de hidroxisulfato férrico básico de fórmula $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, donde $M=K^+$, NH_4^+ , Ag^+ , o H_3O^+ . Estos precipitados de hidroxisulfato son conocidos como jarositas. La siguiente reacción es el resultado de la formación de dichos precipitados (Daoud y Karamanev, 2006):



Uso del Quelante Etilendiaminotetraacético-disódico

La estrategia que se siguió en éste trabajo fue la de eliminar las jarositas (precipitados de hidroxisulfatos), utilizando Etilendiaminotetraacético-disódico (EDTA- Na_2), aprovechando las características quelantes que presenta este compuesto para secuestrar metales, ya que forma complejos estables de estequiometría 1:1 con la mayoría de los iones metálicos, los cuales son llamados átomo central y al grupo unido al átomo central, en este caso el EDTA se le conoce como ligando. El número de enlaces que puede formar el átomo metálico central es el número de coordinación del metal (Day y Underwood, 1989).

La eficacia del EDTA radica en que contiene oxígeno como donador de electrones y nitrógeno, los cuales son particularmente eficaces para formar complejos estables con una amplia variedad de metales. Además, es un ligando hexadentado potencial que puede coordinar con un ion metálico mediante sus dos nitrógenos y sus cuatro grupos carboxilos. A continuación en la Figura 1 se presenta su fórmula química estructural.

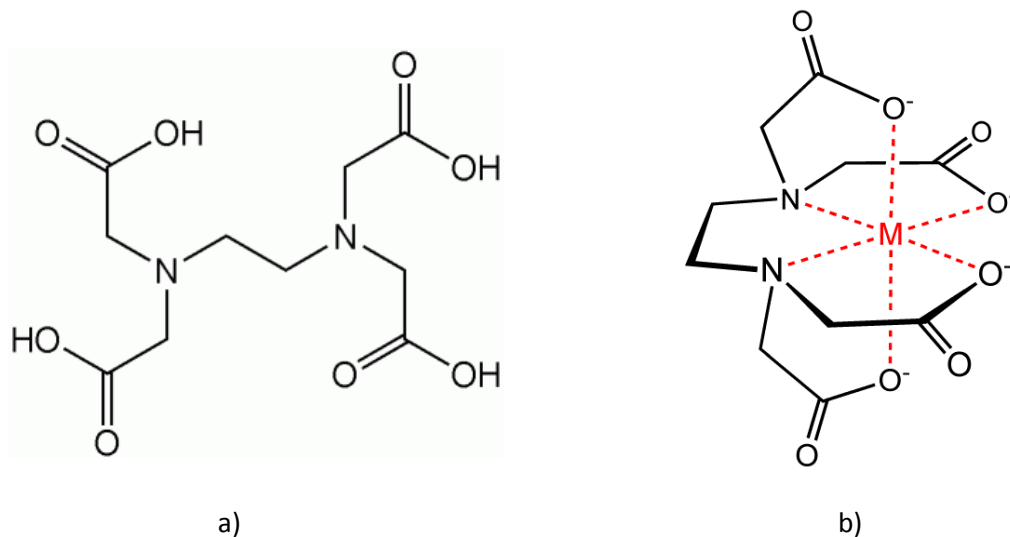


Figura 1. a) Estructura química del ácido etilendiaminotetraacético en su forma libre y b) en su forma coordinada unido a un metal, donde M es el metal.

Crecimiento Bacteriano

Entendemos por crecimiento bacteriano al incremento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. Esto ocurre de manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando origen a dos células (Sanz, 2011).

Denominamos ciclo celular al proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material genético de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño doble del inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas. El intervalo que transcurre en la formación de dos células a partir de una célula se llama generación y el tiempo requerido para esto se le conoce como tiempo de generación. La duración del ciclo celular coincide con el tiempo de generación y depende, en general, de los mismos factores de los que depende este.

El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Este crecimiento suele ser asincrónico puesto que cada microorganismo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Es por esto que en un momento determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y elongándose, otras que están iniciando la división celular (Romero Cabello, 2007).

Curva de Crecimiento

El crecimiento bacteriano en un cultivo de lotes se puede modelar suponiendo cuatro fases diferentes: fase de adaptación o lag, fase exponencial o logarítmica, fase estacionaria y fase de declive o de muerte (Figura 2).

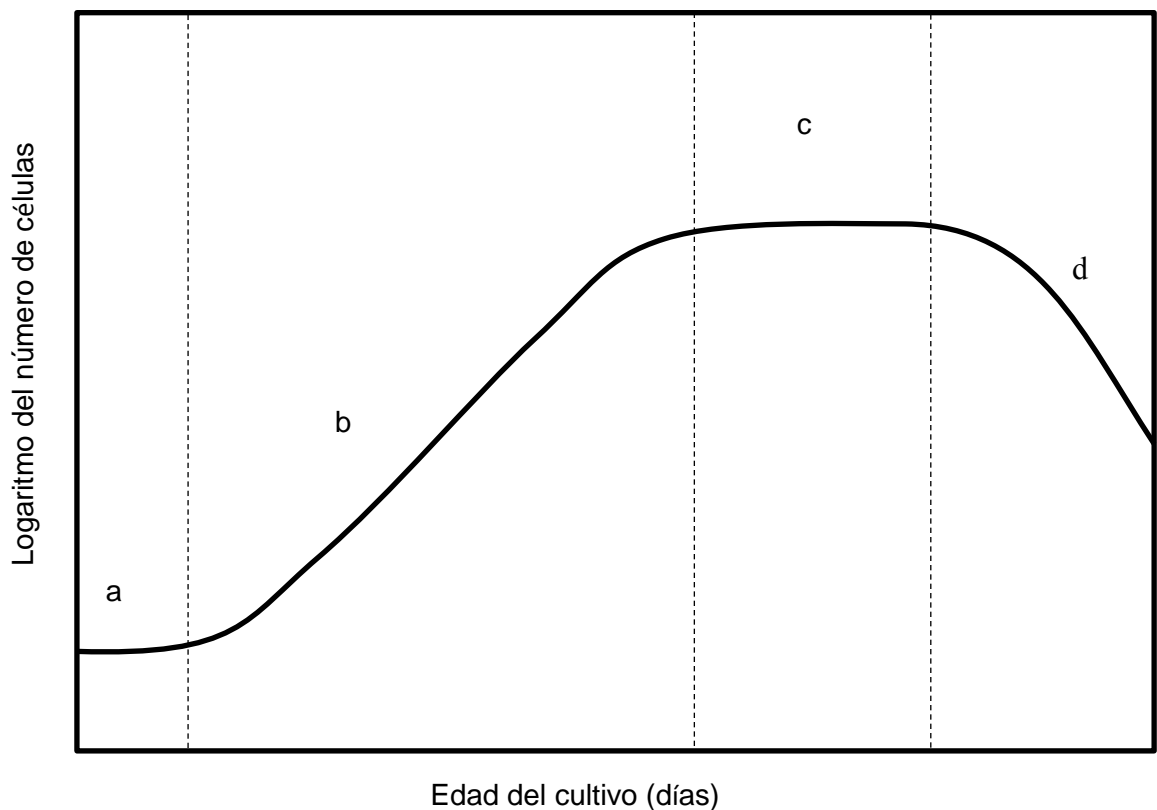


Figura 2. a) Fase de adaptación b) Fase exponencial c) Fase estacionaria d) Fase de muerte. (Romero Cabello, 2007)

Fase de adaptación (lag). La fase de adaptación o lag es el tiempo que pasa desde que una población bacteriana es inoculada en un medio fresco a cuando esta comienza su crecimiento (Figura 2). La fase de adaptación representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en estas nuevas condiciones. En esta fase no hay incremento de células, pero hay una gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células. Si un cultivo que se encuentra en su fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase lag y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad (Romero Cabello, 2007).

Fase exponencial (log). La fase exponencial o logarítmica es el periodo de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un cierto tiempo de generación la población se duplica. Para este tipo de crecimiento exponencial, la representación gráfica del logaritmo del número de células frente al tiempo genera una línea recta (Figura 2). La pendiente de la recta en la figura depende de la base del logaritmo utilizada, y dependiendo de esa base, se aplican diferentes fórmulas para su estudio. Bajo las condiciones óptimas la velocidad de crecimiento es máxima, por otro lado, esta se puede ver afectada por condiciones ambientales como son la temperatura, la composición del medio de cultivo, el pH entre otros. Esta fase el crecimiento se puede representar por medio de la ecuación 7 (Romero Cabello, 2007; Sanz, 2011):

$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (7)$$

Dónde:

X= Concentración de Biomasa final a cualquier tiempo de crecimiento, cel/mL.

X₀=Concentración de Biomasa inicial, cel/mL.

μ= Tasa o velocidad específica de crecimiento; h⁻¹.

t= Tiempo de cultivo, h.

e= Constante del logaritmo natural

Para la obtención de la μ, en la fase exponencial:

$$\mu = \frac{\ln(X_1 - X_0)}{t_1 - t_0} \quad (8)$$

Dónde:

ln= Logaritmo natural

t₁= Tiempo de cultivo final

t₀= Tiempo de cultivo inicial

A partir de esta ecuación se puede calcular el tiempo de generación (T_G) o de duplicación (T_d) como se muestra en la ecuación 9:

$$T_G = \ln \frac{2X}{\mu} \quad (9)$$

Fase estacionaria. Durante la fase estacionaria, la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes esenciales y acumulación de productos tóxicos. Esta fase se alcanza cuando las bacterias empiezan a agotar los recursos disponibles en el medio de cultivo en el que se encuentran. La fase estacionaria se caracteriza por un valor constante del número de bacterias a medida que la tasa de crecimiento de estas se iguala con la tasa de muerte bacteriana (Figura 2) (Madigan y col., 1997; Romero Cabello, 2007).

Fase de declive (muerte). En la fase de declinación, las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren. Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero comenzará una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte (Figura 2) (Madigan y col., 1997).

Técnicas para Medir el Crecimiento Microbiano

Métodos Directos

Conteo celular con hematocitómetro. A pesar del enorme desarrollo tecnológico que ha tenido lugar en los laboratorios científicos, el conteo visual con hematocitómetro sigue siendo el método de conteo más usado desde el siglo XIX. El principal instrumento que se utiliza para este tipo de conteo es una Cámara de Neubauer. Esta es una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En una cámara simple, la porción central que es donde se realiza el conteo, está dividida en tres partes. En la parte central se encuentra grabada una retícula cuadrangular. En el caso de las cámaras dobles, que son las más comunes, existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara. La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. Subdividida a su vez en nueve cuadros de 1 mm de lado cada uno. El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0.2 mm de lado y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños. El cuadrado central, por lo tanto, está formado por 400 cuadrados pequeños (Figura 3) (Paniagua-Michell y col., 1989).

Para realizar la cuenta en una cámara de Neubauer se toma un volumen medido de una suspensión bacteriana y se coloca dentro de un área definida de la cámara. El promedio del número de células en cada una de las series de estos cuadros es calculado y multiplicado por el factor de volumen de la cámara y por el factor de dilución de la suspensión para obtener el número de células por mililitro que contiene el cultivo evaluado.

Generalmente el rango de concentraciones que permite contar el hematocitómetro está entre las 250,000 células y 2,5 millones de células por mL. La concentración óptima para esta técnica de conteo es de un millón de células por mL (10^6 células/mL). Conteos por debajo de las 250 mil células (2.5×10^5) no se consideran suficientes para poder dar una estimación confiable de la concentración celular.

La principal ventaja de este método es que no se requiere de tiempo de incubación para poder realizar el conteo. Por otro lado, la desventaja de este método es que en muchos casos las células se adhieren a superficies de sólidos contenidos en la muestra, dificultando así el conteo de las bacterias. Otra de las principales desventajas es que esta técnica consiste en una labor muy intensiva y provoca fatiga al operador que lleva a cabo el trabajo (Kennedy y col., 1992).

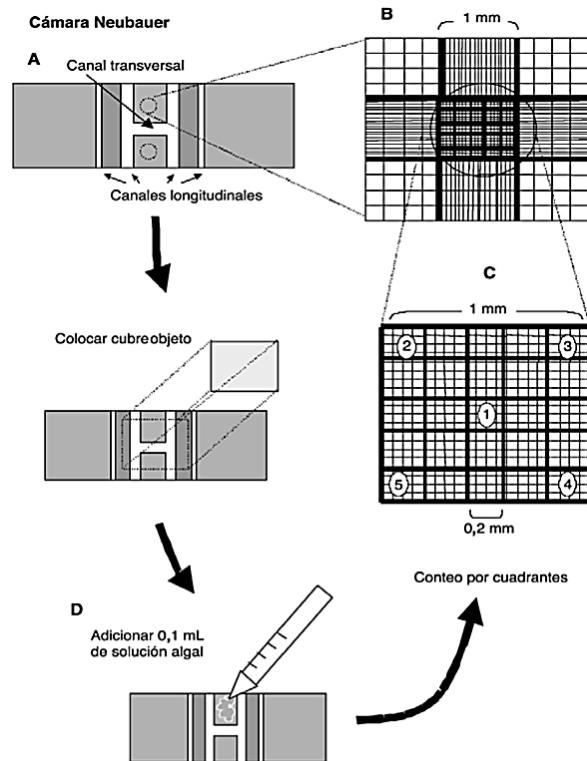


Figura 3. Esquema de una cámara de conteo Neubauer (Celeromics, 2006)

Peso seco. La cantidad total de biomasa presente en una muestra puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos en suspensión totales o sólidos en suspensión volátil. Las células se separan del líquido por centrifugación o por filtración.

La principal desventaja de estas técnicas es que su determinación incluye no sólo microorganismos activos sino microorganismos muertos, material inerte, polímeros extracelulares, y materia orgánica adsorbida. Además, no puede aplicarse cuando los sustratos a degradar son insolubles. Este método se considera simple, pero consume bastante tiempo y es poco reproducible. Este método solo es aplicable a muestras que no tengan interferentes en el medio de cultivo como gomas, sólidos, entre otros (Tortora y col., 2004).

Métodos Indirectos

Este tipo de métodos se basan en la determinación de algún componente celular específico, en la cuantificación de alguna actividad enzimática o en la medida de consumo de sustrato o de la formación de algún producto.

Los métodos bioquímicos y cinéticos determinan más que la viabilidad de las bacterias, la actividad ya que dependen más del estado metabólico de los microorganismos que del número de individuos (Oria y col., 2000).

Componentes celulares específicos. Cualquier componente celular seleccionado para la estimación de biomasa viva de una muestra debe de estar presente únicamente en células vivas, degradarse rápidamente cuando las células mueran y ser relativamente constante en concentración respecto a cambios en el estado fisiológico celular.

No existe ningún componente celular que cumpla con los tres requerimientos antes mencionados. Sin embargo, los más adecuados para estimar biomasa viva son los ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos y ATP (Oria y col., 2000).

Ácidos nucleicos. El ADN y el ARN son dos componentes de las bacterias cuya síntesis es proporcional a la tasa de crecimiento. Las concentraciones de ARN varían considerablemente con el estado fisiológico en el que se encuentren las células. Por otro lado, en comparación con el ARN, la cantidad de ADN que se encuentra en las bacterias es relativamente más constante (Oria y col., 2000).

Polisacáridos. La mayoría de las células procariotas contienen ácido murámico como componente de la pared celular. Existen varias técnicas para la determinación del ácido murámico en muestras que contengan microorganismos. Todas ellas se basan en la conversión del ácido murámico a lactato, seguida del análisis enzimático o químico de la concentración de lactato. El ácido murámico se extrae de las células mediante una hidrólisis alcalina y se purifica posteriormente mediante cromatografía de intercambio iónico. Otros análisis más sensibles necesitan del uso de cromatografía líquida o gaseosa. Todas estas técnicas son laboriosas, caras y necesitan de un equipamiento caro (Oria y col., 2000).

Lípidos. Los lípidos son un componente fundamental de las membranas celulares. La determinación de estos para la estimación de biomasa de una población bacteriana ofrece algunas ventajas sobre otros métodos. Una de estas ventajas es su alto contenido específico y que se encuentran en cantidades relativamente constantes. Otra ventaja importante es que los lípidos no forman parte de las reservas celulares y se degradan rápidamente durante la lisis bacteriana.

Las técnicas de análisis se basan en la extracción celular de los fosfolípidos con un disolvente orgánico, para después someterlos a una hidrólisis ácida para liberar el fosfato y por último la determinación colorimétrica de éste. Son técnicas sencillas, reproducibles y sensibles (Oria y col., 2000).

Proteínas. Actualmente existen varias técnicas para el análisis de proteínas totales de una muestra biológica. Algunos están muy extendidos y se caracterizan por su sensibilidad, rapidez y simplicidad. La principal desventaja de la determinación de proteínas es que su cantidad en las células está sujeta a fuertes variaciones debido a cambios en las condiciones fisicoquímicas y al estado fisiológico celular. Dentro de las técnicas para la determinación de proteínas se encuentran las propuestas por Lowry y col. y Bradford y col. (Peterson, 1977; Bradford, 1976).

El método de Bradford se basa en la unión del colorante azul de Comassie G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul, formando un complejo proteína-colorante lo que causa un cambio en la absorción máxima del colorante de 465 a 595 nanómetros. Este método es sensible ya que detecta entre 1 y 15 µg de proteína, es rápido, reproducible, barato y pocas sustancias como sodio, potasio, carbohidratos y detergentes interfieren en su determinación.

Métodos espectrofotométricos (Densidad óptica). Se basan en la existencia de una relación directa entre el número total de microorganismos presentes en una muestra y su valor de turbidez. Tras la determinación de la turbidez de la suspensión celular mediante espectrofotometría, el resultado se expresa en unidades de absorbancia. Este método fundamenta su metodología tomando como base la ley de Lambert-Beer y sirve para cuantificar algunos compuestos por absorción del rango de luz a diferentes longitudes de onda, así se puede seguir la desaparición de sustratos o la aparición de productos.

Según la ley de Beer la densidad óptica o absorbancia de una solución, es directamente proporcional a la concentración de partículas disueltas en el medio, aumentando la absorbancia conforme aumenta el número de partículas disueltas presentes en la muestra (Pelczar Jr y Reid, 1958).

Para medir la turbidez se utiliza un espectrofotómetro o colorímetro. En el espectrofotómetro un rayo de luz es transmitido a través de una suspensión de bacterias a una celda fotoeléctrica. Al incrementar el número de bacterias suspendidas en la muestra, es menor la cantidad de luz que llega a la celda foto eléctrica. Este cambio en la cantidad de luz se ve

reflejado en la escala del espectrofotómetro como porcentaje de transmitancia o sobre una escala de expresión logarítmica llamada absorbancia, la cual representa un valor derivado del porcentaje de transmitancia como se puede apreciar en la Figura 4.

Se trata de un método rápido, pero de baja sensibilidad y que presenta problemas dependiendo del medio de cultivo, del tipo de cultivo y principalmente de interferencias con partículas presentes en las suspensiones bacterianas.

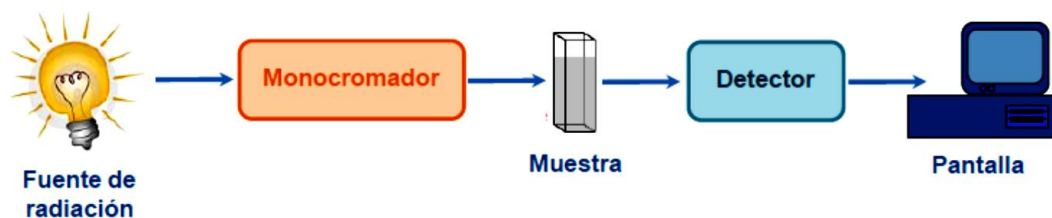


Figura 4. Esquema de un espectrofotómetro para medición de turbidez (Acebo-González y Hernández-García, 2013).

Consumo de sustrato. La determinación del sustrato como ion ferroso (Fe^{2+}) durante el crecimiento de un microorganismo es una forma indirecta de medir su crecimiento, ya que al disminuir la concentración del sustrato nos indica que el microorganismo lo está metabolizando, a su vez podemos medir la aparición de productos (Tortora y col., 2004).

Tanto *Acidithiobacillus ferrooxidans* como *Leptospirillum ferrooxidans* utilizan como fuente de energía sulfato ferroso, éste es oxidado a medida que el microorganismo lo está metabolizando y a su vez está produciendo con el cambio de oxidación la formación de sulfato férrico, el cual se puede observar en el medio de cultivo por el cambio de color que presenta; al inicio el medio de cultivo es completamente líquido de color verde claro transparente; al producirse el sulfato férrico el medio cambia un color café rojizo produciendo turbidez debido a las partículas sólidas de sulfato férrico.

Cuando la muestra cuya concentración exacta se desea determinar no tiene propiedades ácido-base, no es posible realizar titulaciones. Sin embargo, si la muestra problema es capaz de oxidarse, será posible determinar su concentración mediante una valoración con un oxidante fuerte.

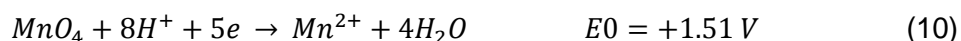
Las reacciones que transcurren con pérdida o ganancia de electrones de un átomo, ion o molécula a otro se llaman reacciones de oxidación-reducción o reacciones redox (Ponce y col., 2012; Lotfalian y col., 2015).

La oxidación es una pérdida de uno o más electrones; la reducción es una ganancia de uno o más electrones. Siempre que exista una oxidación también existe una reducción, ambos procesos son simultáneos.

El permanganato de potasio es un reactivo que se ha utilizado como agente oxidante fuerte y es muy utilizado para este fin. Tiene la ventaja de que sus soluciones poseen una coloración muy intensa, mientras la forma que adopta al reducirse en medio ácido, el Mn^{2+} , es prácticamente incoloro. Esta propiedad permite detectar el punto final de la reacción sin necesidad de agregar un indicador visual, ya que el mismo actúa como indicador al estar en exceso cuando termina la reacción (Figura 5).

Los cálculos que se emplean para las soluciones estándar se basan en la obtención de la Normalidad, el peso equivalente que participa en una reacción redox es el peso fórmula de la sustancia pesada y que se determina dividiendo el peso fórmula entre el total de electrones intercambiados en la reacción.

Las titulaciones con permanganato utilizadas en las determinaciones se llevan a cabo en solución ácida, por lo que el peso equivalente del permanganato es un quinto del peso molecular. El fundamento de la acción del permanganato en solución ácida sobre un agente reductor puede expresarse por la ecuación:



Como puede observarse el manganeso cambia su valencia de +7 a valencia +2. De acuerdo a la ecuación, el peso equivalente es igual a:

$$Peso\ Equivalente = \frac{PMKMnO_4}{5e^-} = \frac{158.5}{5} = 31.606 \quad (11)$$

El ácido que se emplea de preferencia en los métodos permanganométricos es el ácido sulfúrico, ya que el HCl tiene cierta acción reductora sobre el permanganato.

Los métodos basados en el poder oxidante del permanganato son numerosos y de fácil ejecución en su gran mayoría; sin embargo, existe el inconveniente de que la estabilidad de las soluciones de permanganato solamente se logra mediante técnicas especiales en su preparación, ya que la sal no es una sustancia de alta pureza, contiene peróxido de manganeso que es un catalizador que acelera la descomposición de permanganato. Para obtener una solución estable, es necesario que esté libre de peróxido y por lo tanto también de sustancias

reductoras; en estas condiciones, se pueden preparar soluciones de permanganato cuyo título permanece constante durante varios meses.

Por lo tanto, para preparar una solución de permanganato se deben tomar precauciones especiales. Las instrucciones usualmente indican disolver los cristales, calentar para destruir las sustancias que se puedan reducir y filtrar la solución a través de asbesto o de fibra de vidrio para remover el MnO_2 . Después de esto la solución se estandariza y se mantiene en la oscuridad y no se acidifica. El $KMnO_4$ no puede usarse como patrón primario, por ser un oxidante muy fuerte, puede haber reaccionado parcialmente ya con algún reductor con el que hubiera entrado en contacto. Es común entonces que en una muestra de $KMnO_4$ no todo el manganeso se encuentre presente como Mn VII. La sustancia que se emplea como *patrón primario* para determinar la concentración de las disoluciones de $KMnO_4$ es el oxalato de sodio. La reacción Redox que se lleva a cabo se representa en la siguiente reacción y la forma de prepararlo y valorarlo se muestra en la Figura 5:

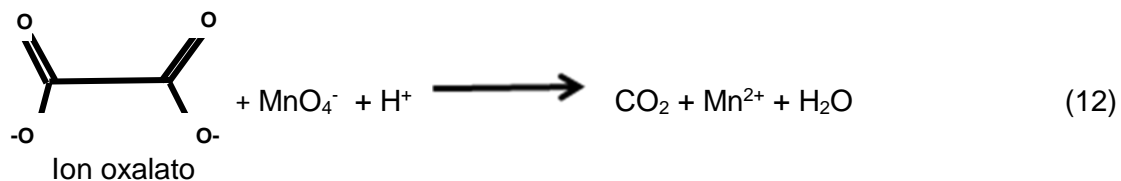


Figura 5. Preparación y valoración del $KMnO_4$

MATERIALES Y METODOS

Descripción General del Trabajo

Se aisló y se propagó un cultivo mixto con capacidad de biolixiviar metales de efluentes mineros procedentes del proceso de la Planta Minera de Extracción por Solventes y Deposición Electrolítica (ESDE) del Grupo México ubicada en Nacozari de García, Sonora, México. Este procedimiento se llevó a cabo en un biorreactor en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sonora, esto con el propósito de evaluar técnicas para medir el crecimiento del cultivo mixto.

Para realizar este trabajo se obtuvo un concentrado de células a partir de cultivos agotados a los que se les eliminó el caldo de cultivo por medio de centrifugación y se lavó con una solución de sales minerales y EDTA-NaCl con el fin de eliminar restos del medio de cultivo donde crecieron dichas bacterias. El concentrado de bacterias se utilizó para estandarizar técnicas de conteo celular, densidad óptica y determinación de proteína celular. El consumo de ion ferroso se estandarizó a partir de una curva de calibración de hierro la cual se construyó mediante una serie de diluciones de concentración conocida de sulfato ferroso, la concentración del ion ferroso fue determinada por titulación con KMnO_4 0.01N. La Figura 6 muestra el esquema para la estandarización de las técnicas a evaluar.

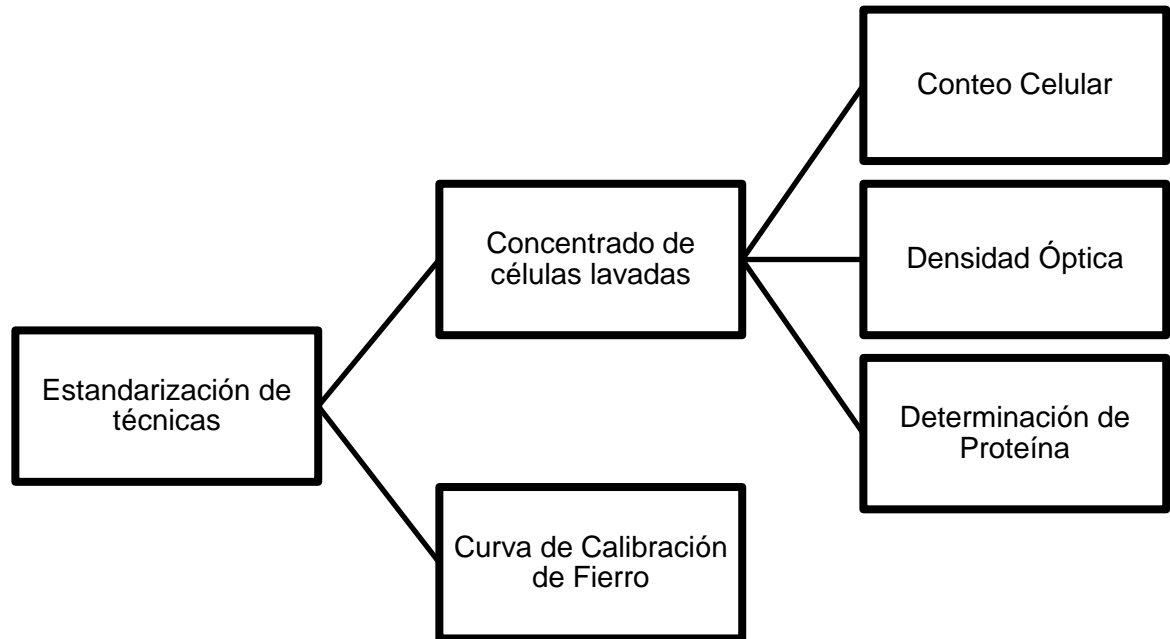


Figura 6. Esquema de la estandarización de técnicas para medir el crecimiento del cultivo mixto biolixiviador de metales.

Con las técnicas estandarizadas se evaluaron los parámetros anteriormente mencionados en un cultivo experimental. Un grupo de células del cultivo fueron lavadas con las soluciones antes mencionadas a las que se les llamo células lavadas (CLV), mientras que a otro grupo no se les aplicó la técnica de lavado y fueron llamadas células sin lavar (CSL). Con los datos obtenidos de los parámetros evaluados se realizaron correlaciones entre ellos y de igual manera se determinaron los parámetros de la cinética de crecimiento, considerándose el tiempo de duración de la fase *lag*, velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de doblado(T_d), rendimiento celular (Y). Todos los parámetros evaluados en este trabajo fueron comparados entre el grupo de células lavadas y el grupo de células no lavadas. La Figura 7 muestra el diagrama de flujo de los parámetros evaluados en esta investigación.

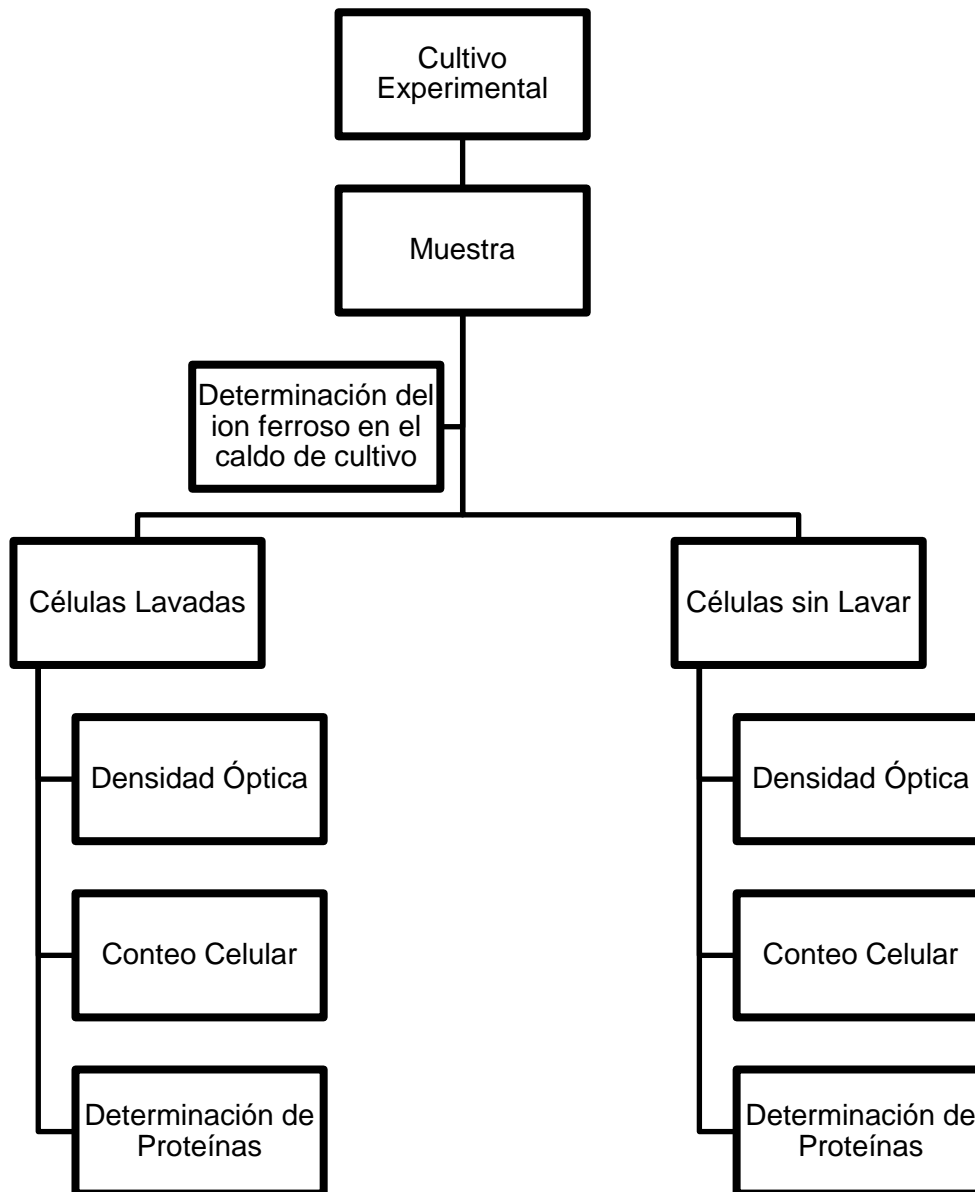


Figura 7. Diagrama de flujo de los parámetros evaluados en esta investigación.

Para desarrollar el presente trabajo se utilizaron los materiales y métodos que se describen a continuación.

Microorganismos

Se propagó un cultivo mixto de bacterias aislado de efluentes de aguas de cola de la planta ESDE – Grupo México de la mina “La Caridad” ubicada en Nacoziari de García, Sonora.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento del cultivo mixto es un medio líquido definido a base de sales minerales conocido como 9K. Este medio se encuentra compuesto por los reactivos mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de medio de cultivo 9K

Constituyentes	Formula	g/L
Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0
Fosfato de Potasio Monobásico	KH_2PO_4	0.054
Fosfato de Potasio Dibásico	K_2HPO_4	0.058
Cloruro de Potasio	KCl	0.116
Sulfato de Magnesio Monohidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.058
Nitrato de Calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.00168
Sulfato Ferroso Heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44.2
pH	pH	2.0

Fuente: (Liu y col., 2009)

Se utilizó una solución ácida de H_2SO_4 (10N) para acidificar el medio de cultivo ajustando el pH a 2.0. Como diluyente se utilizó agua deionizada.

Solución de Sales Minerales

Se preparó una solución de sales minerales con la finalidad de realizar lavados y diluciones de las muestras obtenidas del cultivo, en la Tabla 3 se muestra su composición.

Tabla 3. Composición de la solución de sales minerales.

Constituyentes	Formula	g/L
Sulfato de Amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0
Fosfato de Potasio Monobásico	KH_2PO_4	0.054
Fosfato de Potasio Dibásico	K_2HPO_4	0.058
Cloruro de Potasio	KCl	0.116
Sulfato de Magnesio Monohidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.058
Nitrato de Calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.00168
pH	pH	2.0

Fuente: (Liu y col., 2009)

De igual manera se utilizó la solución de H_2SO_4 (10N) para ajustar el pH a 2.0. Se utilizó agua deionizada como diluyente.

Condiciones de Cultivo

Se realizó una reactivación del cultivo utilizando un matraz Erlen-Meyer de un volumen de 2000 mL al cual se le agregaron 500 mL del medio 9K inoculándose con 5% del volumen total de cultivo de bacterias y se incubó a 32 °C con agitación constante sobre una placa de agitación magnética. El cultivo se alimentó con una mezcla constante de gases con una relación de volúmenes de 95% de aire y 5% de CO_2 mediante un dosificador de gases (Figura 8). Una vez lograda la activación del cultivo, se realizó un conteo de bacterias para determinar la concentración final de este y así poder inocular en un volumen mayor. Una vez hecho esto se colocó el cultivo en un biorreactor Microferm ® Fermentor (New Brunswick Scientific Co. Inc.) a un volumen total de 3000 mL y con una concentración inicial de 2×10^6 células/mL bajo las condiciones anteriormente descritas (Figura 9). El cultivo fue monitoreado durante su crecimiento hasta que el sustrato (ion ferroso Fe^{+2}) fuera consumido por completo.



Figura 8. Reactivación de cultivo

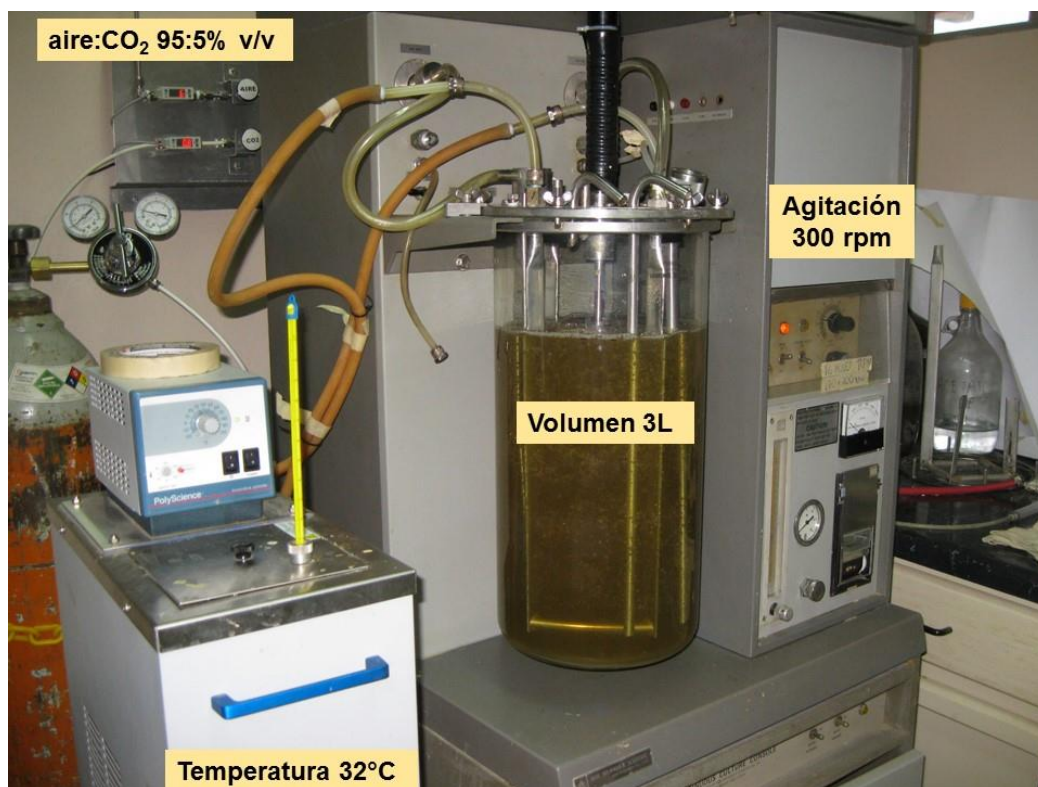


Figura 9. Sistema experimental del cultivo mixto en un biorreactor.

Técnicas Analíticas

Lavado de la Cristalería

Todo el material de vidrio utilizado fue previamente lavado con una solución de HCl:H₂O en una relación de volúmenes de 1:3 respectivamente, permaneciendo en ésta solución al menos 24 horas, para eliminar la presencia de metales y sales inorgánicas que pudieran ser interferentes en los análisis de las muestras. Después del tratamiento con la solución ácida acuosa el material se enjuagó con agua deionizada y fue secado en una estufa de convección de aire y se almacenó hasta ser utilizado.

De igual manera los tubos de microcentrifuga, puntas de micropipeta, vasos de precipitado y los tubos de ensaye que fueron utilizados se lavaron en una solución de detergente Extran al 2%, permaneciendo un mínimo de 12 horas en esta y posteriormente realizando el mismo procedimiento de enjuague con agua deionizada.

Estandarización de la Medición de Ion Ferroso (Fe²⁺)

Se preparó una solución madre con 44.6 g de FeSO₄•7H₂O para obtener ocho gramos de Fe²⁺ en un volumen total de un litro. A partir de esta se prepararon 13 diluciones seriadas con un volumen total de 10 mL con diferentes concentraciones de ion ferroso (Fe²⁺) desde 0.2 a 8 g de Fe²⁺/L. A partir de cada una de estas diluciones, se tomó un ml de cada una y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, se le adicionaron 10 mL de una solución de H₂SO₄:H₂O en una relación de volúmenes de 1:1 y se aforó a 100 mL con agua deionizada. Las diferentes muestras fueron valoradas con KMnO₄ 0.01N hasta el primer vire de color rosa tenue, las determinaciones se hicieron por triplicado. Con los resultados obtenidos se graficaron los valores de las concentraciones de las diluciones obtenidas de forma teórica contra los valores de las concentraciones obtenidas de forma experimental para realizar una correlación de los datos por medio del ajuste de una recta y con el valor del coeficiente de determinación (R²).

Determinación del Ion Ferroso (Fe²⁺)

Se utilizó la determinación del ion ferroso (Fe²⁺) ya que es una forma indirecta de medir el crecimiento de los microorganismos que crecen en el medio 9K, también nos ayudó a determinar el tiempo en el que se agotaba el sustrato en el medio de cultivo. El ion ferroso se

determinó por medio de una titulación por el método de permanganometría. Para realizar esto se tomó un mL del caldo de cultivo de las muestras tomadas en diferentes intervalos de tiempo, se adicionaron 10 mL de una solución de H₂SO₄:H₂O en una relación de volúmenes de 1:1 para mantener condiciones ácidas en la muestra y se tituló con KMnO₄ 0.01 N. La titulación se llevó a cabo hasta que se lograba observar el primer vire de color rosa pálido, lo cual nos indicaba que todo el ion ferroso contenido en la muestra había reaccionado con el KMnO₄. También se preparó un blanco de reactivos utilizando solo agua y H₂SO₄:H₂O, titulándose de la misma manera que las muestras. El blanco se utilizó para restar el consumo de KMnO₄ que aportan los reactivos con el agua. La concentración del ion ferroso en el medio de cultivo se determinó mediante la ecuación 13.

$$[Fe^{2+}] = \frac{(mL\ KMnO_4 - mL\ KMnO_4\ del\ Blanco)(N\ KMnO_4)(mEq\ equivalentes\ Fe)(Volumen\ Total)}{mL\ de\ Muestra} \quad (13)$$

Dónde:

mL de KMnO₄: mL gastados por la muestra.

mL de KMnO₄ de blanco: mL gastados por el blanco de reactivos sin muestra.

N del KMnO₄: es la normalidad del permanganato de potasio que se obtiene cuando se valora el reactivo.

mEq Fe/L: milésima parte de la masa de una sustancia dada que reacciona con un mol de electrones en una reacción redox = 0.05585 .

Volumen Total: Volumen en que se llevó a cabo la reacción (100 mL).

mL de muestra: mL utilizados (1 mL)

Lavado del Paquete Celular

El paquete celular se preparó de dos formas: a una serie de muestras se les aplicó una técnica de lavado con sales minerales y con EDTA-NaCl, denominadas células lavadas (CLV), mientras que a la otra serie solo se aplicó un lavado con sales minerales y fueron denominadas como no lavadas (CSL).

Para el paquete de CLV se tomó un mL de cada muestra obtenida y se depositó en un tubo de microcentrifuga. Estos fueron centrifugados durante diez minutos a 10,000 rpm para eliminar el caldo de cultivo. Al precipitado obtenido se le agregó 1.5 mL de sales minerales para lavar el cultivo y se centrifugó de nuevo, descartando el sobrenadante obtenido y repitiendo el

proceso una vez más. Posteriormente se utilizó una mezcla de dos soluciones de Etilendiaminotetraacético-disódico (EDTA-disódico) y cloruro de sodio (NaCl) a pH 8.0 para lavar el paquete celular obtenido previamente con el fin de eliminar las jarositas. Al precipitado recuperado se le agregaron 500 µL de EDTA-NaCl, se agitó por medio de un agitador tipo vortex y se dejó reposar la muestra durante cinco minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó el sobrenadante obtenido y se pasó a un tubo limpio, repitiendo el proceso anterior hasta tener aproximadamente un mL de muestra. Este proceso se realizó por triplicado para cada muestra obtenida.

Por otro lado, para el paquete de CSL se le eliminó el caldo de cultivo por medio de centrifugación con las mismas condiciones anteriormente mencionadas, descartando el sobrenadante obtenido. Posteriormente se le agregó solución de sales minerales y se centrifugó de nuevo, de igual manera se descartó el sobrenadante de esta. Por último, el paquete celular obtenido fue resuspendido con un mL de sales minerales.

Medición Espectrofotométrica.

La medición espectrofotométrica fue realizada tanto en las CLV como en las CSL. La medición de su densidad óptica se llevó a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 21. Ambos tipos de muestras fueron medidas a una longitud de onda de 500 nm (Barron y Lueking, 1990). Para las CLV se utilizó un blanco de la solución de EDTA-NaCl y las CSL fueron medidas contra un blanco de solución de sales minerales. Soluciones en las cuales se encontraban resuspendidas las células por el tipo de lavado al que fueron sometidas.

Cuenta Directa al Microscopio.

El paquete celular obtenido previamente se cuantificó en una cámara de Neubauer, utilizando la cuadrícula para glóbulos rojos formada por 25 cuadros grandes de un área de 1 mm² y 0.02 mm de profundidad, los cuales están divididos en 16 cuadros pequeños de un área de 0.1 mm². El número de células contadas se multiplicó por el factor volumen de la cámara de conteo, que es igual a 10,000 (10⁴) y por el factor de dilución de la muestra, como se expresa en la ecuación 14.

$$No. \frac{Células}{mL} = (No. Células)(Factor Volúmen de la Cámara de Conteo)(FD) \quad (14)$$

FD = Factor de dilución

Factor Volumen de la Cámara de Conteo = 10^4

Determinación de Proteína

Curva de Calibración de Proteína. Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de suero de bovino (BSA, por sus siglas en inglés) con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como proteína patrón y el reactivo de Bradford (1976) para realizar la determinación de proteína. Se realizaron diez diluciones con distintas concentraciones de BSA en un rango de 4 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las muestras fueron aforadas a un volumen total de 100 μL con H_2O deionizada. A las diluciones preparadas se les añadió 1 mL de reactivo de Bradford (Azul Brillante de Coomassie G250 de Bio-Rad) y se dejaron reposar por un tiempo de cinco minutos. El espectrofotómetro (Spectronic 21) se ajustó previamente antes de iniciar las mediciones de las muestras a cero utilizando un blanco de reactivos consistente en 100 μL de agua deionizada y un mL del colorante de Bradford. Se midió la Absorbancia de las muestras con proteína a una longitud de onda de 595 nm. La determinación de proteína se realizó con tres réplicas para cada una de las concentraciones medidas.

Preparación de las muestras. La determinación de proteínas se realizó en ambos tipos de muestras. Para las muestras de CLV se tuvo que realizar una serie de lavados adicionales para eliminar el EDTA-NaCl de las muestras. Esto fue realizado por medio de centrifugación para eliminar todo el líquido. Al paquete celular obtenido se le agregó solución de sales minerales para después centrifugarlas de nuevo y eliminar el sobrenadante, este paso se realizó dos veces con cada muestra. Se agregó un mL de NaOH 1N a las muestras para realizar una hidrólisis alcalina al someter las muestras a un baño con agua a 60 °C durante 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo las muestras fueron agitadas en un vortex y se colocaron en un baño de agua con hielo para inducir un choque térmico y favorecer la hidrólisis de las células. Para llevar a cabo la precipitación de proteínas se siguió el procedimiento establecido por Peterson (1977) después de la hidrólisis alcalina se obtiene el sobrenadante conteniendo la proteína soluble para después tratarla con 0.1 mL de desoxicolato de sodio al 0.15% (DOC) para eliminar lípidos de las membranas celulares y finalmente se precipita la proteína al adicionar 0.1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 72%, se centrifuga a 10 000 rpm por 15 minutos y se elimina el sobrenadante. La proteína precipitada es resuspendida con 100

μL de agua deionizada. Se utilizó el método de Bradford (1976) para cuantificar la proteína obtenida adicionando un mL de colorante Azul Brillante Coomassie G-250 con un tiempo de reacción de cinco minutos y se midió la Absorbancia a 595 nm utilizando un blanco de reactivos para ajustar a cero el espectrofotómetro.

La determinación de proteína tiene su fundamento en el uso del colorante Azul Brillante Coomassie G-250 el cual se prepara con alcohol etílico al 95 % y ácido fosfórico al 80 % y se diluye con agua deionizada. El colorante en condiciones ácidas presenta un color café rojizo mientras que al unirse la proteína al colorante forman un complejo cambiando a un color azul, la intensidad de este color es proporcional a la concentración de proteína presente. La unión de la proteína con el colorante toma aproximadamente dos minutos y se puede detectar a una absorbancia máxima de 595 nm (Bradford, 1976).

Diseño de Experimentos

El conteo celular se realizó en las CLV con sales minerales y la solución de EDTA-NaCl, así como en las CSL. Las muestras fueron obtenidas a diferentes tiempos de crecimiento del cultivo, tomando como referencia el momento en el que iniciaba la fase exponencial y a partir de este tiempo se obtuvo una muestra cada cuatro horas.

Todos los experimentos se realizarán por triplicado, para determinar las desviaciones estándar experimentales.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza por el método de Tukey Kramer entre cada uno de los pares de CLV y CSL para los distintos parámetros evaluados con un nivel de significancia de alfa igual a 0.05 ($\alpha = 0.05$), esto se llevó a cabo en el paquete estadístico JMP IN versión 4.0.4.

Se realizaron análisis de regresión a las curvas estándar obtenidas de proteína, de la cuantificación del ion ferroso, conteo celular así como para los datos experimentales obtenidos en el crecimiento celular y así obtener los parámetros cinéticos de crecimiento.

Se realizaron correlaciones entre los datos obtenidos del conteo de bacterias lavadas contra las bacterias sin lavar. De igual manera se correlacionaron los datos de los conteos contra la densidad óptica obtenida de cada una de las muestras y de la determinación de proteína. Estos últimos se realizaron tanto para las células con lavado como para las células sin lavado.

Para los parámetros cinéticos de crecimiento se realizó una correlación entre la concentración de células y consumo de sustrato contra tiempo. Se utilizó también la ecuación logística de crecimiento (ecuación 15) para obtener los valores de la velocidad específica de crecimiento, duración de la fase lag del cultivo, así como del tiempo de doblado por medio de un ajuste no lineal.

$$X = \frac{X_0 e^{\mu(t-t_{lag})}}{1 - \frac{X_0}{X_\infty} (1 - e^{\mu(t-t_{lag})})} \quad (15)$$

Dónde:

X = Densidad celular a diferente tiempo del crecimiento (cel/mL).

X₀ = Concentración de celular inicial (cel/mL).

X_∞ = Máxima concentración celular (cel/mL).

μ = Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹).

t = Tiempo en horas de cultivo.

t_{lag} = Tiempo de acondicionamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la metodología empleada para el análisis de cada una de las muestras obtenidas del cultivo de bacterias, se obtuvieron los siguientes resultados.

Estandarización de Técnicas para Medir el Crecimiento

Estandarización de Consumo de Fe^{2+}

El primer método utilizado para el análisis del crecimiento del cultivo mixto fue la cuantificación del consumo de sustrato. En este caso se realizó una determinación del ion ferroso (Fe^{2+}), siendo este un método indirecto para medir el crecimiento de los microorganismos estudiados. Para la estandarización del método se realizó una correlación entre los datos calculados teóricamente de las diferentes concentraciones de ion ferroso que estuvieron en un rango de cero a ocho g/L contra las realizadas de forma experimental, esta correlación se puede observar en la Figura 10. En dicha correlación podemos observar que se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9997 lo que nos indica estadísticamente la correspondencia que hay entre los datos calculados y los datos experimentales. Estos resultados nos permiten tener un alto grado de confianza al llevar a la práctica este método para seguir el consumo de sustrato durante el crecimiento de un cultivo experimental.

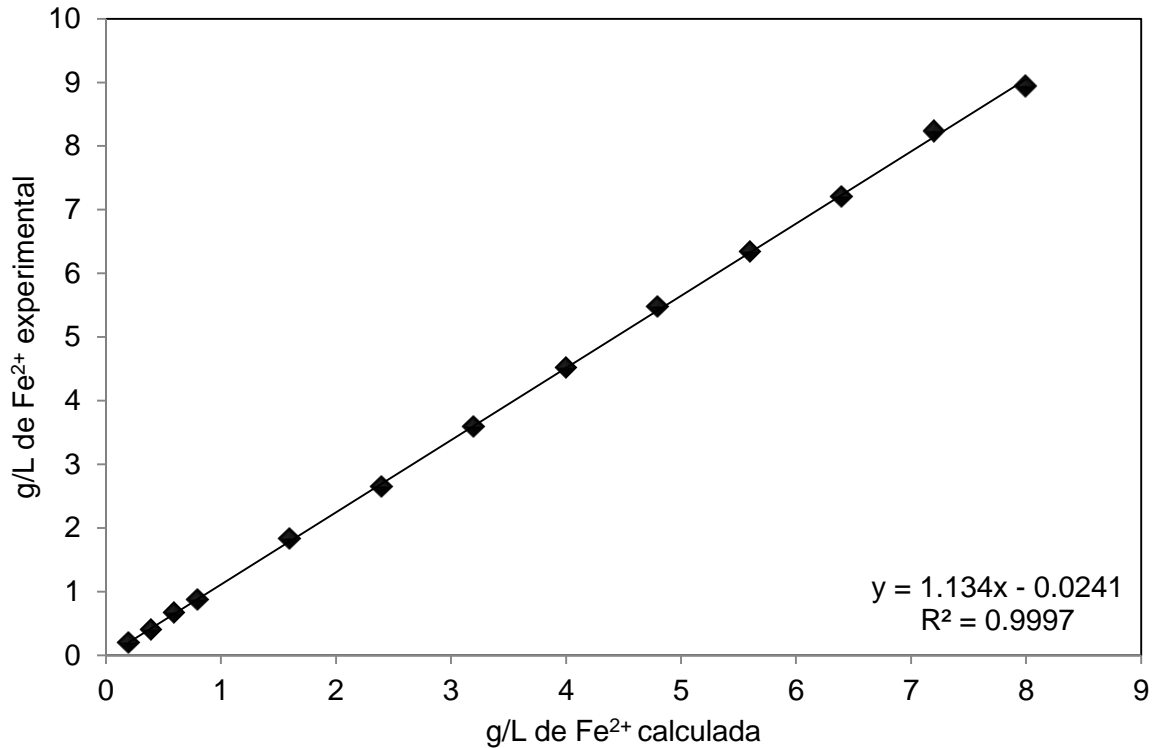


Figura 10. Correlación de la concentración del ion ferroso calculada contra la concentración de ion ferroso obtenida de forma experimental.

Estandarización de la Medición Espectrofotométrica del Contenido de Células

En la Figura 11 se muestra los resultados de la estandarización de la medición de la densidad óptica contra el conteo de células. Para realizar las pruebas de estandarización se partió de un paquete celular obtenido de cultivos agotados a los cuales se les eliminó el caldo de cultivo para concentrar las células en donde además estaban presentes sólidos que se formaron durante el crecimiento. Este paquete concentrado fue lavado previamente con sales minerales y EDTA-NaCl hasta que se eliminó una considerable cantidad de sólidos. A partir de este paquete de células se obtuvo una curva de células en un rango de concentración de cero a 10^8 células/mL, la cuenta se realizó en una cámara de conteo Neubauer bajo la lente de un microscopio óptico de contraste de fases utilizando el objetivo de 40X. En la estandarización del conteo de células se obtuvo una R^2 de 0.9381 indicándonos que existe una alta correlación lineal que es correspondiente con los valores de densidad óptica obtenidos. Barron y Lueking (1990), establecieron un método de medición espectrofotométrico de células en fase logarítmica de

crecimiento lavando las células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con únicamente la solución de sales minerales acidificada, al igual que en esta investigación encontraron una relación lineal del incremento de la absorbancia con el número de células, utilizando la medición espectrofotométrica a una longitud de onda de 500 nm. Sus valores máximos de absorbancia fueron de 0.7 para una concentración de 3.5×10^9 células/mL. Dichos investigadores realizaron su cultivo experimental con un inóculo de 1×10^8 células/mL, 6 g de Fe^{2+} y una duración de 21 h (Barron y Lueking, 1990).

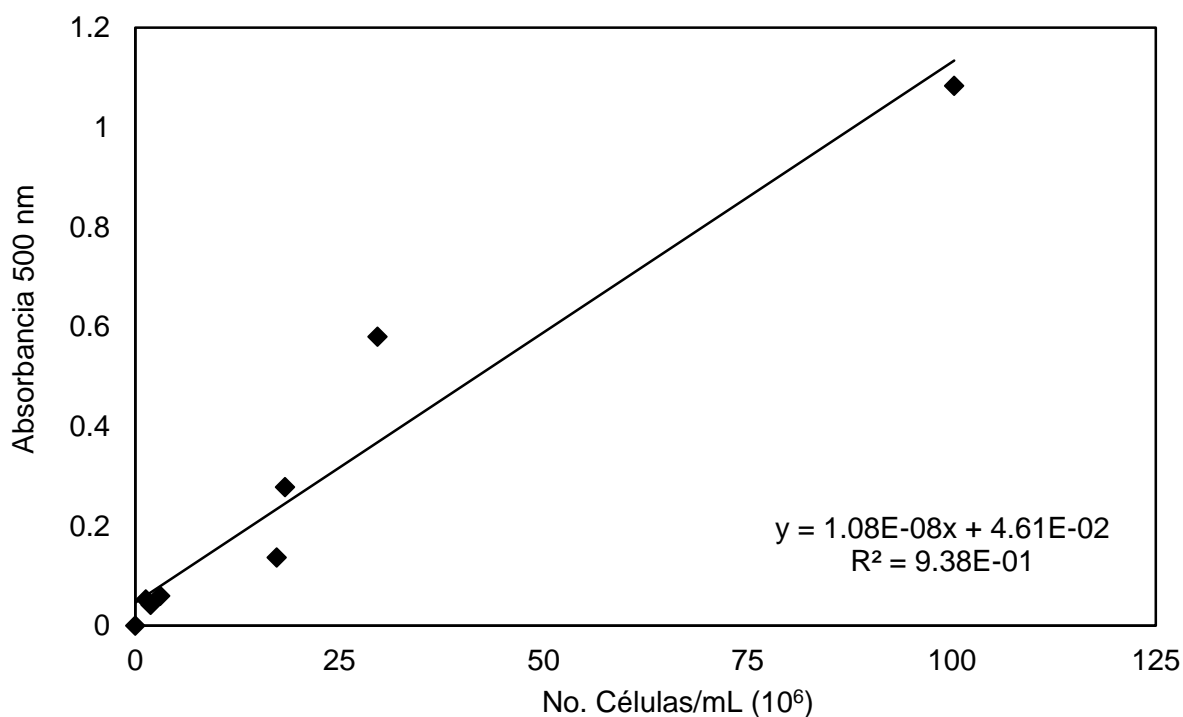


Figura 11. Estandarización de conteo de células contra absorbancia.

Estandarización del Método de Determinación de Proteína

En la Figura 12 se muestra la curva patrón de proteína BSA. En la gráfica se puede observar que se cumple esta relación de proporcionalidad al incrementarse la concentración de proteína y además presenta una alta correlación al obtener una R^2 de 0.9999 a partir de los datos obtenidos, por lo que podemos decir que este método nos da una confiabilidad del 99%.

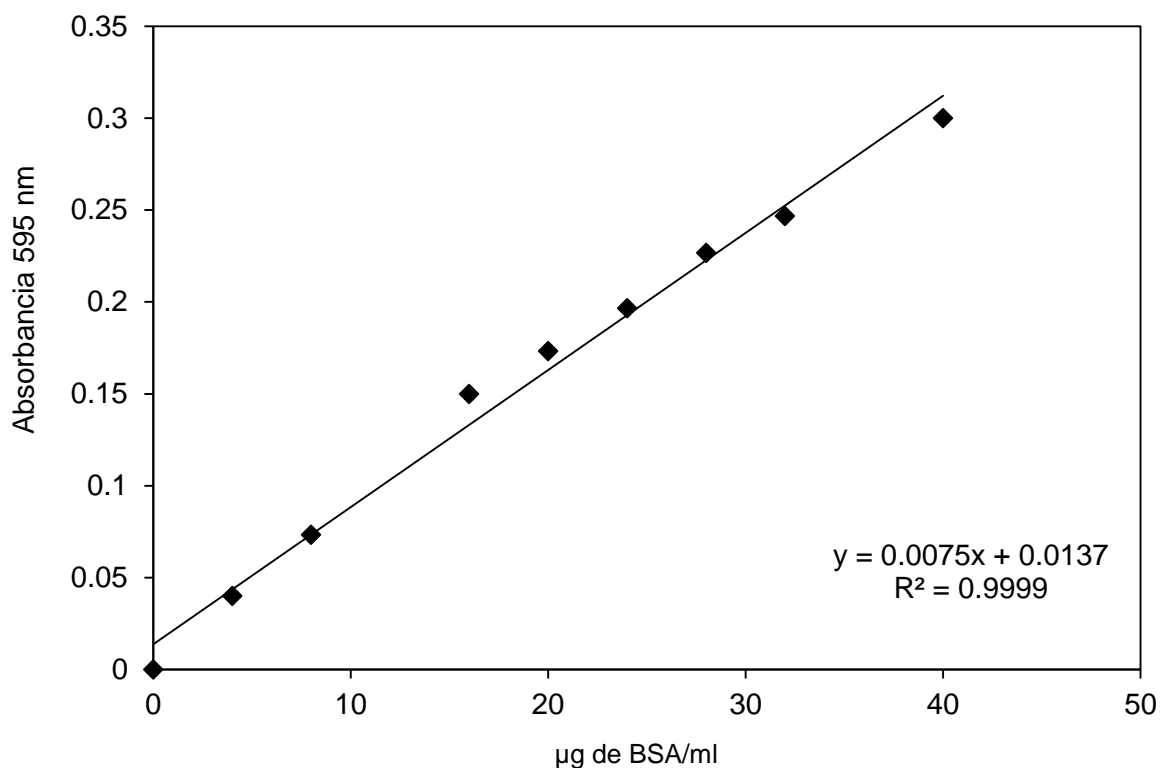


Figura 12. Curva patrón de albúmina de suero de bovino (BSA)

En la Figura 13 se muestra una correlación de la concentración de proteína contra el número de células. Esta gráfica se obtuvo para estandarizar la técnica de proteína utilizando diferentes concentraciones de células previamente lavadas utilizando las soluciones de lavado. El método estandarizado presentó una alta correlación lineal al obtener una R^2 de 0.9742 indicándonos que la concentración de proteína obtenida es proporcional al número de células en la muestra. Barron y Lueking (1990), establecieron un método de medición del contenido de proteína en células en fase logarítmica de crecimiento lavando las células de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con únicamente la solución de sales minerales acidificada, al igual que en esta investigación encontraron una relación lineal del incremento de células con el contenido de proteína en la medición espectrofotométrica.

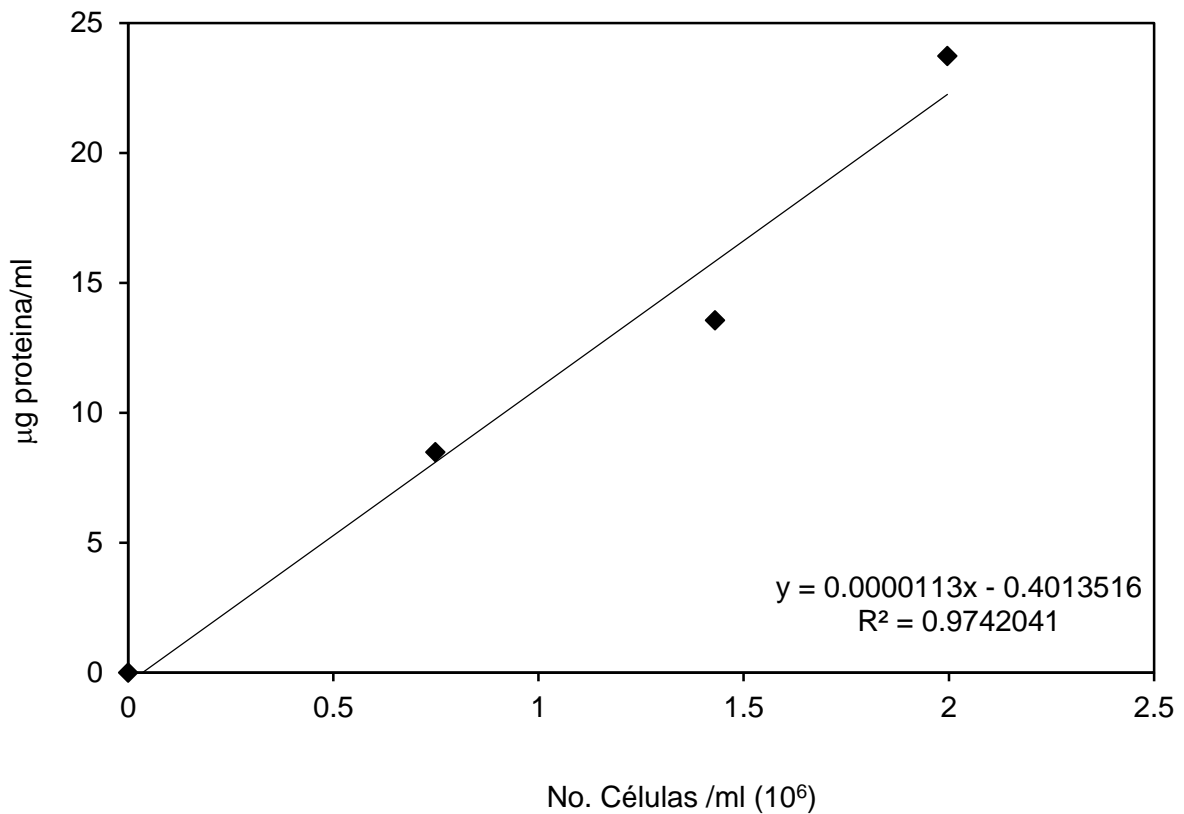


Figura 13. Correlación de la concentración de proteína contra el número de células que se obtuvo en la estandarización del método de proteína.

Resultados Experimentales

Cuantificación del Consumo de Sustrato

Se realizó una correlación de los resultados obtenidos del consumo de sustrato en el cultivo a los diferentes tiempos de muestreo contra el consumo calculado de manera teórica utilizando los parámetros obtenidos del modelo de predicción (Figura 14).

En la correlación realizada entre el consumo de sustrato experimental contra el calculado de manera teórica se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9731. Este resultado nos demuestra que existe una buena correlación lineal entre ambos grupos de datos evaluados. El método de permanganometría utilizado para medir el consumo del ion ferroso es un método sencillo y accesible que puede ser utilizado en la mayoría de los laboratorios. Es un método rápido ya que su determinación lleva de 3 a 5 minutos aproximadamente y se pueden

obtener datos en tiempo real sobre el consumo de sustrato, proporcionando información de forma indirecta de que el cultivo está creciendo. Entre otros métodos de determinación del consumo de ion ferroso se encuentran el método de la fenantrolina o por absorción atómica los cuales consumen más tiempo en su determinación y requieren de equipo más sofisticados como un equipo de absorción atómica.

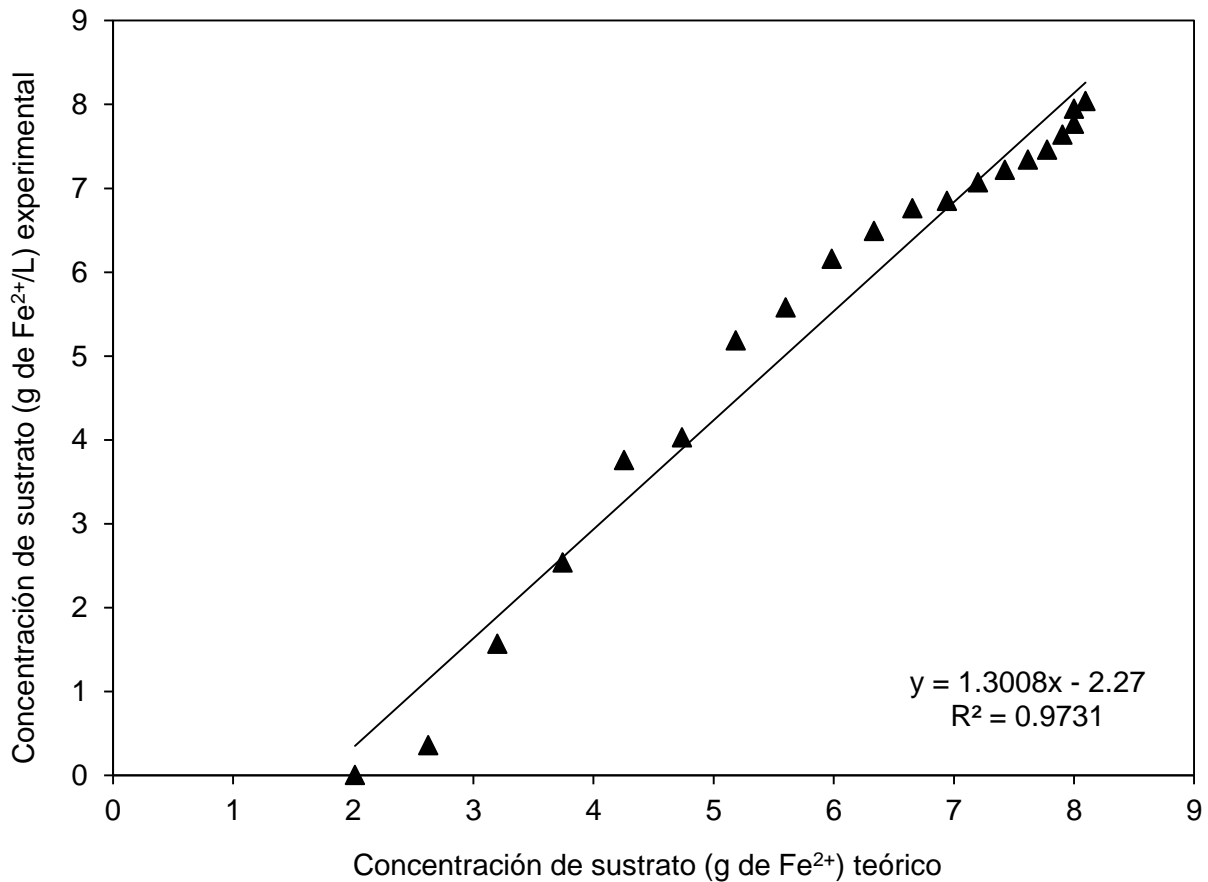


Figura 14. Correlación de consumo de sustrato calculado en forma teórica contra consumo de sustrato calculado experimentalmente.

En la Figura 15 se muestra el rendimiento de CLV y de CSL por gramo de sustrato consumido. Las CLV presentan un mayor coeficiente de correlación al obtenerse una R^2 de 0.9336 con respecto a la obtenida por las CSL de 0.8288, indicándonos que la linealidad entre estos datos es 1.125 veces más baja para las CSL. Por otra parte, se puede apreciar que las CLV presentan un mayor rendimiento por gramo de sustrato en relación con las CSL. Esto fue

determinado por medio del valor que presenta la pendiente de la recta correspondiente dando un valor de 7×10^7 células/g de sustrato para las CLV y de 1×10^7 células/g de sustrato para las CSL, siendo siete veces mayor el rendimiento celular para las CLV. Estos resultados nos indican que el conteo realizado al grupo de células con tratamiento de lavado nos da un valor más acertado en cuanto a la relación del consumo de sustrato con el crecimiento microbiano que se esperaba obtener en el cultivo.

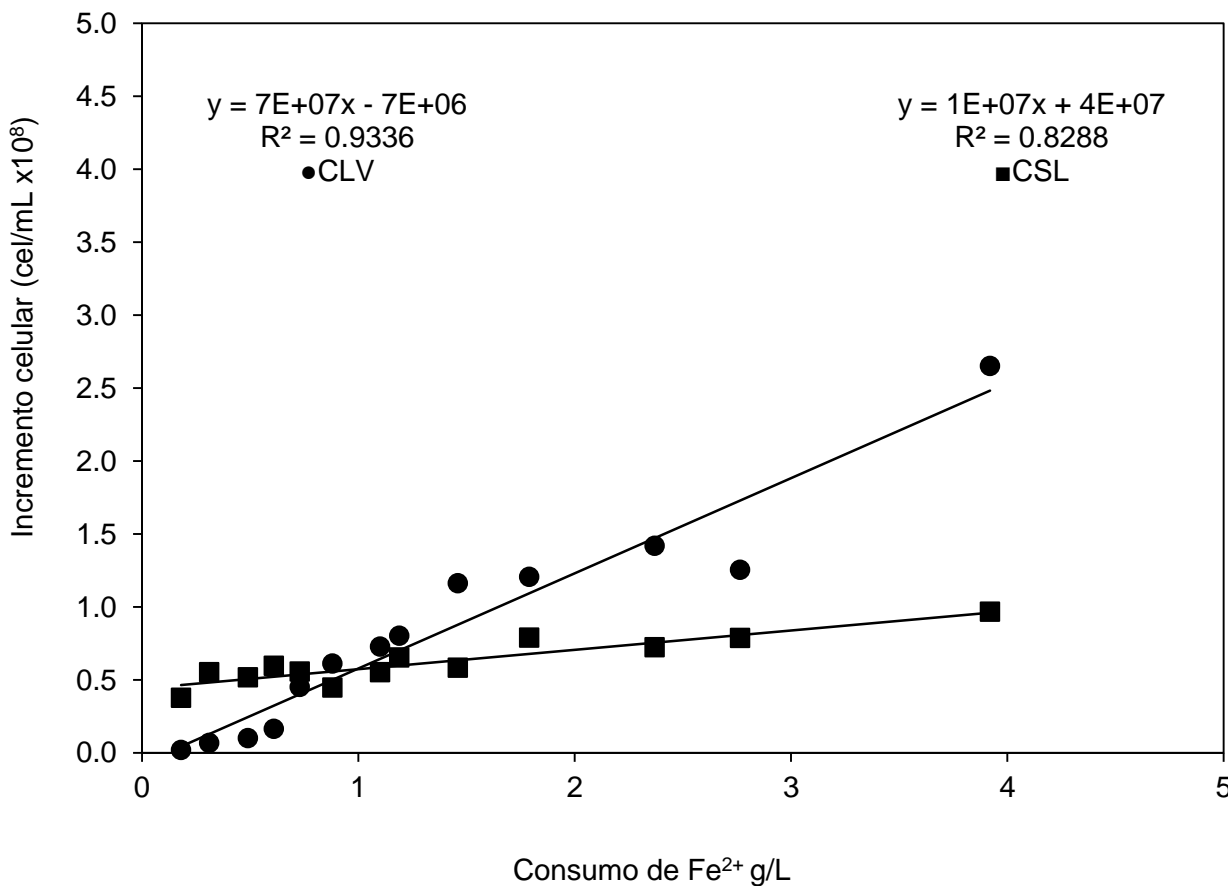


Figura 15. Rendimiento celular (Y) de células lavadas (●CLV) y de células sin lavar (■CSL) por gramo de sustrato consumido.

En la Figura 16 se muestra la correlación entre la absorbancia de las muestras con tratamiento de lavado (CLV) contra el de las células sin lavado (CSL). Para esta correlación se obtuvo una R^2 de 0.7711, indicándonos que la correlación lineal entre los valores es baja. Para las CLV el

valor máximo de absorbancia fue 0.88 esto podría ser debido al manejo de las muestras que consistió esencialmente en los lavados para eliminar los precipitados. Al aplicar la técnica de lavado se obtiene una notable disminución en los valores de densidad óptica obtenidos, considerándose estos valores más confiables ya que en estas muestras contenían una muy baja concentración de sólidos y los valores de absorbancia caen dentro del rango lineal de confiabilidad de la ley de Lambert-Beer que van de cero a uno de absorbancia. Por otro lado, observamos en esta gráfica que el valor máximo obtenido de absorbancia para las CSL es de cinco al finalizar el crecimiento del cultivo. Lo destacable de estos resultados es que para las CSL se tuvo que realizar una serie de diluciones para que estas pudieran ser medidas por el espectrofotómetro utilizado debido al alto contenido de precipitados presentes en estas. Se debe resaltar que estas muestras de acuerdo a la diferencia de absorbancia contenían 5.6 veces más cantidad de sólidos que las células lavadas. Esta diferencia tan notable en el contenido de sólidos que presentaron las muestras sin lavar es debido a que el cultivo va incrementando la cantidad de precipitados durante el crecimiento por medio de la oxidación del ion ferroso (Fe^{2+}) a ion férrico (Fe^{3+}) presentándose este último en forma insoluble.

El EDTA y el NaCl juegan un papel fundamental en la limpieza de la muestra ya que el EDTA por una parte es un secuestrante de metales lo que ayuda a separarlos de las bacterias y por otro lado el NaCl contribuye aportando una fuerza iónica que hace que las bacterias no se puedan adherir a las jarositas ya que estas se llegan a adherirse debido a las fuerzas electrostáticas que se encuentran en el exterior de la bacteria. Zhao-hui y col. (2012) mostraron en un estudio de adsorción de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en calcopirita que esta bacteria presentó una mayor adsorción a bajas concentraciones de NaCl y en cambio esta disminuyó al incrementar la fuerza iónica de 0.02 a 0.08 moles/L. En el caso de este estudio el NaCl estuvo a una concentración de 0.6% correspondiente a una concentración de 0.1 moles/L ó molar (M) y el pH fue de 8, por lo que tiene una fuerza iónica mucho mayor evitando así la unión de las bacterias a los sólidos que se forman en el medio de cultivo (Wang y col., 2012).

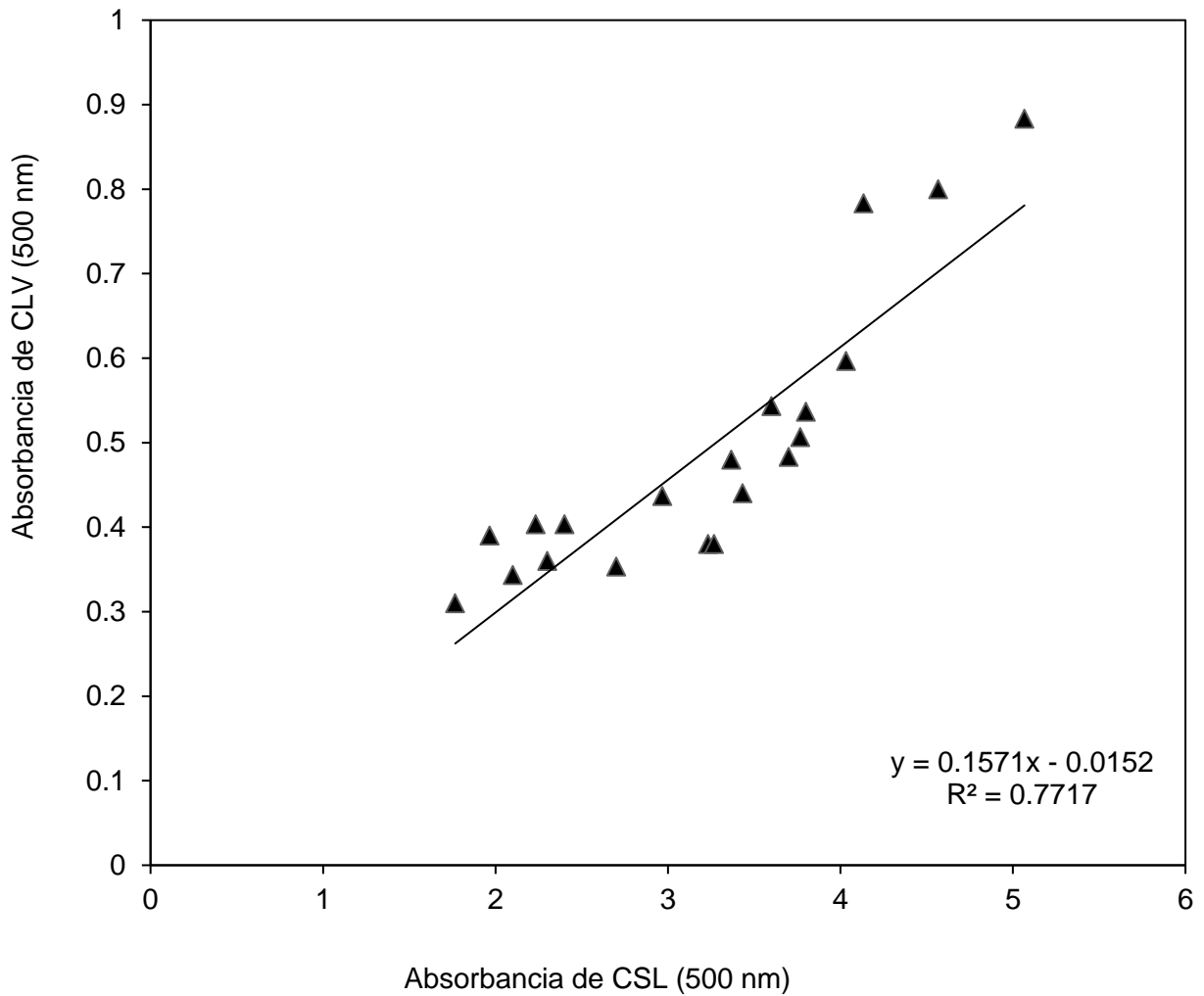


Figura 16. Correlación de absorbancia de CLV contra CSL

Concentración Celular

Basado en los resultados obtenidos se realizó una correlación entre el logaritmo de la concentración de CLV y las CSL (Figura 17). Se obtuvo una correlación lineal con una R^2 de 0.7833. Se observó que las CSL presentaron valores menores en el conteo en comparación con las CLV, la pendiente de 2.21 indica que existe una discrepancia promedio en el conteo celular de las CSL contra las CLV del mismo orden de magnitud.

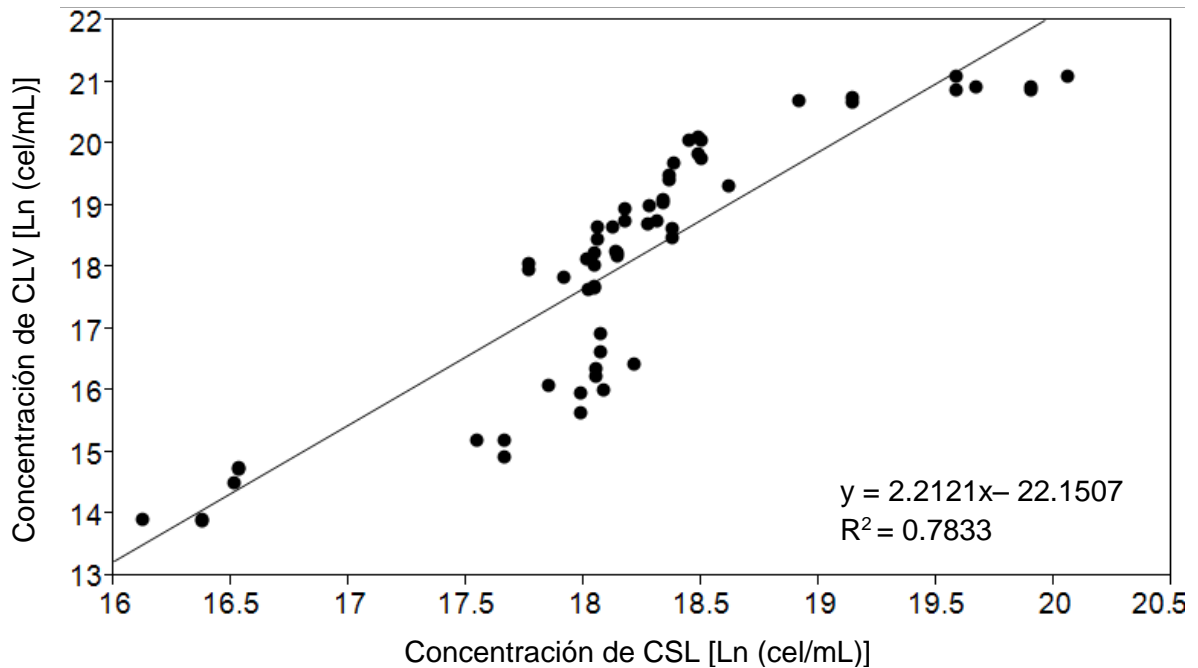


Figura 17. Correlación de la concentración celular de CLV y CSL.

En el caso del conteo de células/mL el valor máximo en las CLV fue de 1.27×10^9 células/mL, con una cuenta inicial de 1.07×10^6 células/mL. Por otro lado, en las CSL se obtuvo un valor máximo de 3.27×10^8 células/mL, con una concentración inicial de 1.13×10^7 células/mL pudiéndose observar que el tratamiento de lavado mejoró la evaluación de este parámetro siendo 3.88 veces mayor para las CLV en comparación a los valores obtenidos de las CSL (Figura 18). El ajuste del modelo exponencial para las CLV presentó una alta correlación con una $R^2 = 0.9695$ indicando una mayor correspondencia con respecto a las CSL con una $R^2 = 0.8023$. En las células lavadas se contabilizó un mayor número de células esto se podría fundamentar a que la solución de lavado compuesta por EDTA y NaCl le confiere una fuerza iónica de 0.1 M debilitando la atracción de las cargas electrostáticas que tienen las bacterias en su superficie impidiendo que las bacterias se adhieran a los sólidos que se forman en el medio de cultivo (Zhao-hui y col. 2012). Por otra parte, estos mismos autores mostraron que las bacterias presentan un efecto de hidrofobicidad a pH bajo con valores menores a 3.8, presentando una óptima adsorción, lo que explica su atracción hacia los sólidos que se forman en el medio de cultivo y no hacia la solución acuosa ya que el medio de cultivo utilizado (9K) en esta investigación fue ajustado a un pH de 2.0. Además, a estos valores de pH bajos se potencian las cargas positivas de los sólidos y las cargas negativas en la superficie de la

bacteria formadas por sitios de grupos carboxilos R-COOH que le confieren hidrofobicidad a las bacterias. Por lo tanto, la solución de lavado utilizada con un valor de pH de 8.0 y con la fuerza iónica que presenta (0.1 M) rompe el equilibrio creando condiciones desfavorables para la adsorción de las bacterias hacia los sólidos (Wang y col., 2012).

El fenómeno de adherencia de las bacterias hacia los minerales es una condición necesaria para que las bacterias puedan obtener la energía para su crecimiento a partir de estos como es el caso donde se ha reportado que las bacterias hierro oxidantes como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum* se adhieren a la pirita y calcosita en las primeras etapas de la biolixiviación, dicho fenómeno es una condición muy importante para que pueda ocurrir dicho proceso como por ejemplo la biolixiviación del mineral que contiene cobre (Echeverría-Vega y Demergasso, 2015).

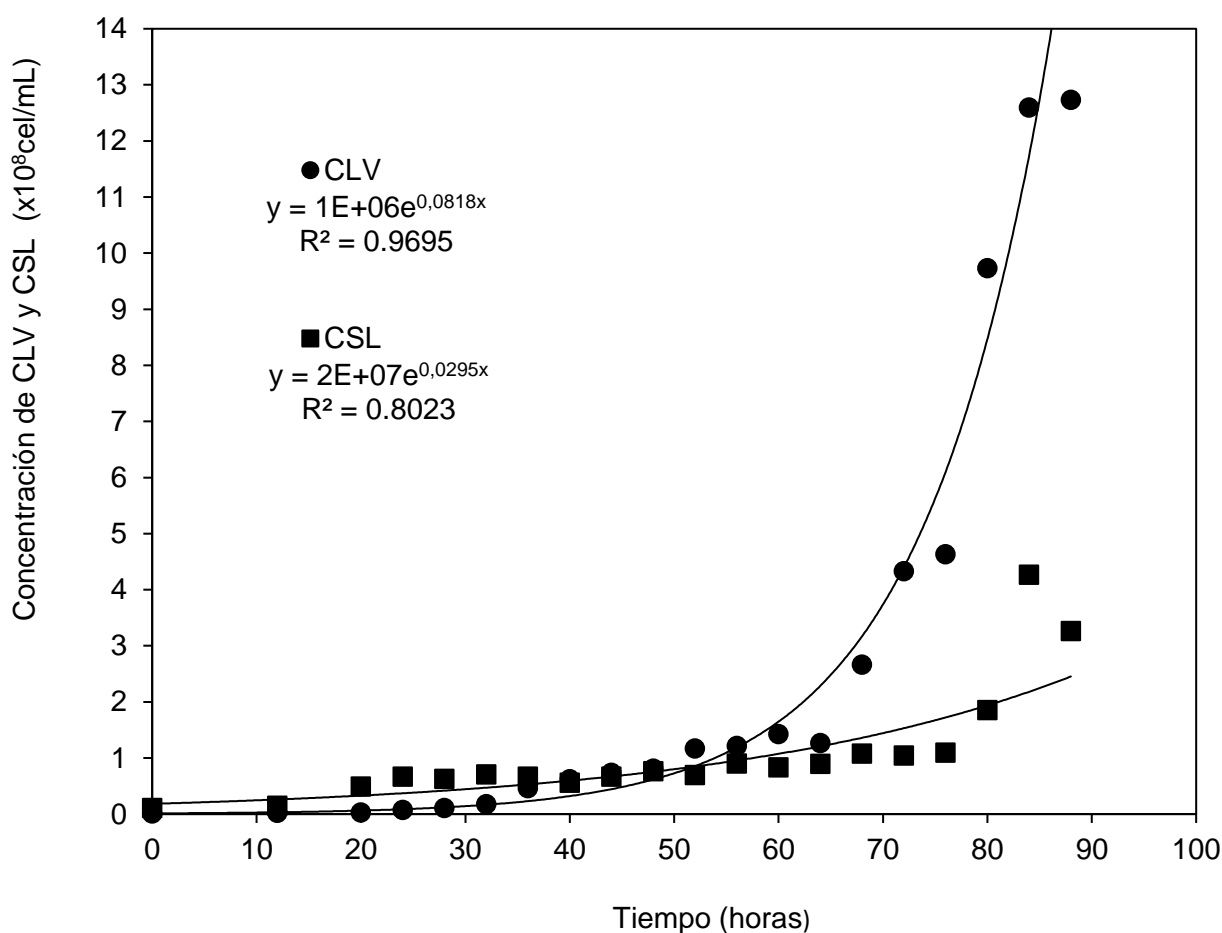


Figura 18. Comparación de conteo de CLV contra CSL

Análisis de Concentración Celular Contra Absorbancia

A partir de los resultados obtenidos de las lecturas de absorbancia y de los conteos de las células en las muestras se realizó una evaluación de estos datos para las CLV y CSL (Figura 19). Se obtuvo un mayor coeficiente de correlación lineal en la CLV con una R^2 de 0.8953 en comparación con los resultados obtenidos para las CSL en los cuales se obtuvo una R^2 de 0.7438, hay que destacar que para estas muestras el mayor valor de absorbancia obtenido fue de cinco con respecto a las CLV que fue de 0.88, es decir 5.7 veces mayor el valor para las células sin lavar, sin embargo esto no nos indica que se haya tenido una mayor concentración de células como se puede apreciar en la gráfica. Los resultados obtenidos nos indican que al aplicar el tratamiento de lavado con EDTA-NaCl a las muestras disminuye los valores de absorbancia, esto es debido a que se eliminó una gran cantidad de los sólidos formados durante el crecimiento. Aparte de la eliminación de sólidos, el lavado con EDTA-NaCl a su vez permitió que hubiera un mayor desprendimiento de células de estos, obteniendo así una mayor concentración celular en las muestras a las que se les aplicó esta técnica de lavado. Barron y Lueking (1990) investigaron el crecimiento de bacterias utilizadas en biolixiviación con una concentración de 6 g de ion Fe^{2+} a $30^{\circ}C$ y 7.5% CO_2 – 92.5% aire y obtuvieron una concentración máxima de células con valor de 8×10^9 células/mL en un tiempo de 19 h, tiempo en que se encontraba en fase logarítmica de crecimiento el cultivo. Estos investigadores reportaron que bajo esas condiciones de crecimiento no observaron formación de precipitados en el medio de cultivo sólo hasta que el cultivo entró en la fase estacionaria. Cabe mencionar que la cantidad de hierro que estos investigadores utilizaron fue menor (1.33 veces menor) a las que se utilizaron en esta investigación que fue de 8 g de Fe^{2+}/L . Se podría asumir que el incremento de esta fuente de energía también influye en la formación de precipitados ya que en el caso de esta investigación si se observó la formación de estos durante la fase logarítmica, la cual tuvo un tiempo de duración de 32 h.

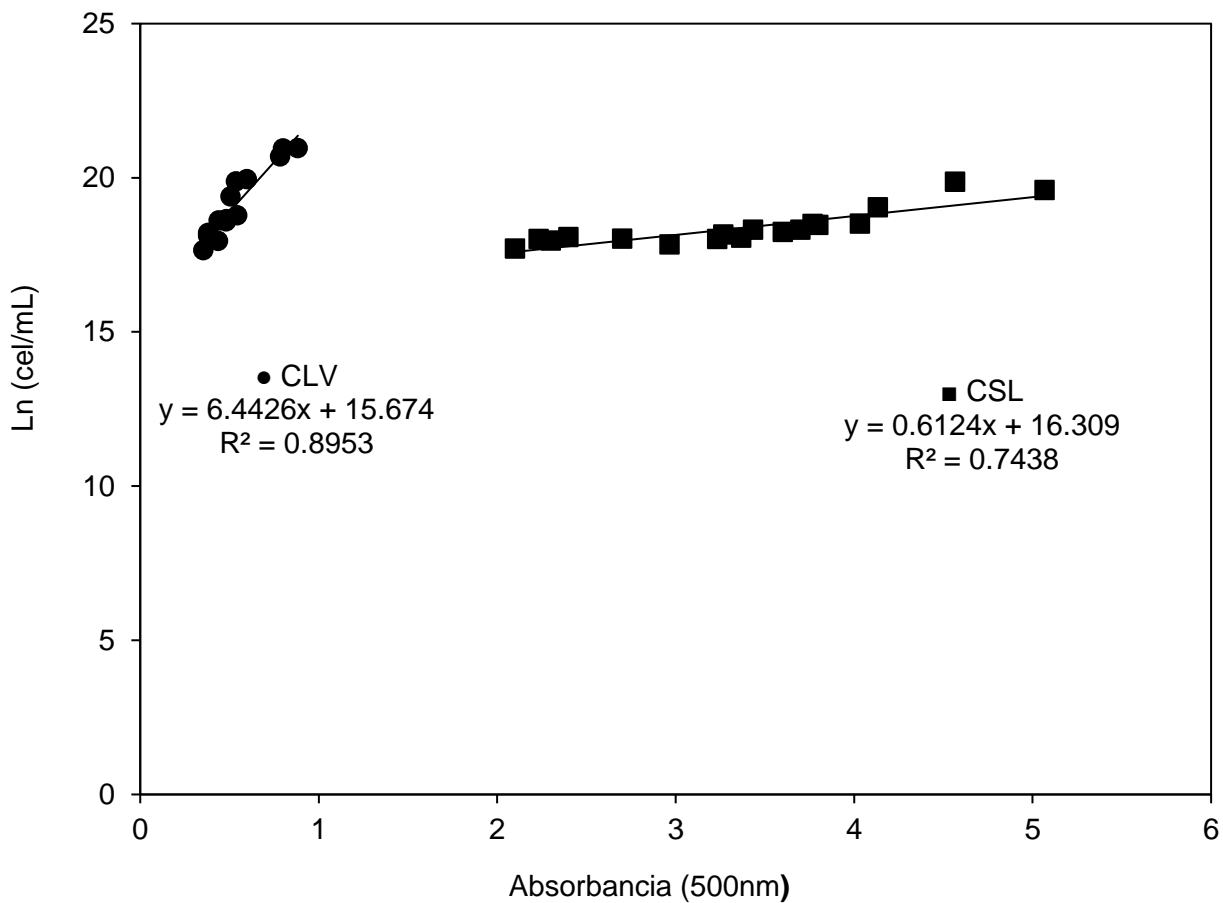


Figura 19. Correlación de la concentración celular contra densidad óptica de CLV y CSL

Estimación Teórica de la Concentración Celular

Utilizando los datos obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia, se aplicó un modelo logístico para obtener una estimación teórica de la concentración celular tanto de las CLV como de las CSL. A partir de estos resultados se realizaron correlaciones para cada uno de los tipos de muestras.

Al realizar la correlación de las CLV (Figura 20) se obtuvo una R^2 de 0.9008, indicándonos que existe una mayor correlación entre estos valores y que la concentración obtenida se acerca en un 90% a la obtenida por el modelo de predicción. Estos resultados también nos indican que existe un margen de error del 10% entre el cálculo utilizando los datos

obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia y los datos de conteo experimental para las CLV.

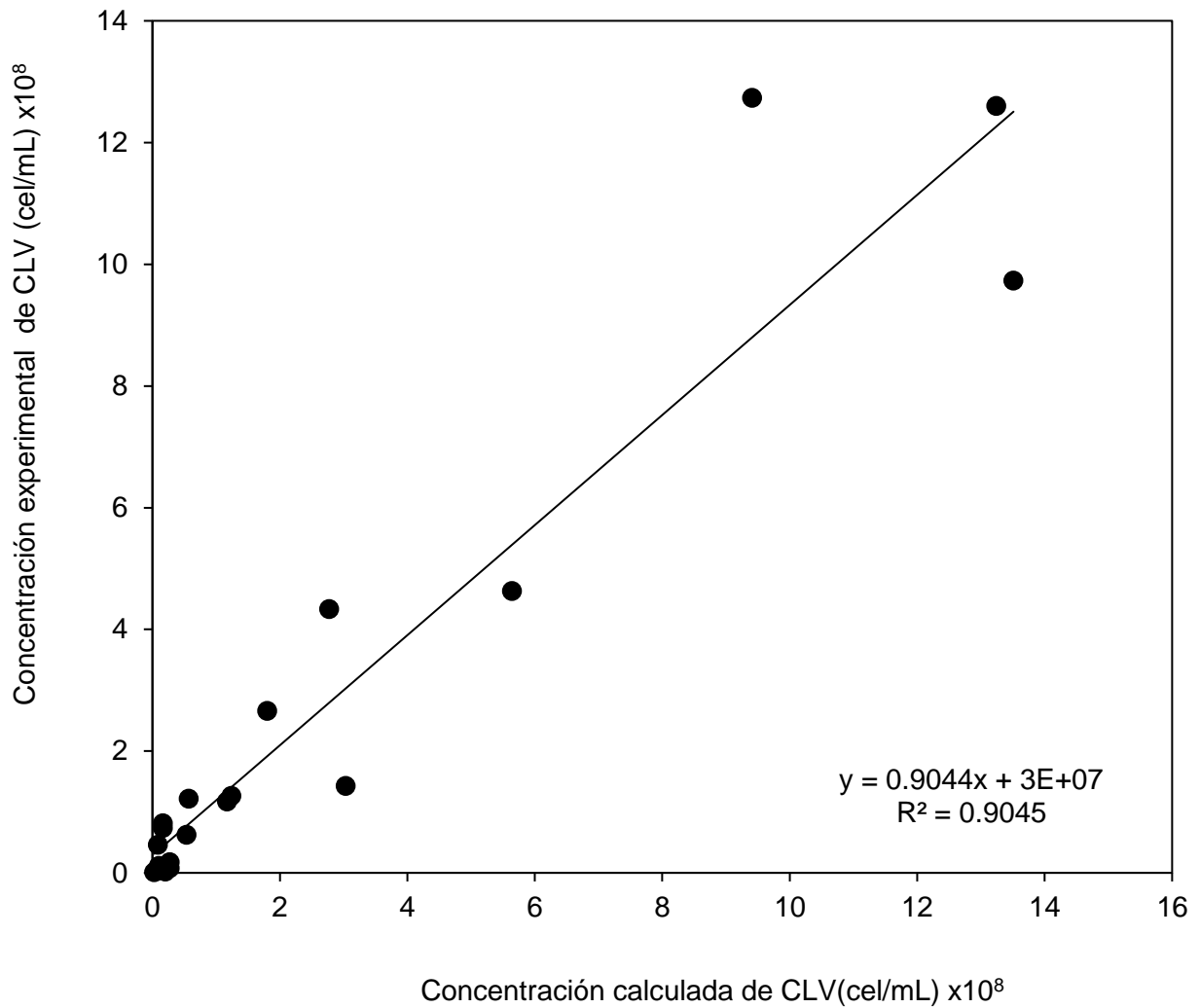


Figura 20. Correlación de concentración de CLV experimental contra concentración calculada.

En el caso de las CSL (Figura 21) se obtuvo un coeficiente de correlación menor en comparación con los datos anteriores. Al realizar la correlación de los valores se obtuvo una R^2 de 0.7554. Este resultado nos indica que la concentración celular experimental obtenida se acerca en un 70% a la obtenida a partir del modelo de predicción.

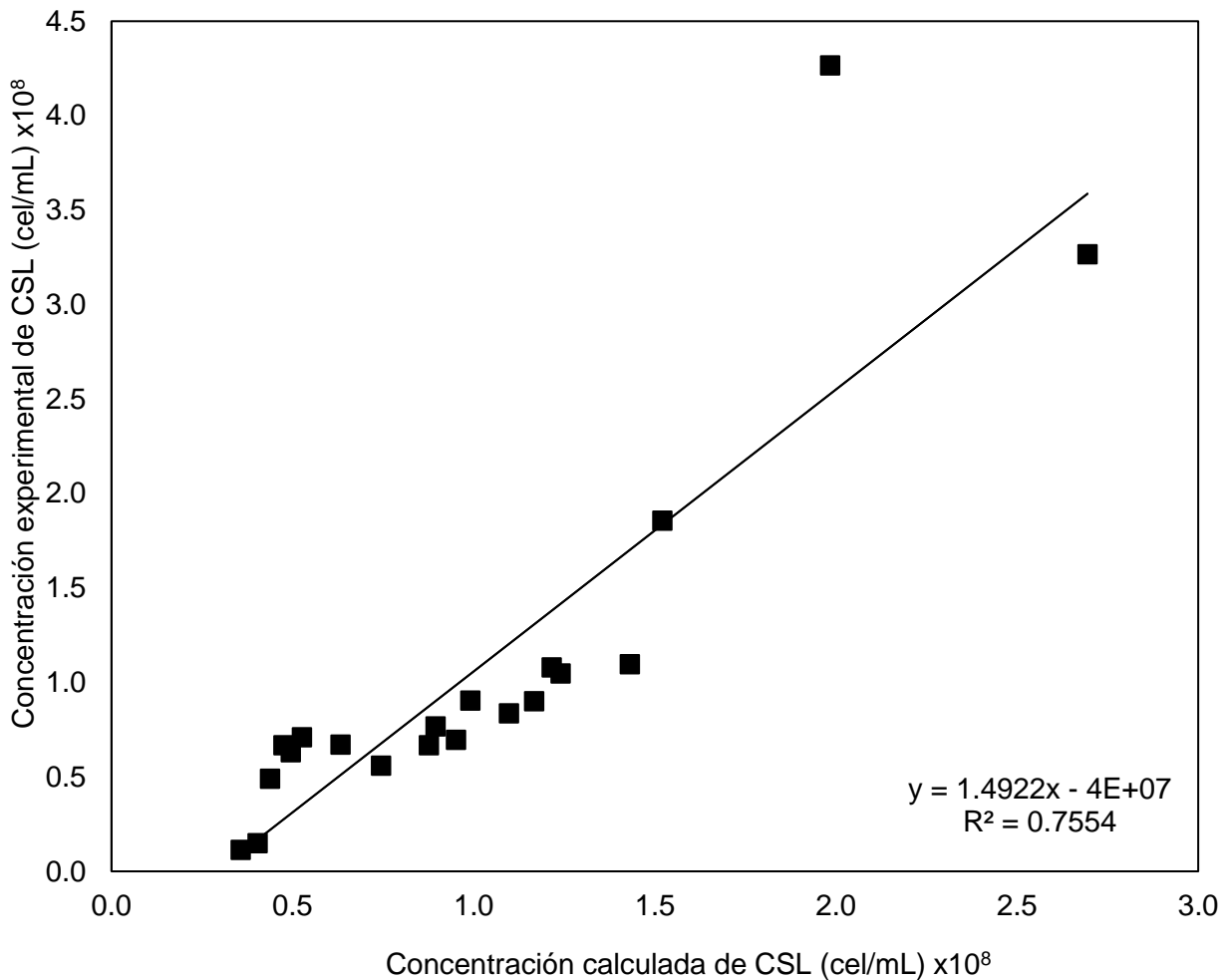


Figura 21. Correlación de concentración de CSL experimental contra concentración calculada.

Determinación de Proteína

Se realizó un análisis de cuantificación de proteínas a las células obtenidas de una corrida experimental a diferentes tiempos de crecimiento a partir de una variación del método de Peterson (1977) en conjunto con el método de Bradford (1976). Dicho análisis fue realizado tanto a las CLV como a las CSL.

A partir de los datos obtenidos del análisis de proteínas se realizó una correlación entre la concentración celular contra la concentración de proteína de CLV y las CSL (Figura 22 y 23). Para las CLV se obtuvo una correlación lineal, obteniendo una $R^2 = 0.7144$. Estos valores indican que existe una cantidad de proteínas muy baja en cada bacteria, lo cual significa que se

necesita una concentración muy elevada de microorganismos en un cultivo para poder realizar este análisis. A pesar de estos resultados las CLV presentaron valores de proteína seis veces mayores con respecto a las CSL, indicándonos que este parámetro también fue mejorado con el tratamiento de lavado de las células. Cabe destacar que este tipo de cultivos presentan un bajo rendimiento dada su naturaleza por ser quimioautótrofos ya que el medio de cultivo 9K en el que creció está compuesto a base de sales minerales en comparación con cultivos heterótrofos que crecen en medios complejos presentan un mayor rendimiento celular.

Juárez Alcaraz, (2004) en un estudio de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* utilizando sulfato ferroso como fuente de energía obtuvo una concentración de células de 1×10^6 células/ml en un tiempo de 28 días y una concentración de proteínas de 9 μg de proteína/mL utilizando el método de Bradford. Por otro lado, en el presente estudio se obtuvo una concentración de proteína de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando la técnica de lavado de células lo que es 2.7 veces mayor en comparación con lo reportado por Juárez Alcaraz, (2004). El tiempo de crecimiento para el cultivo experimental presentado en este trabajo fue de 88 h (3.6 días) y se obtuvo una concentración celular de 1.27×10^9 células/mL. Solo se pudo encontrar este reporte con el que se comparan los resultados de esta investigación para el caso de la concentración de proteína.

Se realizó también la determinación de proteína por el mismo método a un cultivo de *E. coli* con el fin de comparar resultados con muestras que no presentaran los interferentes que existen en el cultivo mixto estudiado en este trabajo (datos gráficos no mostrados). El cultivo utilizado tuvo un tiempo de crecimiento de seis horas, una concentración inicial de 3.95×10^5 células/mL, una concentración final de 1.82×10^6 células/mL y una concentración final de proteínas de 11.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizó de igual manera una correlación entre la concentración de células contra la concentración de proteínas obteniendo una R^2 de 0.9663, indicándonos esto que existe una alta correlación lineal entre estos datos. Esto también nos permitió demostrar cómo se ven afectados los resultados para la determinación de proteínas por los interferentes presentes en las muestras.

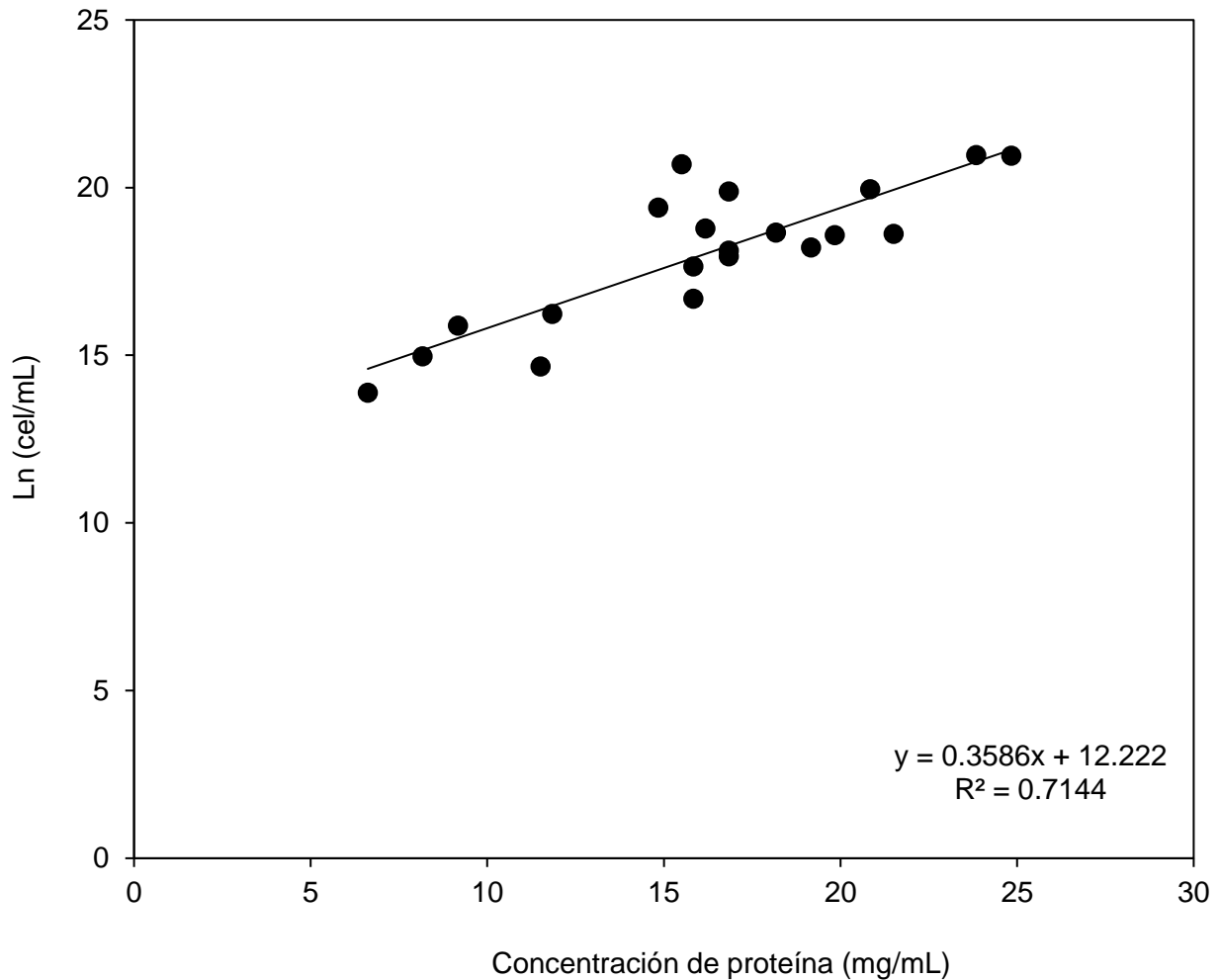


Figura 22. Correlación de la concentración celular contra concentración de proteína de CLV.

En cuanto a los resultados obtenidos para las CSL se observó una incorrelación (con un valor de pendiente de -0.0659) en el análisis de proteína respecto a la concentración celular de las CSL de la cual se obtuvo una $R^2 = 0.2533$. Estos valores pueden ser consecuencia de la gran cantidad de sólidos presentes en las CSL, demostrándonos también que estos representan un interferente para la estimación de proteínas en estas muestras ya que en los sólidos están presentes metales de hierro.

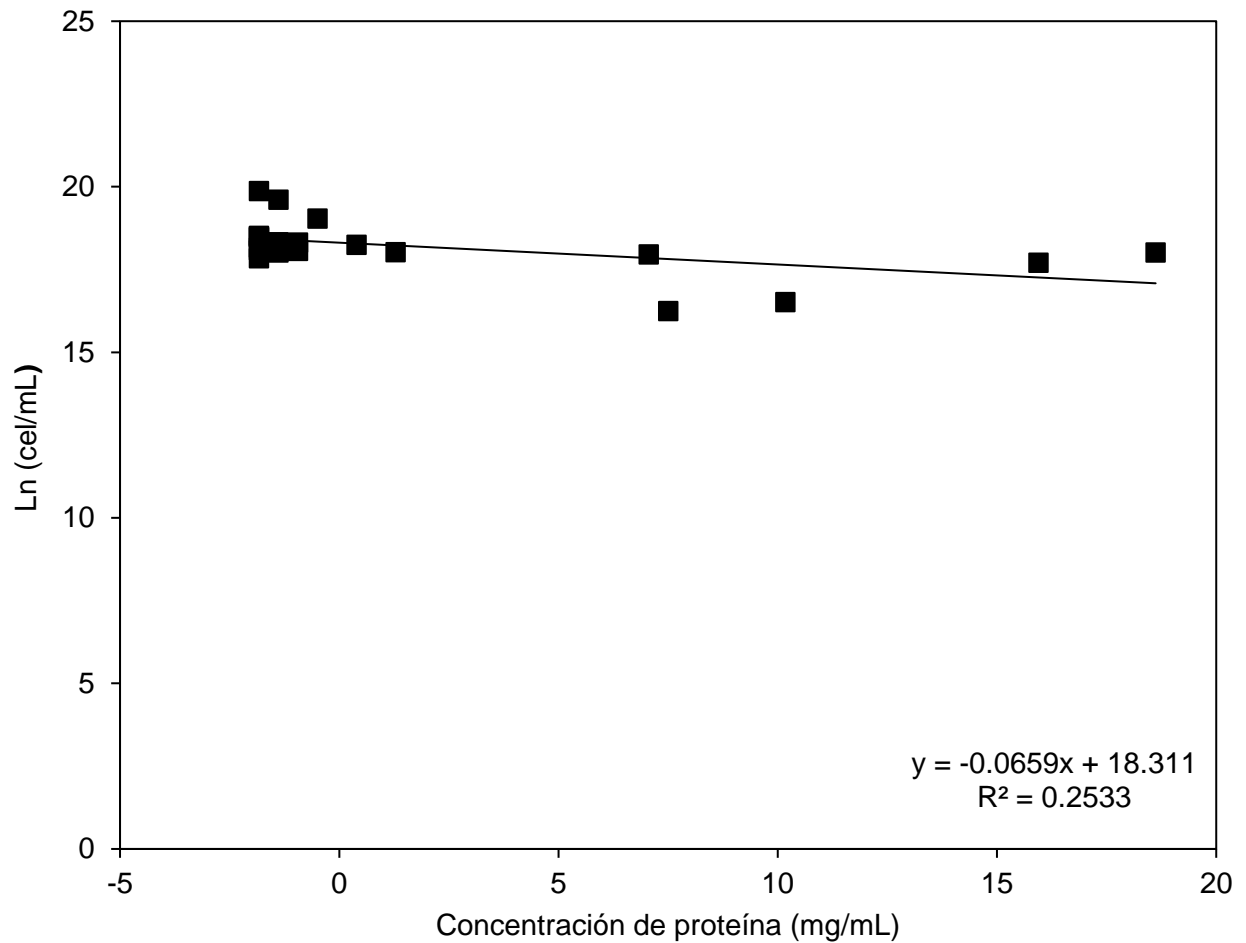


Figura 23. Correlación de la concentración celular contra concentración de proteína de CSL.

Cinética de Crecimiento

En los experimentos de propagación del cultivo se observó un cambio en la coloración y un aumento en la turbidez debido a la acción oxidativa de la bacteria sobre el ion Fe^{2+} . En la Figura 24 se observa el comportamiento que presenta el cultivo a medida que transcurre el tiempo y las diferentes muestras obtenidas durante el tiempo de crecimiento.

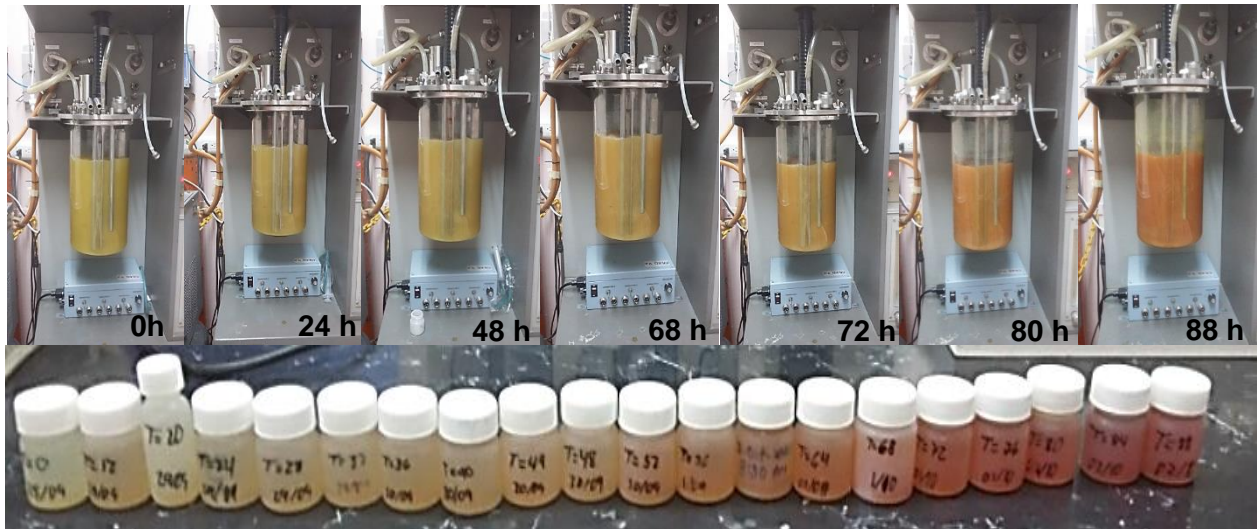


Figura 24. Seguimiento del crecimiento celular y consumo de sustrato.

Los resultados mostraron que el crecimiento de las células está directamente relacionado con un consumo de sustrato constante (ion Fe^{2+}) el cual es utilizado como su principal fuente de energía (Figura 25, 26). La Figura 24 muestra la cinética de crecimiento celular de las CLV y la Figura 25 para CSL. En ambas gráficas se muestra el consumo de sustrato, el conteo celular, así como el ajuste de los modelos matemáticos con sus parámetros.

En estas gráficas se puede observar cómo a medida que se va consumiendo el sustrato (Fe^{2+}) también se va incrementando el número de células dado que el ion ferroso es su fuente de energía. A su vez los datos experimentales del crecimiento celular tienen una alta correspondencia con los modelos tanto del estimado de la absorbancia de las células/mL como en la modelación del crecimiento.

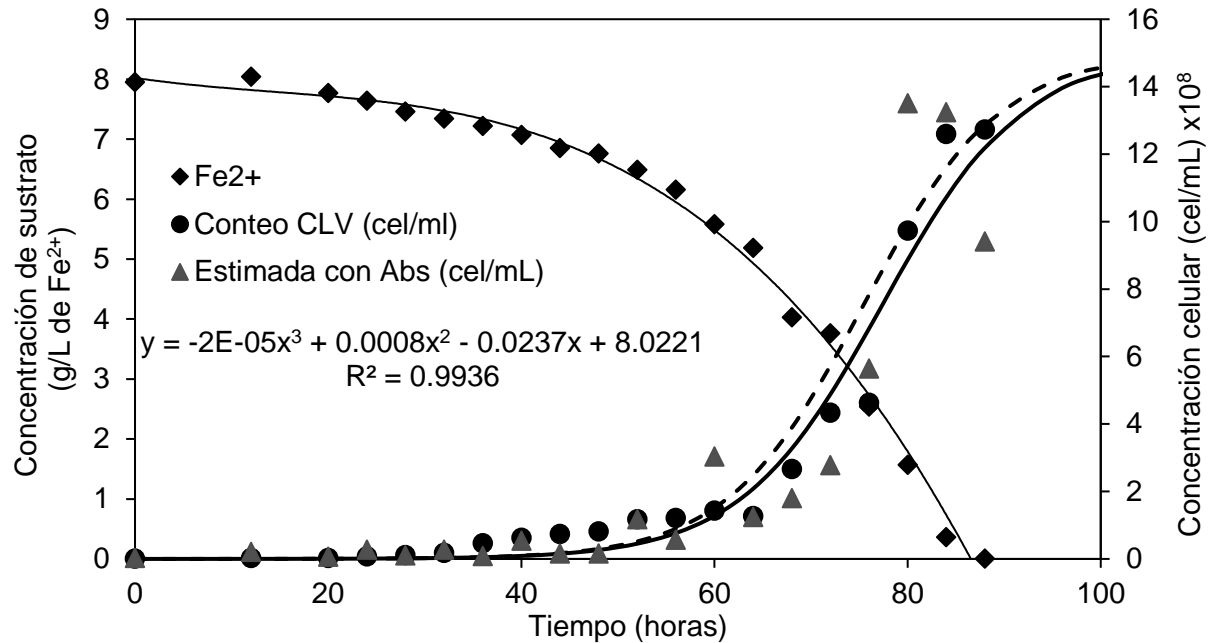


Figura 25.- Cinética de crecimiento que muestra la correlación de la concentración celular contra el consumo de sustrato y el ajuste de la modelación de estos parámetros de las células lavadas.

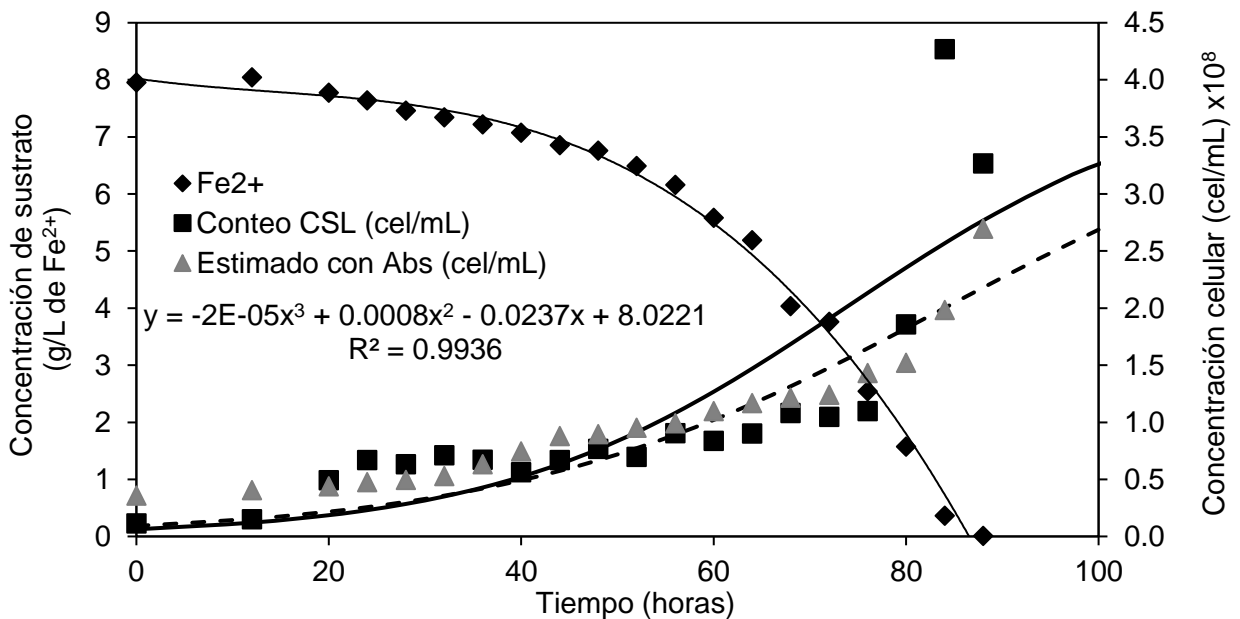


Figura 26.- Cinética de crecimiento que muestra la correlación de la concentración celular contra el consumo de sustrato y el ajuste de la modelación de estos parámetros de las células sin lavar.

Se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos a partir del modelo logístico, los cuales se muestran en la Tabla 4 para las CLV y Tabla 5 para las CSL. La Tabla 4 muestra que el tiempo de fase lag para las CLV fue de 24 h tanto para los datos experimentales como para los estimados por el modelo. Por otro lado, tenemos que para las CSL se obtuvo un tiempo de 32 h (Tabla 5), siendo este tiempo 1.3 veces mayor en comparación con las CLV.

La velocidad específica de crecimiento (μ) es un parámetro que relaciona la cantidad de biomasa con el tiempo en unidades de h^{-1} . En el análisis realizado, la velocidad específica de crecimiento que se obtuvo para las CLV fue de $0.137 h^{-1}$ para los datos experimentales y de $0.142 h^{-1}$ para los datos estimados. Por otro lado, para las CSL los valores obtenidos fueron de $0.056 h^{-1}$ para los datos experimentales y de $0.045 h^{-1}$ para los estimados. Los resultados nos muestran que la velocidad específica de crecimiento para las CLV fue 2.44 veces mayor que para las CSL.

El tiempo de doblado se define como el tiempo que tarda un cultivo en doblar la cantidad de biomasa contenida en este. El tiempo de doblado obtenido para las CLV fue de 5.05 h para los valores experimentales y de 4.87 h para los valores estimados. Para el caso de las CSL se obtuvo un tiempo de doblado de 12.31 h para los valores experimentales y de 15.51 h para los valores estimados, siendo estos valores muy altos cuando se compara con el comportamiento que presentó el cultivo (Tablas 4 y 5).

Comparando los valores obtenidos para cada tipo de muestra se obtuvo que el tiempo de doblado de las CLV fue 2.43 veces menor al de las CSL. Basado en los datos obtenidos por medio del seguimiento del crecimiento bacteriano se puede apreciar que los resultados obtenidos del tiempo de doblado para las CLV se apegan más al comportamiento real del cultivo.

En la Tabla 4 se puede observar que el tratamiento de lavado de las células mejoró los parámetros cinéticos del cultivo con respecto a los obtenidos de las CSL (Tabla 5). Esto ayudó a tener una estimación más real de los parámetros de medición del cultivo. También se indica el porcentaje de error que existe entre los valores obtenidos de las CLV en comparación con los obtenidos de manera calculada, así como también los obtenidos a partir de las CSL.

Tabla 4.- Parámetros cinéticos de crecimiento del cultivo experimental para CLV.

Células lavadas			
Parámetros cinéticos	Experimental	Estimado	% de Error
Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1})	0.137	0.142	3.64
Fase lag, t_{Lag} (h)	24	24	0
Tiempo de doblado (t_p)(h)	5.05	4.87	3.56
Productividad, Y (g cel/g sustrato)	7×10^7		

Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de cultivo experimental para CSL.

Células sin lavar				
Parámetros cinéticos	Experimental	% de Error	Estimado	% de Error
Velocidad específica de crecimiento (μ h^{-1})	0.056	59.12	0.045	67.15
Fase lag, t_{Lag} (h)	32	33.33	32	33.33
Tiempo de doblado, t_p (h)	12.31	143.76	15.51	207.12
Productividad Y (g cel/g sustrato)	1×10^7			

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que el tratamiento de lavado de células fue efectivo en la eliminación de una gran cantidad de sólidos que se forman en el cultivo durante el crecimiento facilitando el conteo de células en el microscopio.

Con el tratamiento de lavado la estimación de la concentración celular aumento significativamente (3.88 veces) y la determinación de proteína fue seis veces mayor con respecto a las células sin tratamiento de lavado.

Se demostró que es posible correlacionar la concentración celular de las CLV con la concentración de proteína contenida en el cultivo.

La comparación entre los resultados obtenidos para las CLV y las CSL nos indica que los sólidos presentes en el cultivo representan un interferente para la estimación real de los parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias ferro-oxidantes.

Se determinó que hasta las 48 horas de crecimiento no existe diferencia significativa entre el conteo celular de ambos tipos de muestra. Sin embargo después de este tiempo existe considerable diferencia en el análisis de la concentración celular.

Se obtuvieron correlaciones matemáticas que permiten determinar la concentración celular por medio del análisis de densidad óptica.

En este trabajo se estableció un método reproducible y confiable para el seguimiento del crecimiento de los cultivos mixtos de bacterias utilizados en la biolixiviación de minerales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ACEBO-GONZÁLEZ, D. Y HERNÁNDEZ-GARCÍA, A. T. 2013. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. CINEC, Ciencias Biológicas, 44.
- ACEVEDO, F. Y GENTINA, J. 2005. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras. Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile.
- ARIAS, V., ANAYA, F., QUIÑONES, J., SALAZAR, D., GIL, J. Y JAMANCA, G. 2015. Adaptación del *Thiobacillus Ferrooxidans* a sustratos conformados con especies de minerales piríticos. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, 16.
- ASOKAN, P., SAXENA, M. Y ASOLEKAR, S. R. 2006. Hazardous jarosite use in developing non-hazardous product for engineering application. Journal of hazardous materials, 137, 1589-1599.
- BARRON, J. L. Y LUEKING, D. R. 1990. Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* cells. Applied and environmental microbiology, 56, 2801-2806.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72, 248-254.
- CAMPODONICO, M. A., VAISMAN, D., CASTRO, J. F., RAZMILIC, V., MERCADO, F., ANDREWS, B. A., FEIST, A. M. Y ASENJO, J. A. 2016. *Acidithiobacillus ferrooxidans*'s comprehensive model driven analysis of the electron transfer metabolism and synthetic strain design for biomining applications. Metabolic Engineering Communications, 3, 84-96.
- CELEROMICS. 2006. Fórmula de la Cámara de Neubauer Cálculos en la Cámara de [Online]. Disponible: <http://www.celeromics.com/es/resources/Technical%20Notes/neubauer-chamber-cell-concentration/formula-camara-neubauer-concentracion.php> Consultado: 4 de abril de 2016.
- CHEN, P., YAN, L., WU, Z., XU, R., LI, S., WANG, N., LIANG, N. Y LI, H. 2015. Draft genome sequence of extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* DLC-5 isolated from acid mine drainage in Northeast China. Genomics data, 6, 267-268.
- CHOWDHURY, F. Y OJUMU, T. V. 2014. Investigation of ferrous-iron biooxidation kinetics by *Leptospirillum ferriphilum* in a novel packed-column bioreactor: Effects of temperature and jarosite accumulation. Hydrometallurgy, 141, 36-42.
- DAOUD, J. Y KARAMANEV, D. 2006. Formation of jarosite during Fe 2+ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Minerals Engineering, 19, 960-967.
- ECHEVERRÍA-VEGA, A. Y DEMERGASSO, C. 2015. Copper resistance, motility and the mineral dissolution behavior were assessed as novel factors involved in bacterial adhesion in bioleaching. Hydrometallurgy, 157, 107-115.
- GARCÍA-MOYANO, A., GONZÁLEZ-TORIL, E., MORENO-PAZ, M., PARRO, V. Y AMILS, R. 2008. Evaluation of *Leptospirillum spp.* in the Río Tinto, a model of interest to biohydrometallurgy. Hydrometallurgy, 94, 155-161.
- GENTINA, J. C. Y ACEVEDO, F. 2013. Application of bioleaching to copper mining in Chile. Electronic Journal of Biotechnology, 16, 16-16.
- HARNEIT, K., GÖKSEL, A., KOCK, D., KLOCK, J. H., GEHRKE, T. Y SAND, W. 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. Hydrometallurgy, 83, 245-254.
- JENSEN, A. B. Y WEBB, C. 1995. Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. Process biochemistry, 30, 225-236.

- JOHNSON, D. B. Y HALLBERG, K. B. 2003. The microbiology of acidic mine waters. *Research in microbiology*, 154, 466-473.
- KAKSONEN, A. H., MORRIS, C., REA, S., LI, J., USHER, K. M., MCDONALD, R. G., HILARIO, F., HOSKEN, T., JACKSON, M. Y DU PLESSIS, C. A. 2014. Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: Part II—Jarosite precipitate characterisation and acid recovery by conversion to hematite. *Hydrometallurgy*, 147, 264-272.
- KENNEDY, M. J., THAKUR, M. S., WANG, D. I. C. Y STEPHANOPOULOS, G. N. 1992. Techniques for the estimation of cell concentration in the presence of suspended solids. *Biotechnology progress*, 8, 375-381.
- KONETZKA, W. A. 1977. Microbiology of metal transformations. Pages 317–342 in ED Weinberg (ed.), *Microorganisms and minerals*. Marcel Dekker, New York.
- KREBS, W., BROMBACHER, C., BOSSHARD, P. P., BACHOFEN, R. Y BRANDL, H. 1997. Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology reviews*, 20, 605-617.
- LIU, H.-C., XIA, J.-L. Y NIE, Z.-Y. 2015. Relatedness of Cu and Fe speciation to chalcopyrite bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 156, 40-46.
- LIU, J.-Y., XIU, X.-X. Y CAI, P. 2009. Study of formation of jarosite mediated by thiobacillus ferrooxidans in 9K medium. *Procedia Earth and Planetary Science*, 1, 706-712.
- LOTFALIAN, M., RANJBAR, M., FAZAEIPOOR, M. H., SCHAFFIE, M. Y MANAFI, Z. 2015. The effect of redox control on the continuous bioleaching of chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering*, 81, 52-57.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. Y PARKER, J. 1997. *Biology of microorganism*. England: Prentice Hall.
- NAZARI, B., JORJANI, E., HANI, H., MANAFI, Z. Y RIAHI, A. 2014. Formation of jarosite and its effect on important ions for *Acidithiobacillus ferrooxidans* bacteria. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 24, 1152-1160.
- NUÑEZ, H., COVARRUBIAS, P. C., MOYA-BELTRÁN, A., ISSOTTA, F., ATAVALES, J., ACUÑA, L. G., JOHNSON, D. B. Y QUATRINI, R. 2016. Detection, identification and typing of *Acidithiobacillus* species and strains: a review. *Research in Microbiology*.
- NYAVOR, K., EGIEBOR, N. O. Y FEDORAK, P. M. 1996. The effect of ferric ion on the rate of ferrous oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 45, 688-691.
- ORIA, L. I., MARTÍNEZ, J. L. Y FRANCO, C. A. 2000. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Tecnología del agua*, 20, 45-52.
- PANIAGUA-MICHELL, J., VOLTOLINA, L. D. Y BÜCKLERAMÍREZ, L. F. 1989. *Manual de metodología y alternativas para el cultivo de microalgas*. Informe especial Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada 2da. Edición. Baja California, México.
- PELCZAR JR, M. J. Y REID, R. D. 1958. *Microbiology*. *Soil Science*, 86, 355.
- PETERSON, G. L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*, 83, 346-356.
- PIVOVAROVA, T. A., MARKOSYAN, G. E. Y KARAVAIKO, G. I. 1981. Morphogenesis and Fine Structure of *Leptospirillum ferrooxidans*. *MIKROBIOLOGIYA.*, 50, 482-487.
- PONCE, J. S., MOINIER, D., BYRNE, D., AMOURIC, A. Y BONNEFOY, V. 2012. *Acidithiobacillus ferrooxidans* oxidizes ferrous iron before sulfur likely through transcriptional regulation by the global redox responding RegBA signal transducing system. *Hydrometallurgy*, 127, 187-194.
- RAWLINGS, D. E., CORAM, N. J., GARDNER, M. N. Y DEANE, S. M. 1999. *Thiobacillus caldus* and *Leptospirillum ferrooxidans* are widely distributed in continuous flow biooxidation tanks used to treat a variety of metal containing ores and concentrates. *Process Metallurgy*, 9, 777-786.

- ROMERO CABELLO, R. R. R. C. 2007. Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial Medica Panamericana
- SAAVEDRA, A. Y CORTÓN, E. 2014. Biotecnología microbiana aplicada a la minería. *Química Viva*, 13, 148-163.
- SAND, W. Y GEHRKE, T. 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology*, 157, 49-56.
- SAND, W., GERKE, T., HALLMANN, R. Y SCHIPPERS, A. 1995. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in) direct attack mechanism—a critical evaluation of bacterial leaching. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 961-966.
- SAND, W., ROHDE, K., SOBOTKE, B. Y ZENNECK, C. 1992. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 85-92.
- SANZ, J. L. 2011. Microbiología ambiental. Taller práctico. México, DF: Universidad Autónoma Metropolitana. Citado el, 25.
- SHULER, M. L. Y KARGI, F. 2002. Bioprocess engineering, Prentice Hall New York.
- SONG, Y., WANG, M., LIANG, J. Y ZHOU, L. 2014. High-rate precipitation of iron as jarosite by using a combination process of electrolytic reduction and biological oxidation. *Hydrometallurgy*, 143, 23-27.
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R. Y CASE, C. 2004. al.(2004) Microbiology. An Introduction. Pearson & Benjamin Cummings, New York & London.
- WANG, M. Y ZHOU, L. 2012. Simultaneous oxidation and precipitation of iron using jarosite immobilized *Acidithiobacillus ferrooxidans* and its relevance to acid mine drainage. *Hydrometallurgy*, 125, 152-156.
- WANG, Z.-H., XIE, X.-H. Y LIU, J.-S. 2012. Experimental measurements of short-term adsorption of *Acidithiobacillus ferrooxidans* onto chalcopyrite. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 22, 442-446.
- XENOFONTOS, E., FEIDIOU, A., CONSTANTINO, M., CONSTANTINIDES, G. Y VYRIDES, I. 2015. Copper biomachining mechanisms using the newly isolated *Acidithiobacillus ferrooxidans* B1. *Corrosion Science*, 100, 642-650.
- ZHU, J., GAN, M., ZHANG, D., HU, Y. Y CHAI, L. 2013. The nature of Schwertmannite and Jarosite mediated by two strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* with different ferrous oxidation ability. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2679-2685.