

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES.**

**Tesis previa a la obtención del título: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE
LOS RECURSOS NATURALES.**

TEMA:

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS
NO ENTÉRICAS CON CAPACIDAD DE ADAPTACIÓN EN ALTAS
CONCENTRACIONES DE PLATA, PRESENTES EN UNA LAGUNA DE
SEDIMENTACIÓN DE LA PLANTA MINERA DEL SECTOR EL PACHE-
PORTOVELO-EL ORO.**

AUTOR:

LENIN RAMÍREZ CANDO

DIRECTOR:

PABLO COBA SANTAMARÍA

Quito, junio 2012

AUTORÍA DE LA TESIS

Los criterios emitidos en el siguiente trabajo de investigación: “**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS NO ENTÉRICAS CON CAPACIDAD DE ADAPTACIÓN EN ALTAS CONCENTRACIONES DE PLATA, PRESENTES EN UNA LAGUNA DE SEDIMENTACIÓN DE LA PLANTA MINERA DEL SECTOR EL PACHE-PORTOVELO-EL ORO.**”, así también como los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, corresponden exclusivamente a Lenin Ramírez.

Quito, 22 de junio de 2012

Sr. Lenin Ramírez

AUTOR

Bqf. Pablo Coba Santamaría MS.c

DIRECTOR

AGRADECIMIENTO

Durante todos los años que pasaron hubo muchas personas que me apoyaron y me dieron fuerzas para seguir cuando todo parecía difícil, en algún momento hasta imposible.

Entre ellos me gustaría agradecer principalmente a mi madre María Cando Pacheco, por ayudarme y apoyarme en los momentos más difíciles. A mi abuelita que en paz descansa Carme Pacheco quienes fueron pilares fundamentales en toda mi vida.

Además quisiera agradecer a la Dra. María Elena Maldonado directora de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos naturales por el apoyo durante toda mi carrera académica, así como al Bqf. Pablo Coba Santamaría quien me ayudo incansablemente en el desarrollo y escritura del presente trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
1. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Planteamiento Del Problema.....	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo general.....	5
1.4.1. Objetivos específicos.....	5
1.5. Hipótesis.....	6
1.5.1. Hipótesis.....	6
1.5.2. Hipótesis nula.....	6
1.6. Estado Del Arte.....	7
CAPÍTULO II.....	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.2. Descripción De La Zona.....	8
2.2.1. Situación geográfica.....	8
2.2.2. Clima de la zona.....	10
2.2.3. Descripción de la economía en Portovelo.....	10
2.2.4. Yacimientos mineros de la zona.....	11
2.3. La Minería.....	11
2.4. La Biominería.....	11
2.5. Extracción De Metales Y Ambiente.....	13
2.5.1 Biorremediación.....	14
2.6. Características De Las Bacterias.....	16
2.6.1. Generalidades.....	16
2.6.2. Bacterias no entéricas.....	17
2.6.2.1. Las bacterias mineras.....	17
2.6.3. Mecanismo de oxidación de metales y degradación de sulfatos.....	18
2.6.4. Aislamiento y caracterización de bacterias.....	20
2.6.4.1. Agotamiento por estrías.....	20
2.6.5. Cinética bacteriana.....	21
2.6.6. Adaptación, identificación y cinética de bacterias.....	22

2.6.6.1.	Adaptación	22
2.6.6.2.	Pruebas bioquímicas y kit API.....	23
2.6.6.3.	Perfil Bioquímico API20 NE.....	28
2.6.7.	Espectrofotometría de espectro ultravioleta y visible UV-VIS	28
2.6.7.1.	Turbidimetría.....	29
CAPÍTULO III.....		30
3.	METODOLOGÍA.....	30
3.1.	Muestreo.....	30
3.2.	Bio-estimulación, Aislamiento De Bacterias No Entéricas	31
3.3.	Análisis Fisicoquímicos De La Muestra	33
3.4.	Caracterización Bioquímica De Bacterias No Entéricas	34
3.5.	Selección De Las Cepas Bacterianas A Altas Concentraciones De Plata	35
3.6.	Evaluación De La Cinética De Crecimiento Bacteriano	35
3.7.	Conservación De Las Cepas Bacterianas	37
CAPÍTULO IV		38
4.	RESULTADOS	38
4.1.	Muestreo.....	38
4.2.	Aislamiento, Bioestimulación De La Muestra.....	38
4.3.	Análisis Fisicoquímicos De La Muestra	40
4.4.	Caracterización Bioquímica Perfil API 20 NE	40
4.5.	Adaptación, Selección Bacteriana a Altas Concentraciones de Plata.....	43
4.6.	Evaluación De La Cinética De Crecimiento Bacteriano	44
4.6.1.	Cinética de crecimiento para bacteria sin identificar BC1	46
4.6.2.	Cinética de crecimiento para <i>Pseudomona luteola morf 1</i>	47
4.6.3.	Cinética de crecimiento para <i>Stenotrophomona maltophilia</i>	48
4.6.4.	Cinética de crecimiento para <i>Ralstonia picketti</i>	50
4.6.5.	Cinética de crecimiento para <i>Pseudomona fluorencens</i>	52
4.7.	Cinética de Crecimiento Evidenciada En La Curva De Crecimiento	53

4.7.1.	Análisis de datos a 30 ppm de Ag	53
4.7.2.	Análisis de datos a 50 ppm de Ag	55
4.8.	Conservación De Las Cepas Bacterianas	¡Error! Marcador no definido.
CAPITULO V		57
4.	CONCLUSIONES, DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES.....	57
4.1.	Conclusiones	57
4.2.	Discusión y Recomendaciones	58
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	59

ÍNDICE DE GRAFICAS

Imagen 1: Mapa Político del Ecuador; ubicación de la provincia donde se realizo el muestreo	9
Imagen 2: Mapa Político de la provincia de El Oro; ubicación de Portovelo	9
Imagen 3: Descripción geopolítica de la zona de Portovelo	10
Imagen 4: Esquema propuesto al proceso de biominería	12
Imagen 5: Cambio de coloración en la caja Petri que evidencia la oxidación de Fe en el medio de cultivo bacteria BC1.	38
Imagen 6: Almacenamiento de las cepas bacterianas en el congelador a 0°C	¡Error! Marcador no definido.

Gráfico 1: Esquema teórico de muestreo en piscinas de captación de baja profundidad y que no presentan flujo.....	31
Gráfico 2: Procedimiento propuesto para el aislamiento de UFCs por agotamiento en estrías	32
Gráfico 3: Curva de calibración y ecuación de regresión lineal.	45
Gráfico 4: Curva de crecimiento de Bacteria sin identificar BC1.	46
Gráfico 5: Cuantificación de plata en el medio de cultivo de BC1	46
Gráfico 6: Curva de crecimiento de <i>Pseudomona luteola morf 1</i>	47
Gráfico 7: Cuantificación de plata en el medio de cultivo <i>Pseudomona luteola morf 1</i>	48
Gráfico 8: Cuantificación de plata en el medio de cultivo <i>Stenotrophomona maltophilia</i>	49
Gráfico 9: Cuantificación de plata en el medio de cultivo <i>Stenotrophomona maltophilia</i>	50
Gráfico 10: Cuantificación de plata en el medio de cultivo <i>Ralstonia picketti</i>	50
Gráfico 11: Cuantificación de plata en el medio de cultivo <i>Ralstonia picketti</i>	51
Gráfico 12: Cuantificación de plata en el medio de cultivo <i>Pseudomona fluorencens</i>	52
Gráfico 13: Cuantificación de plata en el medio de cultivo <i>Pseudomona fluorencens</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Codificación de las cepas aisladas, prueba de oxidación de hierro.	39
Tabla 2: Resultados de los análisis físico-químicos de la muestra.	40
Tabla 3: Porcentaje de certeza según API identificación software.	42
Tabla 4: Perfil bioquímico evaluado frente a un porcentaje de certeza en base a API identificación software.	41
Tabla 5: Morfología macroscópica y descripción de las bacterias caracterizadas.	43
Tabla 6: Resultados de la prueba de adaptación a 30, 50 ppm Ag.	44
Tabla 7: Datos de la curva de calibración en escala McFarland.	45
Tabla 8: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.	76
Tabla 9: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica.	46
Tabla 10: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.	76
Tabla 11: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica.	48
Tabla 12: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.	77
Tabla 13: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica.	49
Tabla 14: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.	78
Tabla 15: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica.	51
Tabla 16: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.	79
Tabla 17: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica.	52
Tabla 18: Resultados de la cinética bacteriana a 30 ppm de Ag.	54
Tabla 19: Resultados del contenido de plata al inicio y al final de la cinética a 30 ppm Ag.	54
Tabla 20: Resultados de la cinética bacteriana a 50 ppm de Ag.	55

RESUMEN

Aislamiento, Caracterización Y Conservación De Bacterias No Entéricas Con Capacidad De Adaptación En Altas Concentraciones De Plata, Presentes En Una Laguna De Sedimentación De La Planta Minera Del Sector El Pache – Portovelo - El Oro.

Pablo Coba S.*, Lenin Ramírez

Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

*Autor para correspondencia: pcoba@ups.edu.ec

La biotecnología ambiental y la microbiología son los campos científicos donde se desarrolló la presente investigación planteándose el aislamiento de bacterias nativas de un sector minero ubicado en El Pache cantón Portovelo en la provincia El Oro, partiendo de sedimentos, residuos del proceso de extracción de oro por flotación. Donde 25 cepas sin identificar se lograron aislar, las mismas se sometieron a un proceso de selección en agar selectivo modificado adicionado sales del metal, resultando 11 cepas capaces de oxidar el Hierro.

Otro de los objetivos del trabajo fue comprobar que estas cepas bacterianas se lograban adaptar a concentraciones altas de Plata, para ello se modificó el medio adicionando concentraciones de plata que van de 30, 50 y 100 ppm en medio de cultivo sólido, obteniendo 5 cepas capaces de adaptarse a 50 ppm de plata como umbral de referencia. Mediante el KIT API 20 NE fueron identificadas como: *Pseudomona luteola* (morfología 1), *Stenotrophomona maltophilia*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomona fluorescens* y una bacteria que el sistema API no pudo identificar a la cual se la categorizo como “BC1”.

Determinándose la curva cinética de cada una de las bacterias que lograron adaptarse a 50 ppm y se preparó un medio de cultivo modificado, adicionado con 30 ppm de Plata. Denotando tiempos generacionales (tg) atribuidos a cada especie así BC1/6.69 horas, *P. luteola* morf1./5.33 horas, *R. picketti*/5.65 horas, *S. maltophilia*/5.55 horas y *P. fluorescens*/6.18 horas.

Palabras Claves: Ecuador, bacterias, adsorción, plata.

CAPÍTULO I

1. Introducción

Los problemas causados por la minería a nivel mundial han llevado a condenar esta actividad, aunque la misma es fundamental para el desarrollo y supervivencia de la humanidad. Sin dejar de lado los efectos causados a muchas de las comunidades asentadas alrededor de los centros de explotación que se ven afectadas directa e indirectamente, no se puede olvidar que esta actividad tiene su importancia económica, política y social.

Según Hruschk (1997) los beneficios principalmente a nivel socio económico de la minería son la generación de empleo, la movilización de recursos, la construcción de obras anexas y la reducción de la migración rural. Además a nivel de país esta actividad mejora la balanza comercial, aunque esta actividad hasta el 2005 representaba algo menos del 1% de Producto Interno Bruto PIB.

Por otra parte los procesos químicos de extracción y purificación de la minería a gran escala son los responsables de la contaminación generada por la extracción de metales a través del proceso de cianurización como describe Ybarra (2009), lo cual, hace que sea importante desarrollar procesos para mitigar el impacto y además procesos alternativos a estos. Pero en el cantón Portovelo aún se tiene en zonas aisladas extracción artesanal usando mercurio para formar amalgamas del metal. Cadena, (2010)

Determinar que bacterias son útiles en procesos de biominería y biorremediación a través de pruebas de laboratorio capaces de diferenciarlas y determinar su cinética son los fines del presente trabajo. Esto abre una línea de investigación sobre la biotecnología ambiental, según el Ministerio de Minas y Petróleos en el Ecuador aún no se tiene datos reales sobre la biorremediación en empresas mineras y se desconoce de proyectos sobre biominería.

1.1. Antecedentes

“Un estudio del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo ratificó la contaminación permanente que soportan habitantes de los cantones orenses de Zaruma y Portovelo como consecuencia de la extracción de metales pesados y cianuro y del proceso de refinación del oro. Sus efectos también se sienten en otras poblaciones ubicadas a lo largo del río Puyango”. (Diario Hoy, 2010)

Además Yépez y Barreno (1989) en su publicación aseguran que en las poblaciones de Zaruma, Portovelo y parroquias rurales aledañas, los niveles de mercurio en la sangre aumento, la presencia de cianuro se evidenció en la muerte de las especies nativas del río el Pache perteneciente al sistema fluvial del río Puyango que también presenta deterioro en la calidad de sus aguas. Por lo cual las zonas agrícolas del sector se ven altamente afectadas en la calidad y cantidad de los productos.

Las técnicas aplicadas en la actualidad presumen la pérdida de minerales, particularmente oro, plata y mercurio consecuencia de la explotación ineficiente, esto afecta directamente a los trabajadores y a los pobladores de Portovelo, El Pache e indirectamente a las poblaciones de la cuenca del río Puyango.

Un estudio de la explotación aurífera en Zaruma y Portovelo concluye que esta explotación no se realiza de forma adecuada, perjudicando tanto la salud de los que trabajan en ella como la explotación en sí, pues se desperdicia oro por falta de técnica, se contamina además el río, el aire y el suelo por la emisión de mercurio proveniente de la quema de materiales que contienen la amalgama. Barreno y Yépez (2008) proponen promover una campaña de educación ambiental que informe los peligros de la contaminación por mercurio; realizar un estudio integral y sistemático sobre los problemas ambientales y ecológicos que afectan al obrero minero y a las poblaciones de Zaruma y Portovelo, y fomentar la conformación de cooperativas que logren trabajar como mínimo 50 toneladas de mineral por día.

1.2. Justificación

Debido a la gran cantidad de material lixiviado que es vertido al río El Pache la cuenca del mismo se ve afectada por cantidades muy grandes de metales como, mercurio, calcio y además sulfatos resultantes del proceso de extracción de oro según . (Ly, 2009)

Los subproductos de los procesos mineros actualmente llevados a cabo en la zona aunque tecnificados no son amigables con el medio ambiente produciendo mucha contaminación descargada al río, para Barrero y Yépez (2008), los procesos mineros comunes aumentan en un 88% la cantidad de mercurio en la sangre de los pobladores de la zona, esto se puede evitar aplicando un proceso de biominería.

Según una investigación del Centro de Tecnología Mineral CETEM, en el proceso de cianurización se recupera un 80% del oro presente en el mineral, luego de un proceso de 32 horas de exposición del mineral cribado sobre cianuro y cal. Según Ly, (2010) en procesos mineros usando bacterias acidófilas se recupera hasta un 95% del metal en proceso.

Considerando que la inserción de bacterias puede afectar más el entorno ecológico de la zona. El proceso de biorremediación con bacterias oxidantes de hierro puede aliviar en gran parte la contaminación del río, mejorar la calidad de vida de la gente del cantón Portovelo.

Frente al análisis de fuentes informativas locales y los medios citados se demuestra que comunidades del sector, aledaños al río Pache, cantones de Portovelo, Zaruma así como otros asentados a lo largo de la cuenca del río Puyango han sufrido contaminación por los efectos de la minería artesanal y/o tecnificada, aumentando la concentración de mercurio que posteriormente pasara a los habitantes del sector por medio de fuentes de agua y sobre todo cultivos de la zona.

Realizar estudios prospectivos de bacterias autóctonas de la zona aptas para procesos de biorremediación y biominería se vuelve un campo provechoso y extenso de estudio, investigación e innovación en temas relacionados a la biotecnología ambiental, que promoverían y aglutinarían trabajos dentro del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad CIVABI de nuestra Universidad.

1.3. Planteamiento Del Problema

La minería en la parte alta de El Oro siempre ha llevado consecuencias graves respecto de la población aledaña, los residuos de la extracción y purificación de oro, plata y otros metales destruyen el entorno.

En el sector El Pache del cantón Portovelo este problema es incontrolable actualmente, debido a la cantidad de plantas de beneficio¹, debido a esto se planteó el presente trabajo de investigación como inicio a los esfuerzos por mitigar esta problemática desde la biorremediación de suelo. Y más importante aún la sustitución de los procesos químicos de extracción por la biohidrometalurgia.

¹ Se conoce como plantas de beneficio a las procesadoras de material pétreo para la extracción de metales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Aislar, caracterizar y conservar las bacterias no entéricas capaces de adaptarse a altas concentraciones de plata procedentes de los sedimentos de la planta de procesamiento de oro en el sector El Pache-El Oro-Ecuador.

1.4.1. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar bacterias no entéricas presentes en los sedimentos de la laguna de la planta de procesamiento minero.
- Seleccionar las bacterias que logren adaptarse a elevadas concentraciones de plata con potenciales aplicaciones en biominería y biorremediación.
- Determinar la cinética crecimiento y conservar las cepas de las bacterias seleccionadas.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis

H1: En la muestra obtenida de la laguna de sedimentación de la planta de procesamiento de oro del sector El Pache-El Oro. Existen bacterias capaces de crecer a altas concentraciones de plata.

1.5.2. Hipótesis nula

Ho1: En la muestra obtenida de la laguna de sedimentación de la planta de procesamiento de oro del sector El Pache-El Oro. No existen bacterias capaces de crecer a altas concentraciones de plata.

1.6. Estado Del Arte

Parte importante del cobre extraído desde tiempos remotos, provenía justamente de procesos de lixiviación que ocurrían en lugares con depósitos de ese metal. Por mucho tiempo se pensó que la disolución o lixiviación de metales era un proceso netamente químico, mediado por agua y oxígeno atmosférico. Recién en la década del 40 se descubrió la existencia de bacterias que revolucionaron la definición de lixiviación como un proceso catalizado biológicamente.

La biolixiviación es una tecnología que usa bacterias específicas para extraer (lixiviar) metales de los minerales. La “biohidrometalurgia” recupera el cobre eficazmente con la presencia de ciertos microorganismos. (Ballesteros y Gutiérrez, 2001)

De allí surge el término de biominería, que es el uso de microorganismos en diferentes aspectos de la explotación de los minerales, abarcando desde la concentración de las especies de interés (a través de la bio-flotación), la recuperación de los elementos presentes en ellas (bio-lixiviación y bio-oxidación), hasta su acción en tareas de remediación.

En Argentina, con el fin de mitigar el impacto ambiental que provocan las actividades mineras tradicionales, el grupo de investigación del Dr. Edgardo Donati (.....)², aboga por la puesta en marcha de la bio-minería como una alternativa más amigable con el medio ambiente.

²Dr. en Ciencias Químicas Edgardo Donati, especialista del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (Cindefi), perteneciente al CONICET, y docente en la Universidad Nacional de La Plata

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

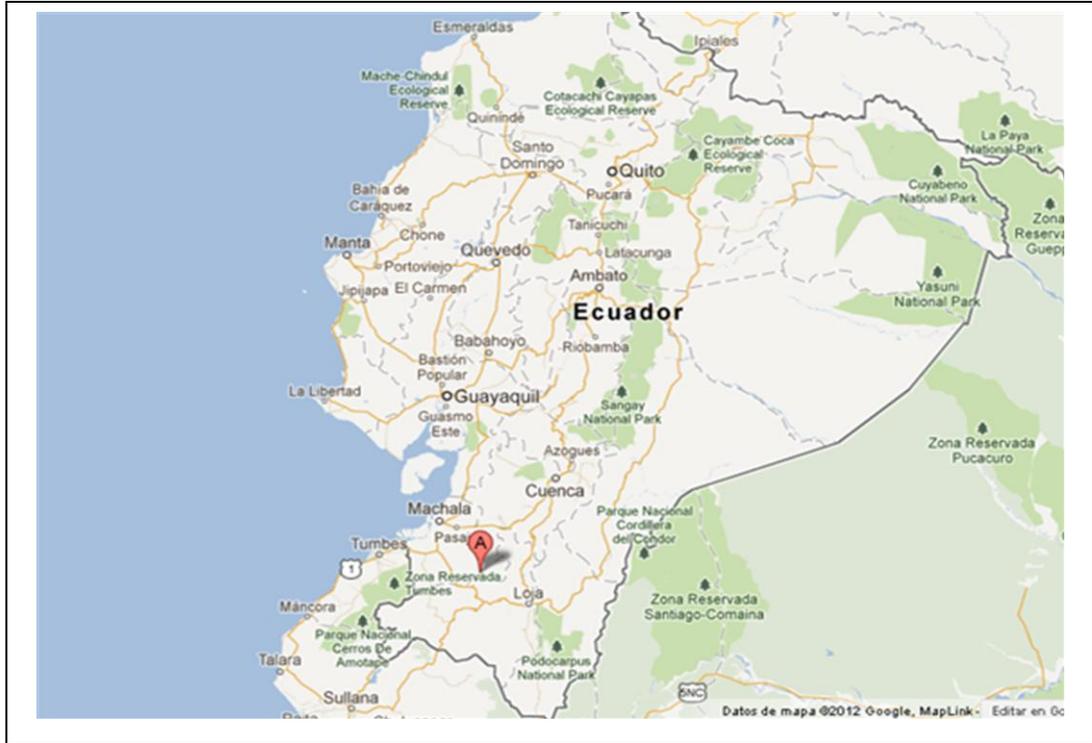
2.2. Descripción De La Zona

El presente estudio se realizó en la zona de El Pache-El Oro-Ecuador, lugar donde se encuentran las plantas mineras del cantón Portovelo, la zona tiene una precipitación total anual: 1229 mm, humedad relativa: 84 %, nubosidad: 6/8.

2.2.1. Situación geográfica

La zona sur de la provincia de El Oro es una rica región minera, enclavada en las estribaciones de la Cordillera Sur Occidental de los Andes Ecuatorianos, al pie de la cordillera de Vizcaya y bañada por el Río Amarillo, está situada al sur este de la Provincia de El Oro, a 105 Km. de su capital Machala, abarca un área de 35 Km². La altitud del cantón varía entre los 600 msnm y los 3.000 msnm. Dispuesto en las siguientes coordenadas: latitud Norte 9594200 – 9578900; longitud Este 680900 – 650500. Barreno y Yopez, (1989)

Imagen 1: Mapa Político del Ecuador; ubicación de la provincia donde se realizó el muestreo



Fuente: www.maps.google.com.ec. Donde A representa a la zona de la provincia de El Oro.

Imagen 2: Mapa Político de la provincia de El Oro; ubicación de Portovelo

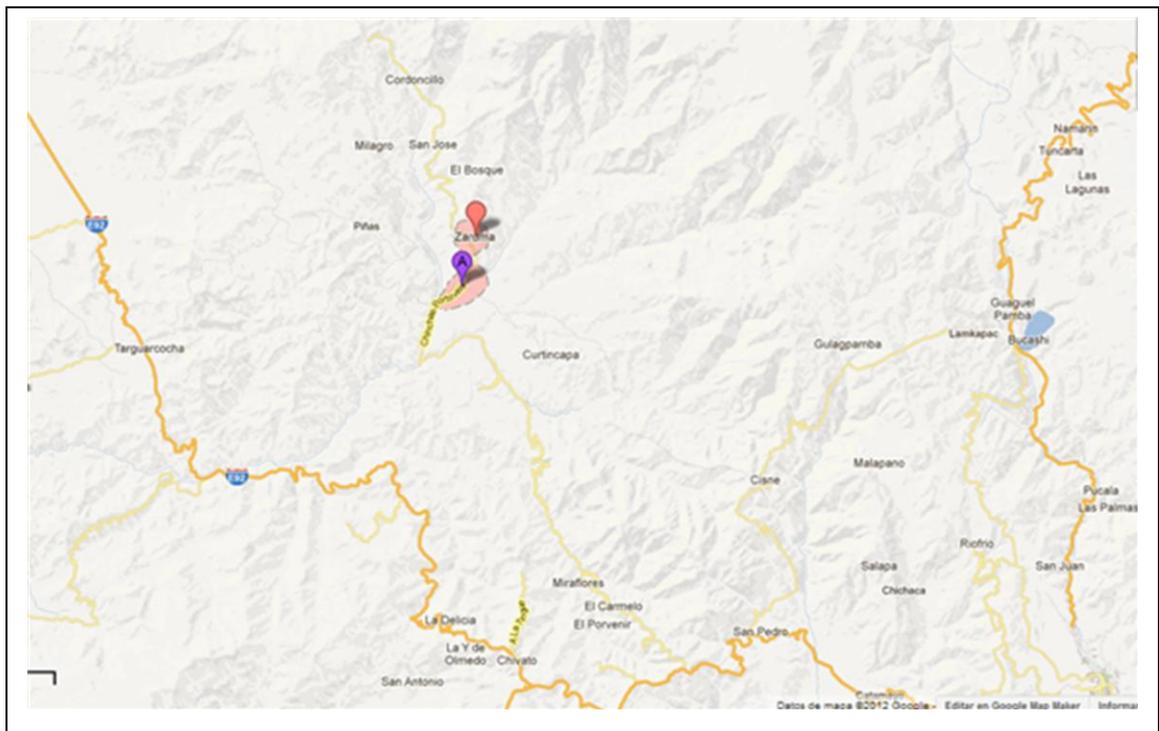


Imagen 3: Descripción geopolítica de la zona de Portovelo



Fuente: Google Earth 2012

2.2.2. Clima de la zona

La temperatura oscila entre los 18 y 28 grados centígrados, la temperatura media es de 22 grados, además de una humedad promedio de 78%. Datos proporcionado por el Ministerio de Turismo del Ecuador.

2.2.3. Descripción de la economía en Portovelo

Sus actividades económica como en la mayoría de los cantones de la parte alta de la Provincia de El Oro son agrícolas, ganaderas y auríferas, variando únicamente en su orden y no así en su importancia ya que son fuente de sus ingresos económicos; entre sus atractivos turísticos se encuentra la minería de oro. (Yépez y Barrero, 1989)

2.2.4. Yacimientos mineros de la zona

Como describe Castro, (2007) los yacimientos están formados por vetas que se extienden 15 Km abarcando los cantones Potovelo y Zaruma, las mismas se encuentran a una profundidad aproximada a 1.5 Km y su ancho puede variar desde los 60 cm hasta los 8 m tomándose como un valor promedio a 1.3 m.

Existen 3 tipos de vetas en la zona: vetas de cuarzo con pirita diseminada, vetas de cuarzo con abundante pirita y poca calcopirita y vetas de carbonato con ganga gruesa y pequeñas cantidades de calcita y calco calcita.

2.3. La Minería

Según Ybarra, (2009) los procesos mineros artesanales e industriales constan de tres fases básicas, los cuales son comunes en los tipos de minería que se llevan a cabo en la zona de Portovelo.

Extracción: En los laboríos se prepara, ya sea el frente o cielo, así como los rebajes para realizar la tronada (dinamitar) esto se realiza por medio de barrenos hechos por la perforadora (Ybarra, 2009).

Cribado y quebrado de material: Por medio del manto general se canaliza el material al área de quebradoras, donde utilizando maquinaria conocida como quebradores se reducen las piedras de gran volumen a medidas inferiores, clasificándose en las cribas. (Ybarra, 2009)

Cianuración: El material ya molido a través de impulsos constantes de rastrillo pasa a tanques mientras se añade cianuro para iniciar el proceso de beneficio de oro y plata. (Ybarra, 2009)

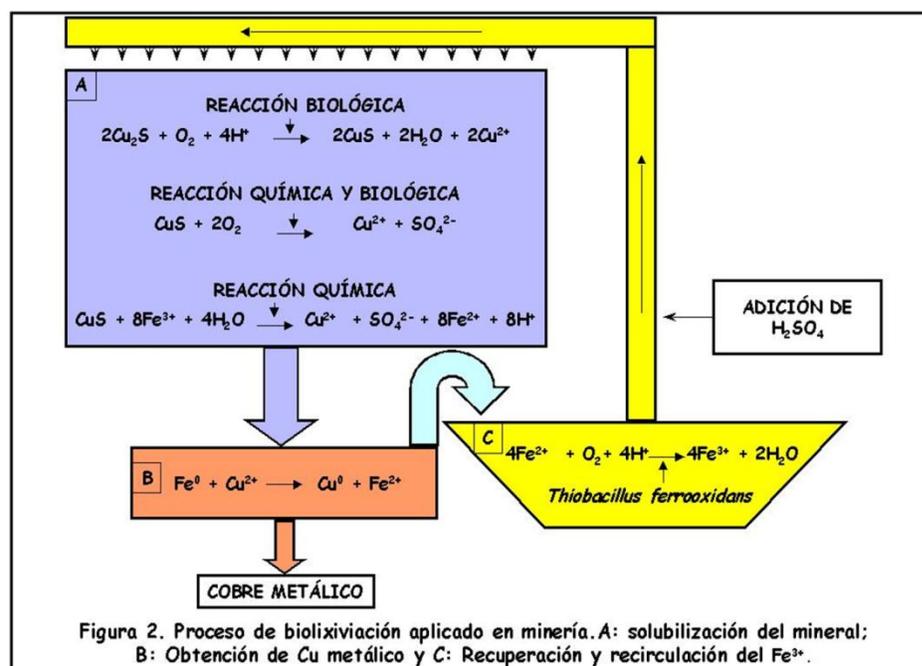
2.4. La Biominería

La bio-minería es un proceso por el cual se lixivian metales de interés económico, el proceso es mediado por la presencia de bacterias capaces de

solubilizar los minerales que contienen a estos metales. ActualmenteLy, (2009) en su artículo Perspectivas de la Bio-minería en Perú, la define como la rama de la biotecnología aplicada a la industria minero - metalúrgica para buscar la solución a diferentes problemas productivos (recuperación de metales) y ambientales (remediación). Este proceso también es conocido como Biohidrometalurgia.

La bio-lixiviación suele hacerse regando pilas con soluciones de ácido sulfúrico, bacterias existentes en los minerales liberan al metal del mineral que finalmente es recuperado a partir de las soluciones que emergen de la parte inferior de la pila. La bio-oxidación es aplicable a minerales refractarios de oro en los cuales éste se encuentra incluido dentro de una matriz mineral de sulfuros que dificulta su posterior recuperación. La acción de las bacterias elimina esta matriz liberando al oro y haciendo así más eficaz su recuperación. (Bañuelos, 1994)

Imagen 4: Esquema propuesto al proceso de biominería



Fuente: Vullo, 2003.

2.5. Extracción De Metales Y Ambiente

De acuerdo a la información del Ministerio de Energía y Minas la cantidad destinada para la actividad minera sería cinco millones de hectáreas, eso constituye el 20% del territorio nacional, de ellas dos millones de hectáreas son áreas protegidas y bosques protectores, estos bosques desempeñan papeles importantísimos no solo por su gran biodiversidad sino porque son inmensos reservorios naturales de agua, atraen la lluvia, son protectores de las cuencas hidrográficas, mantienen la calidad de los suelos, purifican el aire, fijan el CO₂, es decir son santuarios naturales irremplazables para el Ecuador.

La actividad minera en el Ecuador es incompatible con el medio ambiente porque las áreas destinadas para ello están asentadas en zonas con características sumamente frágiles por sus fuertes pendientes, la gran variedad de flora y fauna, fallas tectónicas, territorios indígenas, tierras agrícolas campesinas densamente pobladas, en zonas costeras y en lugares de importancia arqueológica y con frecuencia la suma de estas características se reúnen en una sola zona. (Castro, 2007)

El beneficio que presenta la minería se vuelve importante para la sociedad ya que mediante la minería se obtienen productos que, en su mayoría, son esenciales para la subsistencia de la humanidad. Uno de los metales cuyo uso intensivo lleva más de 4000 años es el cobre, que tiene múltiples aplicaciones, principalmente como conductor eléctrico. Sin embargo, si la extracción de metales se desarrolla sin las medidas de control adecuadas, puede tener un impacto negativo en el ambiente y en la calidad de vida de los organismos que habitan en zonas aledañas. (Ballesteros y Gutiérrez, 2001)

Se denomina metalurgia al proceso o conjunto de procesos por el cual se extrae el metal correspondiente de un mineral metálico. La extracción clásica de este tipo de minerales se realiza a través de la piro-metalurgia, proceso por el cual el mineral es tostado a altas temperaturas y posteriormente reducido al metal. Esta metodología, que resulta inviable económicamente para minerales con

bajo contenido en metal, es altamente contaminante ya que libera enormes cantidades de dióxido de azufre, uno de los gases involucrados en la llamada "lluvia ácida". (Bañuelos, 1994)

Debido a esto, la continuidad de operaciones mineras de larga data y la instalación de nuevas explotaciones, está encontrando una resistencia creciente dentro de la sociedad, aun en países cuya economía depende fuertemente de estos recursos naturales. Además, los estudios de riesgo ambiental y la aplicación de métodos preventivos y remediadores de las emisiones y residuos, suelen encarecer las operaciones hasta hacerlas inviables.

Una alternativa a la obtención de metales por piro-metalurgia, es el uso de metodologías que funcionen a bajas temperaturas y con soluciones acuosas capaces de extraer el metal de los minerales (lixiviar). Esta tecnología, llamada hidrometalurgia, es preferible desde el punto de vista de su impacto ambiental y de su rentabilidad. (Acevedo y Gentina, 2005)

Por lo visto, según Ballesteros y Gutiérrez (2001), algunas actividades mineras no son fácilmente reemplazables, se busca lograr que tengan el menor impacto ambiental posible. En este sentido, se espera que los avances científicos en biotecnología ambiental (bio-minería), permitan reducir el impacto ambiental negativo en estas operaciones mineras.

2.5.1 Biorremediación

La biorremediación consisten en el uso de microorganismos como hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana. (Gonzales, 2005)

Torres (2003) sostiene la existencia de animales que actúan como agentes descontaminantes, quienes pueden desarrollarse en medios con alta toxicidad debido a que poseen microorganismos capaces de retener metales pesados. En este campo las bacterias son las más idóneas para emplearlas en el

proceso de biorremediación, sin embargo en este conjunto se han identificado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo. La biorremediación del suelo, puede ser dividida en estrategias in situ y ex situ. In situ corresponde a la biorremediación referente a tratamientos que no requieren excavación del suelo contaminado; ex situ es un método donde se excava el suelo o el material a tratar y se le maneja en un sistema controlado como una celda de landfarming o algún tipo de biorreactor.

Las técnicas de biorremediación in situ presentan una mayor ventaja sobre las ex situ por el menor costo y la disminución de la generación de residuos a eliminar en la superficie. La biorremediación in situ es la más aplicada y utiliza microorganismos autóctonos, estos en el suelo pueden degradar un gran número de constituyentes de lodo pero su eficacia y su población son afectadas cuando algunos contaminantes tóxicos están presentes en altas concentraciones. La reintroducción de microorganismos aislados de un sitio contaminado ayuda a resolver este problema ya que los microorganismos pueden degradar los constituyentes y tiene una gran tolerancia a la toxicidad. (Viñas, 2005)

Gonzales (2005), en su libro *Biotecnología y Medio Ambiente*, indica como los métodos más empleados en bio-remediación son:

Biofiltración, el aire contaminado entra a biorreactores en los cuales la flora microbiana degrada los contaminantes volátiles en dióxido de carbono, agua y biomasa.

Bioventing, proceso de biorremediación in situ que consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección de O₂ en la zona no saturada mediante pozos de inyección; debido a la aireación se va a favorecer la degradación de los hidrocarburos por volatilización y migración de la fase más volátil del contaminante, y por biodegradación incrementando la oxigenación del suelo se va a estimular la actividad microbiana.

Biosparging es un método in situ que combina el efecto de la ventilación con la utilización de los microorganismos autóctonos para degradar compuestos orgánicos absorbidos por el suelo en la zona saturada.

Entre los factores que influyen en la aplicación de la biorremediación se destacan: hidrocarburos no halogenados con concentraciones en suelo menores a 50.000 ppm, población microbiana mayor a 1000 Unidades Formadoras de Colonias UFC por Gramo de suelo.

La atenuación natural, es una técnica de biorremediación in situ de bajo costo, su característica principal es la utilización de los procesos fisicoquímicos de interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación tienen lugar de forma natural. Estos procesos se conocen como procesos de bio-transformación natural, que van a reducir la concentración de los contaminantes (Torres, 2003).

2.6. Características De Las Bacterias

2.6.1. Generalidades

“Las bacterias son microorganismos capaces de colonizar los más diversos y extremos ecosistemas, de lo cual se evidencia una gran capacidad de adaptación al medio ambiente esto hace muy interesante a este grupo de seres vivos”. (Prescott, 2008)

Debido a la capacidad de adaptación las bacterias han desarrollado variados mecanismos de obtención de energía, complejos enzimáticos y propiedades en la pared celular, lo que puede ser usado en favor de la bio-remediación y biominería. Estos organismos unicelulares como describe Madigan (1999) tienen la capacidad de alimentarse de formas diversas, aprovechando la luz como fuente de energía (Fotosintéticos), la energía química (quimiotótrofos) y otras formas de aprovechamiento de energía.

El presente trabajo se refiere a las bacterias quimiotótrofas capaces de usar metales como aceptores de electrones los cuales participan en los procesos de respiración celular de las bacterias.

2.6.2. Bacterias no entéricas

Son bacterias que se desarrollan en ambientes muy diversos pero no en los sistemas digestivos de animales, estas tienen características muy diversas, entre las cuales las más interesantes son:

- Adaptación a medioambientes contaminados,
- Producción de biopolímeros y producción de enzimas útiles.

Torres (2003) en la publicación “el papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos”, describe la capacidad de algunas bacterias del género *Pseudomona*, *Xanthomonas*, *Ferroxidans*, *Ralstonia*, *Acidobacillus*, entre otras como agentes biorremediantes, lo que lleva a buscar nuevas bacterias o variaciones de las mencionadas anteriormente para aislarlas y conservarlas como fuente de investigación.

2.6.2.1. Las bacterias mineras

Durante el proceso de biominería, las bacterias << comen >> electrones, los cuales son extraídos de los minerales. Estos electrones forman una especie de batería dentro de la bacteria, creando una diferencia de potencial que genera energía, al igual que en una pila. Esta energía es almacenada para luego utilizarla en los distintos procesos metabólicos. Además, los microorganismos necesitan carbono que lo obtienen del aire en forma de CO₂ o de otras fuentes de Hidratos de Carbono (Acevedo y Gentina, 2005).

A este tipo de microorganismos según Ballesteros y Gutiérrez, (2001) se los llama "bacterias oxidantes" porque al obtener los electrones oxidan ciertos minerales. La utilización de bacterias permite explotar recursos minerales que

son muy difíciles y costosos de lixiviar químicamente. En cambio estos microorganismos son muy eficientes y económicos ya que crecen naturalmente en estos medios.

En 1947 se identifica la primera bacteria con capacidad de lixiviar, *Acidithiobacillus ferrooxidans* era la responsable del gran deterioro que sufrían los equipos metálicos en las instalaciones de una mina española, debido a su gran capacidad de oxidación de las aguas. Diez años más tarde se encontró la misma bacteria en drenajes ácidos de minas de carbón a cielo abierto. Estas bacterias extremófilas lixivian, es decir, disuelven las rocas o minerales y los solubilizan. Mediante una reacción de oxidación, convierten al Sulfuro de Cobre (CuS) que es sólido en Sulfato de Cobre (CuSO₄) soluble en solución acuosa, a partir de la cual se puede recuperar el cobre como metal. (Bañuelos, 1994)

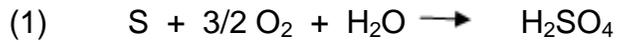
El metal se recupera utilizando electrodos en planchas de acero sobre los que, por un proceso electroquímico, se deposita el cobre precipitado. Así, se obtienen cátodos de cobre de alta pureza, listos para ser exportados. A partir de una serie de experimentos que se desarrollaron en Sudáfrica se descubrió que si se conservan estas bacterias en agua con un bajo contenido de ácido y azufre a una temperatura de unos 75 grados centígrados, en cuatro días pueden convertir el mineral de cobre en una solución de 30 Gramos de cobre puro por cada litro de agua, la cual es luego enviada a una refinería, donde se desarrollan las etapas de extracción y purificación. (Bacelar y Nicolao, 1999)

El cobre es el metal que se recupera en mayor medida por esta metodología. Chile, que comparte la cordillera y sus recursos mineros con nuestro país, es el mayor exportador mundial de cobre y obtiene aproximadamente el 5 % por bio-lixiviación. (Belliveau, 1987)

2.6.3. Mecanismo de oxidación de metales y degradación de sulfatos

Las especies correspondientes al género *Acidithiobacillus* son capaces de catalizar la oxidación de compuestos reducidos de azufre utilizando oxígeno

como aceptor electrónico y generando ácido sulfúrico como producto final, según la siguiente ecuación química:



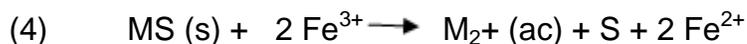
De este modo, estas bacterias pueden ser utilizadas en forma directa, para la recuperación de metales asociados a sulfuros (en la medida que los sulfatos respectivos sean solubles). Así, si M representa a un metal asociado a sulfuros, estos microorganismos catalizan la siguiente reacción:



Además, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* son capaces de catalizar la oxidación de hierro (II) también en condiciones aeróbicas:



Estas bacterias hierro-oxidantes, pueden contribuir a la disolución de los sulfuros metálicos por vía indirecta, ya que el Fe^{3+} generado en la reacción anterior, es un agente oxidante que puede atacar químicamente a los sulfuros:



Este segundo mecanismo (denominado indirecto) es especialmente interesante dado su carácter cíclico (el Fe^{2+} obtenido en (4) es nuevamente utilizado en (3). (Alpaca, 2009)

Este mecanismo ha llevado a proponer el modelo para desarrollar la bio-minería en Ecuador, se establece un desplazamiento de los metales en las piritas por la acción del hierro oxidado, el hierro ocupa el lugar del metal en el sulfato y el metal de interés (en nuestro estudio), la plata, quedaría libre para ser recogida por métodos químicos.

2.6.4. Aislamiento y caracterización de bacterias

El aislamiento se fundamenta en el agotamiento de un inóculo el cual permite separar las UFC de distintas bacterias las cuales crecen de forma independiente haciendo factible la separación de varias cepas en nuevas cajas Petri, las principales técnicas que se usan es el agotamiento por estrías y el recuento en serie de diluciones, muy a menudo en los ensayos de suele combinar estas técnicas. Las pruebas bioquímicas de identificación bacteriana se basan en las relaciones metabólicas de las bacterias probando su capacidad para asimilar y/o degradar determinados compuestos químicos, de lo cual se puede identificar géneros y hasta especies. (Prescott, 2008)

2.6.4.1. Agotamiento por estrías

A partir de un cultivo mixto, se pretende obtener un cultivo puro de bacterias, a través de la obtención de colonias aisladas. Cada colonia representa una población de microorganismos procedentes de una sola célula, a partir de la cual se posee la seguridad de obtener dicho cultivo puro de un solo tipo de microorganismo.

Para ello se utilizan diferentes técnicas de aislamiento, basadas en diluir la muestra inicial para obtener colonias aisladas. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro, se puede mantener haciendo resiembras en tubos de agar inclinado o bien congelando las células en glicerol (10-30%) a -70° C, en Nitrógeno líquido a -173° C, o mediante liofilización.

Para obtener colonias aisladas por la técnica del agotamiento la muestra se extiende sobre la superficie según se indica en la grafica ° 2, de forma que al final de dicha siembra “por agotamiento”, la cantidad de inóculo se espera sea lo suficientemente bajo como para que se depositen células aisladas y distanciadas en la superficie del agar a partir de las cuales surjan, tras incubar, colonias aisladas (Prescott, 2008).

2.6.5. Cinética bacteriana

Según Prescott, (2008) el crecimiento bacteriano es la división de una bacteria en dos células hijas en un proceso llamado fisión binaria. Previniendo que no se produzca ningún caso de mutación las células hijas resultantes serán genéticamente idénticas a la célula original. De este modo tiene lugar la "duplicación local" de la población bacteriana.

Las dos células hijas creadas tras la división no sobreviven necesariamente. Sin embargo, si el número de supervivientes supera la unidad, en promedio, la población bacteriana experimenta un crecimiento exponencial. La medición de una curva del crecimiento exponencial de las bacterias en un cultivo ha sido tradicionalmente una parte de la formación de todos los microbiólogos.

Los procesos fundamentales empleados para ello son la enumeración bacteriana (recuento celular) por métodos directos e individuales (microscopía, citometría de flujo), por métodos directos y masivos (biomasa), por métodos indirectos e individuales (conteo de colonias), o por métodos indirectos y en bloque (número más probable, turbidez, absorción de nutrientes). Los modelos permiten conciliar la teoría con las mediciones.

El tratamiento matemático del crecimiento bacteriano ha sido descrito en un sin número de publicaciones, y ha sido abordado desde varios puntos de vista, según Godia (2000) en su libro Ingeniería Bioquímica trata al crecimiento bacteriana en función de la variación del número de células y el volumen del cultivo. De lo siguiente se toma la fórmula

$$(1) N_g = 1,44 (\ln (V) + \ln (N) - \ln (N_0))$$

Donde N_g es el número de generaciones, V el volumen del cultivo, N número final de UFC y N_0 número inicial de UFC. Además el tiempo que requiere la bacteria para duplicar su número es conocido como el tiempo de generación y se describe de la siguiente forma

$$(2) Tg = \frac{\Delta t}{\ln N - \ln(N_0)} \ln (2), \text{ lo cual puede escribirse como, } Tg = \frac{\Delta t}{Ng}$$

Donde Tg es el tiempo de generación, t representa el tiempo del ensayo o del cultivo.

$$3 \ln N = \ln N_0 + ut$$

Donde u es la tasa específica de crecimiento.

El determinar el tiempo de generación de una bacteria frente a la plata es útil para identificar la capacidad de la misma para desarrollarse exitosamente.

2.6.6. Adaptación, identificación y cinética de bacterias

2.6.6.1. Adaptación

La acción de la Plata consiste en inhibir las enzimas implicadas en el proceso respiratorio de óxido-reducción celular de las bacterias, provocando su muerte en pocos minutos. Por este motivo, el microorganismo no puede desarrollar mecanismos de resistencia como ocurre con los antibióticos (García, 2006).

Algunos autores entre ellos Torres (2003) aseguran que las bacterias no entéricas logran superar este mecanismo de acción de la plata y otros metales lo que las hace interesantes en la biorremediación.

Además Sintubin (2011) en su artículo "The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action", se establece que el ion plata actúa como bactericida desde décadas atrás, además en su artículo establece que la concentración mínima inhibitoria CMI del ion plata para *Escherichia coli* y *Pseudonoma aureoginosa* es de 25 mg/l.

Evidenciando la capacidad de la plata como agente bactericida, es importante determinar si las bacterias son capaces de sobrevivir en ambientes que

contienen concentraciones mayores a la CMI, este punto es crítico en el desarrollo de tecnología para extracción biológica de este metal.

2.6.6.2. Pruebas bioquímicas y kit API

La identificación de microorganismos a través de pruebas bioquímicas ha sido utilizada durante décadas por los microbiólogos, dentro de estas existen dos grandes grupos, las que estudian la presencia de enzimas específicas y las que analizan la capacidad de asimilación de compuestos específicos por parte de las bacterias. Según Granados (2002) se describe a las reacciones de la siguiente manera:

Nitrato reductasa

La nitrataasa es la enzima que cataliza el proceso por el cual los nitratos se reducen a nitritos, la reacción que se produce es la siguiente:



La prueba consiste en la detección de los productos de reducción, comúnmente se liberan nitrito y/o nitrógeno molecular.

Degradación de triptófano

En esta prueba se analiza la capacidad para degradar triptófano y formar indol y productos indólicos, este aminoácido es degradado a través de una enzima llamada triptofanasa, dependiendo de la bacteria esta puede dar como resultado varios productos entre ellos el indol, escatol alanina, ácido indolacético entre otros.

D-glucosa

La mayoría de las bacterias de usan la glucosa como fuente de carbono, como parte importante de su metabolismo. Se determina si la bacteria usa la glucosa produciendo ácido y/o gas a partir de dicho carbohidrato. En un tubo con agua

peptonada al 1% tapado, y un tubo de Durham, se inocula la bacteria por agitación teniendo cuidado de no mover el tubo de Durham e incubándolo 24 horas y 37°C se obtienen los siguientes resultados. Si la bacteria usa la glucosa producirá ácido y/o gas, por lo tanto el agua peptonada se observará rosa, si produce gas, se observará una burbuja en el tubo de Durham

L- arginina

En esta prueba se busca observar si las bacterias son capaces de usar a L-arginina como fuente de carbono.

Ureasa

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado.

Se cultiva el microorganismo en slant en agar urea de Christensen. Este medio se complementa después del autoclavado con 50mL/L de urea. Ésta será degradada por aquellos microorganismos capaces de producir el enzima ureasa. Esta degradación produce amoníaco que hará variar el color del indicador de amarillo a rojo, poniéndose así de manifiesto la actividad ureasa.

Citrato férrico

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer con esos nutrientes.

Gelatina

Se usa para valorar la licuefacción o licuación de la gelatina por acción de las gelatinasas bacterianas producidas por algunas Enterobacterias. La reacción positiva hace que el medio permanezca líquido después de la incubación aún después de dejarse en refrigeración durante media hora. La reacción negativa permite nuevamente la solidificación.

En esta prueba se determina la producción de enzimas de carácter proteolítico en un medio nutritivo de gelatina.

PNPG

La lactosa puede ser fermentada de manera rápida (18-24 horas), en forma lenta, o puede no ser fermentada. Los microorganismos que la fermentan rápidamente poseen dos enzimas: b-galactósido permeasa, la cual está localizada en membrana celular y está involucrada en el transporte de la lactosa, y la b-D-galactosidasa, que es intracelular y está involucrada en la hidrólisis de la lactosa a galactosa y glucosa.

Los microorganismos fermentadores lentos de lactosa, son deficientes en b-galactósido permeasa pero no en b-D-galactosidasa, y los microorganismos no fermentadores no poseen ninguna de las 2 enzimas.

Asimilación de glucosa

En esta prueba se busca probar la capacidad de usar la glucosa como fuente de carbono primara y se reporta el crecimiento como prueba positiva y la ausencia de turbidez como negativo para la prueba

Asimilación de arabinosa

En esta prueba se busca probar la capacidad de usar la arabinosa que es un monosacárido como fuente de carbono primara y se reporta el crecimiento como prueba positiva y la ausencia de turbidez como negativo para la prueba

Asimilación de manosa

En esta prueba se busca probar la capacidad de usar la manosa que es un monosacárido como fuente de carbono primaria y se reporta el crecimiento como prueba positiva y la ausencia de turbidez como negativo para la prueba

Asimilación de manitol

Para estudiar la capacidad de un microorganismo de fermentar manitol se utiliza medio base, al cual se le agrega el sustrato filtrado. El medio posee además un indicador de pH como por ejemplo azul de bromotimol. En caso que el microorganismo sea capaz de fermentar el sustrato en estudio se observará viraje del indicador hacia el color ácido, para el azul de bromotimol será amarillo.

Asimilación de n-glucosamina

En esta prueba se determina la capacidad de las bacterias para usar un carbohidrato nitrogenado, en este caso la glucosamina es usada por las bacterias como única fuente de carbono y el oxígeno principal del azúcar es remplazado por el nitrógeno.

Asimilación de maltosa

La prueba permite determinar la capacidad de un microorganismo de oxidar o fermentar un determinado hidrato de carbono en este caso la D-maltosa.

La fermentación es un proceso metabólico que no requiere O_2 . Se caracteriza por la fosforilación inicial del hidrato de carbono y requiere de un compuesto orgánico como aceptor final de electrones.

Asimilación de gluconato

En esta prueba se usa el gluconato trisódico el cual es una fuente de carbono resultante de la reacción del ácido glucónico, esta reacción es muy usada para

la diferenciación de Pseudomonales, es una oxidación lo que indica que solo organismo aerobios estrictos pueden asimilar este sustrato.

Asimilación de ácido cáprico

Esta prueba permite determinar si las bacterias son quimiolitótrofos o quimioheterótrofos ya que las bacterias quimioheterotrofas son capaces de usar como fuente de carbono al ácido cáprico a través de la beta oxidación de ácidos grasos.

Asimilación de ácido adípico

En esta prueba se busca determinar si las bacterias son capaces de degradar este ácido que principalmente es uno monómero usado en la polimerización de varios productos entre ellos el poliuretano y el nylon.

Asimilación de ácido málico

La asimilación de este ácido es muy importante en las bacterias además de ser muy fácilmente asimilado, la ruta maloláctica produce energía eléctrica de donde nacen las pilas biológicas.

Asimilación de citrato

Esta prueba se basa en la capacidad de las bacterias para usar el citrato como única fuente de carbono, la degradación del citrato conlleva a la alcalización del medio.

Asimilación de ácido fenil-acético

Esta es una prueba bioquímica diseñada por BioMérieux está enfocada en la diferenciación de bacterias que pueden asimilar el ácido fenil-acético, el cual entra en el metabolismo microbiano para la formación de productos similares a las betalactamas estabilizando las mismas.

2.6.6.3. Perfil Bioquímico API20 NE

“La batería de pruebas API20 NE es un sistema de identificación rápida para bacterias no entéricas y otras bacterias Gram (-)³ no fastidiosas. Básicamente consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. Este sistema presenta las ventajas de ser rápido, eficaz y de permitir realizar numerosas pruebas a la vez. Cada tira de API 20 NE contiene 20 pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cada tubo es una prueba bioquímica distinta. La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente a la tira”. (Biomérieux, 2006)

2.6.7. Espectrofotometría de espectro ultravioleta y visible UV-VIS

“El principio de la espectroscopia ultravioleta-visible involucra la absorción de radiación ultravioleta – visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 800 nm”. (Skoog, 2005)

La luz visible o UV es absorbida por los electrones de valencia, éstos son promovidos a estados excitados (de energía mayor). Según Skoog (2005), al absorber radiación electromagnética de una frecuencia correcta, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV, como es el caso del β -caroteno.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T)

$$(4) T = I / I_0.$$

³Bacterias con reacción negativa a la tinción de membrana propuesta por Gram

Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia

$$(5) A = - \log T,$$

por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert:

$$(6) A = E * l * c$$

Coeficiente de absorptividad molar, l: camino óptico medido en cm, c: concentración de la especie absorbente en moles por litro.

2.6.7.1. Turbidimetría

La turbidimetría mide la reducción de la transmisión de luz debido a partículas de una suspensión y cuantifica la luz residual transmitida. (Skoog, 2005)

Distintas soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso seco. Esto como plantea Madigan (1999) quiere decir que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo. Sin embargo, se encuentran absorbancias muy diferentes por partícula o por UFC (Unidad Formadora de Colonia) cuando los tamaños de las células bacterianas son diferentes. Por esta razón, para estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables de una suspensión bacteriana debe realizarse una "curva de calibración" con cada tipo de microorganismo, sólo de esta forma es posible relacionar Absorbancia (Densidad Óptica) con el número de microorganismos totales o con UFC.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Muestreo

Materiales: Barreno, pala, cuchillo, balde, bolsas plásticas, marcadores, hojas para identificar, detergente, balanza.

Procedimiento

Se tomaron muestras parciales de una laguna de sedimentación de 45 m³, 1 m de profundidad, 9 m de largo y 5 m de ancho con una inclinación de 10 grados hacia el sur, lo que hacía que la zona media y la zona norte permanecieran secas.

Para la tomas de muestra se dividió a la laguna en dos zonas (ver gráfico 1), zona de sedimento seco (norte y media) y zona de sedimento acuoso (sur). Se usó el método de muestreo probabilístico aleatorio simple y se obtuvo una muestra de 1 kg.

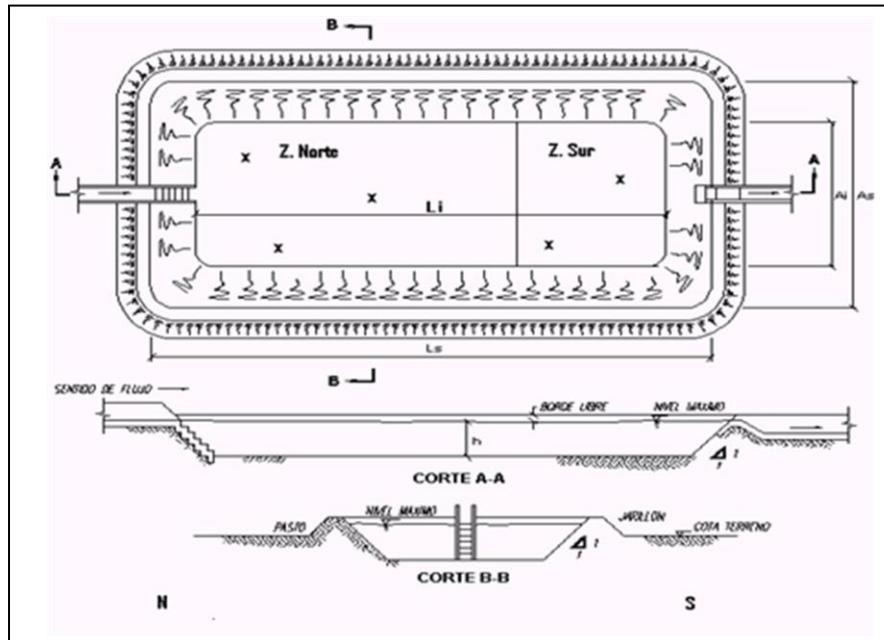
Los materiales para la recolección de muestras debieron ser lavados para eliminar cualquier contaminante.

En la zona seca, se perforó el sedimento utilizando un barreno, se recogió aproximadamente un kilogramo de muestra, muestreando en 3 puntos previamente establecidos, por duplicado.

En la zona acuosa, se recogió 1 kg de sedimento, se almacenó en un balde sellado, etiquetado y enviado al CIVABI Quito en transporte terrestre.

En el laboratorio se pesó 1 kilogramo de muestra y se colocó en una funda, etiquetándola y refrigerándola a 6 °C.

Gráfico 1: Esquema teórico de muestreo en piscinas de captación de baja profundidad y que no presentan flujo



Fuente: <http://www.cortolima.gov.com>, disponible en línea.

3.2. Bio-estimulación, aislamiento de bacterias no entéricas

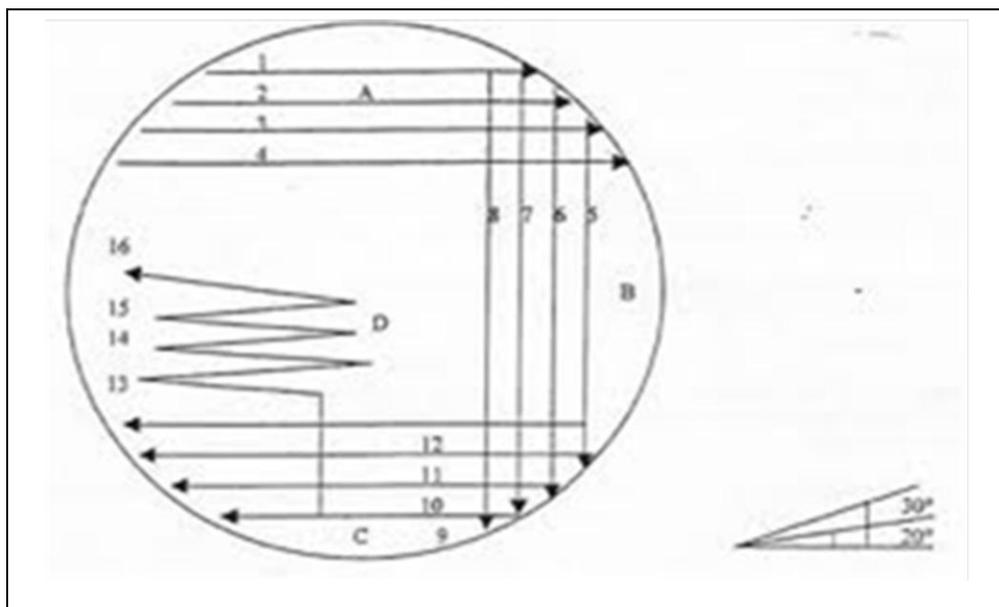
En un matraz se pesó 250 g de sedimento en el seno de la flama del mechero y se añadió 500 ml de una solución que contenía 1g de cloruro de amonio, 100 mg de sulfato ferroso en un litro de agua, se incubó a temperatura ambiente por 15 días con agitación de 10 min cada 24 horas. Posteriormente se realizó diluciones a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

Se preparó el medio de cultivo con la siguiente mezcla: 23.5 g de PCA , 1g de cloruro de amonio y 100 mg de sulfato ferroso aforándolo a 1000 mL de agua destilada estéril, luego se procedió a calentar moderadamente de 70-80°C, agitándola constantemente hasta hervor por 1 minuto. Se esterilizó a 121°C por 15 min.

Se inoculó 1 mL de cada dilución en una caja Petri, seguido se agregó el medio de cultivo a 40° C y se agito suavemente logrando homogenizar la muestra con el medio. Esto se repitió con todas las diluciones por duplicado. Cada caja Petri constaba de datos como: fecha, dilución y carácter de la muestra.

Se incubó por 48 horas a 22° C en una incubadora MEMMERT SM200. Posteriormente se revisó y se contabilizó las UFCs de cada placa. Se separó las UFC que presentaban distintas morfologías y se realizó la técnica de agotamiento por estrías, incubando bajo las mismas condiciones.

Gráfico 2: Procedimiento propuesto para el aislamiento de UFCs por agotamiento en estrías



Fuente: www.scientificainc.com, disponible en línea.

Si el resultado de crecimiento de las UFCs no ponía de manifiesto un cultivo puro se aplicó nuevamente el proceso de estría consecutiva en cajas distintas; hasta llegar a obtener una sola morfología.

Las cepas que denotaron ser un cultivo puro se las refrigeró a 4° C, empacándolas en papel aluminio, constituyendo un pequeño cepario para la continuación de la experimentación

3.3. Análisis Físicoquímicos De La Muestra

Análisis de pH

Se tomó una alícuota de 100g de muestra, se agregó 200 mL de agua destilada, se agitó por 10 min, se dejó reposar 5 min y se procedió a medir el pH.

Determinación de humedad total

Se llevó a peso constante las cápsulas sometiéndolas a 105° C durante 30 minutos en la estufa, controlando el peso en lapsos de 30 minutos, se colocó 5 g de muestra y se llevó a 105°C por 30 min. Pasado el tiempo se tomó la medida del peso nuevamente, repitiendo el proceso hasta tener un peso constante.

Determinación de la cantidad de hierro y plata.

La cantidad de hierro y plata se lo determinó usando la técnica de absorción atómica.

La curva de calibración se preparó a partir de patrones de 1000 ppm de Hierro y Plata obteniendo soluciones de 1 ppm, 5 ppm y 10 ppm.

Para digerir la muestra se tomó 1 g en 3mL de ácido nítrico sometiéndola a reflujo en un equipo de vidrio armado previamente por dos horas, se filtró y se aforó a 100 mL. De la muestra digerida, se tomó lecturas para determinar la concentración del hierro y plata.

3.4. Caracterización Bioquímica De Bacterias No Entéricas

Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo en una ampolla de API NaCl médium, tomando con un asa de 3 a 4 colonias de las placas Petri de cultivo que no supere las 48 horas de incubación. Esta suspensión se utilizó inmediatamente.

Preparación e inoculación de la galería

En la cámara de incubación se repartió aproximadamente 5 mL de agua destilada estéril, para crear una atmosfera húmeda. En un ambiente estéril se sacó la galería API 20NE. Colocando la galería sobre la cámara de incubación.

Precautelando de no formar burbujas de aire se llenó los pocillos del ensayo desde NO_3 hasta PNPG, tomando con una pipeta la suspensión bacteriana preparada previamente.

Se procedió a la apertura del medio API AUX, aquí se colocó 200 uL del inóculo y se llenó los tubos restantes de la galería tomando en cuenta no llenar de forma excesiva ya que esto podría evidenciar resultados incorrectos.

Las galerías de los ensayos, GLU, ADH y URE, fueron cubiertos con aceite mineral y se incubaron a 29°C durante 24 horas.

Lectura e interpretación de la galería

Los resultados de las galerías GLU, ADH, URE, ECS, GEL Y PNPG, se anotó como positivo, si cambio de coloración, y negativo si no

En el ensayo NO_3 se agregó los reactivos NIT1 y NIT2, si pasado 5 min existiera un cambio de color a rojo se tomó como positivo. Caso contrario se agregara 2 a 3 mg de Zinc, luego de 5 min no existiera cambio de coloración el ensayo se tomara como positivo.

Para el ensayo TRP se agregó 1 a 2 gotas de reactivo JAMES API 20NE, el cambio de color a rosa no indica una reacción positiva.

Las pruebas restante fueron revisadas y se tomó como positivo a la presencia de turbidez en la capsula. En las hojas de resultados API 20NE se obtuvo un perfil numérico, sumando los números correspondiente a los grupos de pruebas. Se ingresó los resultados de las hojas de resultados API 20NE y se obtiene el género y especie de las bacterias.

3.5. Selección De Las Cepas Bacterianas A Altas Concentraciones De Plata

Se pesó 1 Gramo de cloruro de amonio, 100 mg de sulfato ferroso y se mezcló con 23 Gramos de medio de cultivo PCA. Se aforo a 1 litro en cada matraz

Para el primer matraz se pesó 48 mg de nitrato de plata equivalente a 30 mg de plata, en el segundo matraz se colocó 80 mg de nitrato de plata equivalente a 50 mg de plata y en el tercer matraz se colocó 160 mg de nitrato de plata equivalentes a 100 mg de plata.

A continuación se inoculó las cajas con cada una de las cepas valiéndose del asa, a fin de cubrir completamente la superficie del medio de cultivo y se incubaron a 22 grados centígrados durante 48 horas, se tomaron lecturas del crecimiento cada 24 horas.

3.6. Evaluación De La Cinética De Crecimiento Bacteriano

Factores Ambientales e inculo

Se consideró como factores: la generación bacteriana, viabilidad, T° ambiental, agitación y factor independiente: concentración de plata en el medio de cultivo.

El inculo se preparó con las bacterias aisladas presentes en los sedimentos obtenidos de la laguna no obstante los ensayos se realizaron con aquellas que se lograron adaptarse a 50 ppm de plata cada una fue inoculada en el medio sintético preparado

Preparación del medio de cultivo

Se mezcló 1 g de sulfato ferroso, 4 g de extracto de levadura y 2 g de dextrosa, que se aforo a 1 litro y se pesó 24 mg de nitrato de plata equivalente a 15 mg de plata. Separadamente se pesó 41 mg de nitrato de plata equivalente a 25 mg de plata.

Se agregó 24 mg de nitrato de plata al primer matraz que contiene 500mL de medio equivalente a 30 ppm de plata.

En el segundo se mezclaron los 41 mg de nitrato de plata equivalentes a 50 ppm de plata.

En 10 tubos de ensayo cerrados se esterilizo el medio en autoclave TUTTNQUER 3870M a 121 °C durante 15 min.

Elaboración de la curva de calibración

Se preparó los estándares Mc. FARLAN del modo que se describe: el primer tubo se colocó 9,9 mL de solución de ácido sulfúrico 1% y 0,1 mL de solución de cloruro de Bario 1%. El segundo tubo contenía 9,8 mL de solución de ácido sulfúrico 1% y 0,2 mL de solución de cloruro de Bario 1%. El tercero 9,7 mL de solución de ácido sulfúrico 1% y 0,3 mL de solución de cloruro de Bario 1%. El cuarto 9,5 mL de solución de ácido sulfúrico 1% y 0,5 mL de solución de cloruro de Bario 1% y el ultimo tubo contenía 9,4 mL de solución de ácido sulfúrico 1% y 0,6 mL de solución de cloruro de Bario 1%.

Posteriormente se tomó las lecturas por triplicado de cada uno de los tubos y el blanco (agua destilada) ajustando el espectrofotómetro SHIMADZU UVMINI 1240 a 625 nm.

Con esos datos se realizó la regresión lineal para obtener la ecuación que define el crecimiento.

Determinación de la curva de crecimiento

Se inoculó los tubos, tomando las colonias con el asa homogenizándolas con la ayuda del vórtex, los mismos se incubaron a 22 °C, y se realizó la

primera medición luego de 60 min de iniciada la incubación. Para realizar la medición se tomó una alícuota del medio de cultivo previamente agitado en el vórtex., tomando las lecturas a 625 nm.

Luego se midió consecutivamente la absorbancia de cada medio de cultivo inoculado en intervalos de 60 min. Hasta llegar a la 5 hora de incubación continuando con las lecturas en intervalos de 24 horas. Hasta tener lecturas constantes de absorbancia en los medios de cultivo.

3.7. Conservación De Las Cepas Bacterianas

Se preparó una solución de glicerina al 1%, a continuación se tomó una muestra de bacterias con un asa procurando arrastrar una pequeña cantidad de medio de cultivo y se suspendió la misma en los tubos Eppendorf.

Se envolvieron los tubos con algodón, y por la parte externa con papel aluminio. Y las mismas se llevaron a 0 grados centígrados en las instalaciones del laboratorio de microbiología del CIVABI.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1. Muestreo

Se obtuvo 5 sub-muestras duplicadas, de aproximadamente 1 kg cada una, estas tenían diversas texturas desde agua turbia hasta una pasta seca de origen mineral; todas se mezclaron y homogenizaron, para obtener una muestra total de 10 kg de sedimento.

4.2. Aislamiento, Bioestimulación de la muestra

De las diluciones realizadas la dilución 10^{-3} , presentó una carga bacteriana de 37 UFC/g en la placa indicando una carga bacteriana total de $3,7 \times 10^4$ UFC/g. Los cultivos puros se aislaron en 25 cajas que fueron caracterizados macroscópicamente (Tabla °1).

Como se observa en la Tabla°1, las 25 cepas de bacterias aerobias fueron seleccionadas en un medio que contenía hierro. El cambio de coloración de verde- amarillo a un color café-rojo (Imagen°5), indicó la oxidación del hierro.

Imagen 5: Cambio de coloración en la caja Petri que evidencia la oxidación de Fe en el medio de cultivo bacteria BC1.



Fuente: Ramírez; 2011

Tabla 1: Codificación de las cepas aisladas, prueba de oxidación de hierro.

Caja	Código interno	Morfología	Prueba oxidación Hierro
1	BC1	Colonias transparentes blanquecinas amorfas, pequeñas	POSITIVO
1	BC2	Colonias rojas, forman puntos convexos.	NEGATIVO
1	BC3	Colonias blancas de forma redondeada convexas	POSITIVO
2	BC4	Colonias amarillas de forma redonda, en formación globular.	POSITIVO
1	BC5	Colonias transparentes blanquecinas amorfas	NEGATIVO
1	BC6	Colonias blancas redondas pequeñas, forman puntos.	POSITIVO
2	BC7	Colonias amorfas que forman, estructuras similares a cráteres.	NEGATIVO
1	BC8	Colonias blancas grandes, brillo	NEGATIVO
1	BC9	Colonias redondas pequeñas, blancas brillantes.	NEGATIVO
1	BC10	Colonias blancas pálidas, amorfas	POSITIVO
1	BC11	Colonias blancas pequeñas, color blanco hueso.	NEGATIVO
2	BC12	Colonias rosadas, amorfas.	NEGATIVO
2	BC13	Colonias blancas redondas pequeñas, ligeramente brillantes	POSITIVO
1	BC14	Colonias rosadas amorfas	POSITIVO
1	BC15	Colonias amarillo muy pálido, producción de residuo negro.	NEGATIVO
1	BC16	Colonias verdosas, amorfas	NEGATIVO
1	BC17	Colonias blancas brillantes, grandes, forma de óvalos	NEGATIVO
2	BC18	Colonias amarillas, brillantes redondas	NEGATIVO
1	BC19	Colonias gomosas blanquecinas, forman una sola masa	POSITIVO
1	BC20	Colonias amarillo pálido, forman puntos muy pequeños.	NEGATIVO
1	BC21	Colonias amorfas amarillentas, pequeñas	POSITIVO
2	BC22	Colonias blancas, con forma ovalada	NEGATIVO
1	BC23	Colonias amorfas blanco opaco	POSITIVO
1	BC24	Colonias blancas amorfas	POSITIVO
1	BC25	Colonias de color grisáceo sin forma definida	NEGATIVO

4.3. Análisis Físico-químicos De La Muestra

El análisis físico-químico de la muestra indica la ausencia de plata, un pH de 7,8 y una concentración de 15 ppm de hierro (Tabla°2).

Tabla 2: Resultados de los análisis físico-químicos de la muestra.

Parámetro	Método	Resultado
pH	Potenciometría	7,8
Humedad	Gravimetría	18%
Contenido de Ag	Espectrofotometría de Absorción atómica	Menor a 0,5 ppm
Contenido de Fe	Espectrofotometría de Absorción atómica	15 ppm

4.4. Caracterización Bioquímica Perfil API 20 NE

En la tabla ° 3 se muestra el perfil bioquímico de las cepas capaces de oxidar hierro. Pero se observó que una de las bacterias, BC1 no reaccionó en las pruebas bioquímicas aplicadas.

Tabla 3: Perfil bioquímico evaluado frente a un porcentaje de certeza en base a API identification software.

Prueba Bioquímica	Cepa de bacteria aislada										
	<i>Pseudomona luteola morf.1</i>	<i>Pseudomona luteola morf.2</i>	<i>Pseudomona luteola morf.3</i>	<i>Burkholderia cepacia morf. 1</i>	<i>Burkholderia cepacia morf.2</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Sphingomona paucimobilis</i>	<i>Pseudomona putida</i>	<i>Pseudomona fluorescens</i>	<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	<i>Bacteria sin idetificar</i>
Reducción de nitratos	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Triptófano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-arginina	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato férrico	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Gelatina	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Pnpg ⁴	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Asimilación glucosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Asimilación arabinosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Asimilación manosa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Asimilación manitol	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Asimilación N-glucosamina	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Asimilación maltosa	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Asimilación gluconato	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
Asimilación ac. cáprico	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
Asimilación ac. adípico	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Asimilación ac. málico	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Asimilación citrato	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Asimilación ac. fenil acético	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-

⁴ Prueba de 4-nitrofenil-D-galactopirasa.

En la tabla ° 4 se tiene el porcentaje de certeza que ofrece el KIT API 20 NE

Tabla 4: Porcentaje de certeza según API identificación software.

Bacteria	Código interno	Porcentaje de certeza (%)
<i>Pseudomona putida</i>	BC3	85
<i>Pesudomona fluorescens</i>	BC4	92
<i>Ralstonia picketti</i>	BC6	73
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	BC10	79
<i>Pseudomona luteola morf 1</i>	BC14	89
<i>Pseudomona luteola morf 2</i>	BC13	88
<i>Pseudomona luteola morf 3</i>	BC24	77
<i>Sphingomona plaucimobilis</i>	BC19	98
<i>Burkholderia ceparia morf 1</i>	BC21	72
<i>Burkholderia ceparia morf 2</i>	BC23	76
Bacteria sin identificar	BC1	-

En la Tabla ° 5 se muestra las características morfológicas y el resultado de la tinción Gram de las 11 bacterias caracterizadas.

Tabla 3: Morfología macroscópica y descripción de las bacterias caracterizadas.

Nombre científico/ Código interno.	Gram (+/-)	Morfología colonias	Aplicaciones biorremediación ⁵	Productos de uso industrial ⁶
<i>Pseudomona putida</i> / BC3	-	Colonias blancas de forma redondeada	Degradación de tolueno y xileno	-
<i>Pseudomona fluorescens</i> / BC4	-	Colonias amarillas de forma redonda	Degradación de fósforo.	Producción de factores de crecimiento
<i>Ralstonia Picketti</i> / BC6	-	Colonias blancas redondas pequeñas	Lixivia metales Cu, Fe, Ni, Zn y compuestos organoclorados	Biorremediación de varios tipos de contaminantes en suelo
<i>Stenotrophomona maltophilia</i> / BC10	-	Colonias blancas pálidas amorfas	Oxidante de hierro	-
<i>Pseudomona luteola</i> morf 1 / BC14	-	Colonias rosadas amorfas	Captan metales pesados	-
<i>Pseudomona luteola</i> morf 2/ BC13	-	Colonias blancas redondas pequeñas	Captan metales pesados	-
<i>Pseudomona luteola</i> morf 3 / BC24	-	Colonias blancas amorfas	Captan metales pesados	
<i>Sphingomona plaucimobilis</i> / BC19	-	Colonias gomosas blanquecinas	Biodegradante	Producción de esfinganos
<i>Burkholderia ceparia</i> morf 1/ BC21	-	Colonias amorfas amarillentas	Oxidante de hierro	
<i>Burkholderia ceparia</i> morf 2 / BC23	-	Colonias amorfas blanco opaco	Oxidante de hierro	
Bacteria sin identificar / BC1	-	Colonias transparentes blanquecinas amorfas	Oxidante de hierro	

4.5. Adaptación y Selección Bacteriana a Altas Concentraciones de Plata

Las pruebas de adaptación se realizaron sobre las bacterias previamente caracterizadas según los resultados de las Tablas ° 1 y 3, seleccionando las bacterias capaces de oxidar hierro. Los resultados se presentan en la Tabla ° 6 donde la simbología (+) indica un crecimiento en 48 horas de cultivo, el símbolo

⁵ Información recopilada de la publicación Microbiología de suelos

⁶ Información recopilada de www.microbewiki.com

(++) indica crecimiento en 24 horas y el símbolo (-) indica ausencia de crecimiento luego de 48 horas de cultivo

Tabla 4: Resultados de la prueba de adaptación a 30, 50 ppm Ag.

Bacterias	30 ppm de Ag.	50 ppm de Ag.
<i>Pseudomona luteola</i> morf. 1	++	+
<i>Sphingomona paucimobilis</i>	++	-
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	+	+
<i>Ralstonia pickettii</i>	+	+
<i>Pseudomona flourescens</i>	+	+
<i>Pseudomona luteola</i> morf. 2	+	-
Bacteria sin identificar BC1	++	+
<i>Burkholderia ceparia</i> morf. 1	-	-
<i>Burkholderia ceparia</i> morf. 2	-	-
<i>Pseudomona putida</i>	-	-
<i>Pseudomona luteola</i> morf. 3	-	-

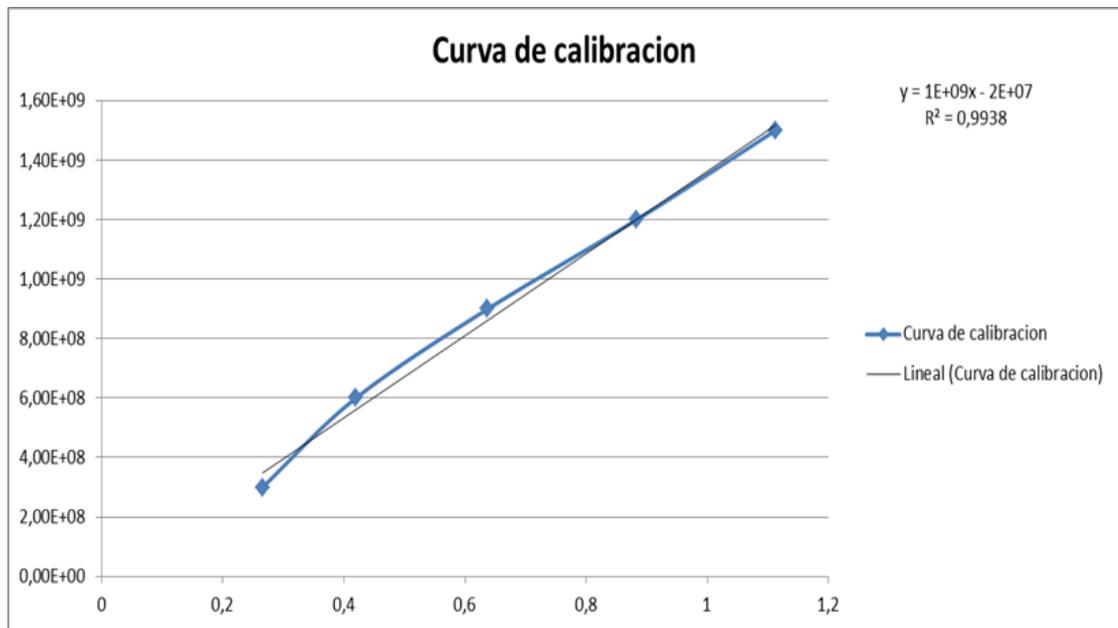
4.6. Evaluación De La Cinética De Crecimiento Bacteriano

Se realizó la regresión lineal en función de la escala McFarland a 625 nm, los datos obtenidos se muestran en la Tabla ° 7. La curva y su respectiva ecuación se presentan a continuación en el Grafico °3.

Tabla 5: Datos de la curva de calibración en escala McFarland.

Curva de calibración		
Escala McFarland	UFC/mL	Absorbancia promedio
1	3,00E+08	0,2656
2	6,00E+08	0,4196
3	9,00E+08	0,6373
4	1,20E+09	0,883
5	1,50E+09	1,112

Gráfico 3: Curva de calibración y ecuación de regresión lineal.



De la curva de calibración que se preparó se pudo obtener la ecuación que describe la concentración de microorganismo respecto de su absorbancia.

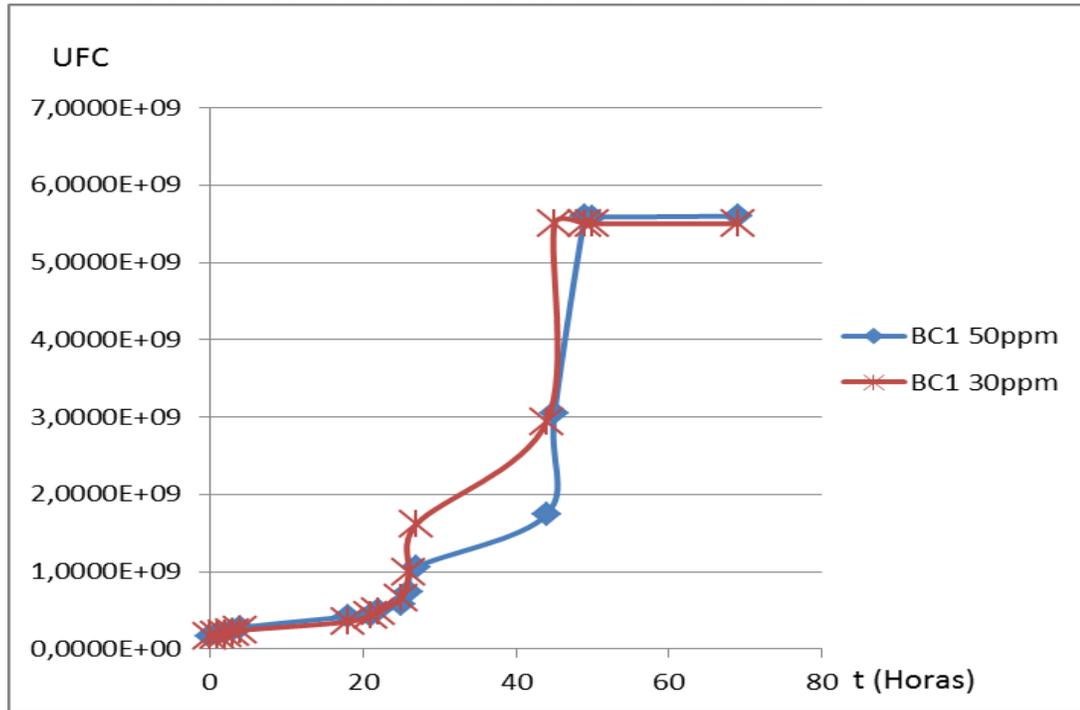
$$Y = 1x10^9 X - 2x10^7$$

Donde Y representa la cantidad de microorganismos identificados en UFC, X simboliza la absorbancia obtenida de la muestra de cultivo.

4.6.1. Cinética de crecimiento para bacteria sin identificar BC1

La curva de crecimiento en el Gráfico 4 muestra la fase de crecimiento exponencial entre la hora 20 y la hora 50.

Gráfico 4: Curva de crecimiento de Bacteria sin identificar BC1.

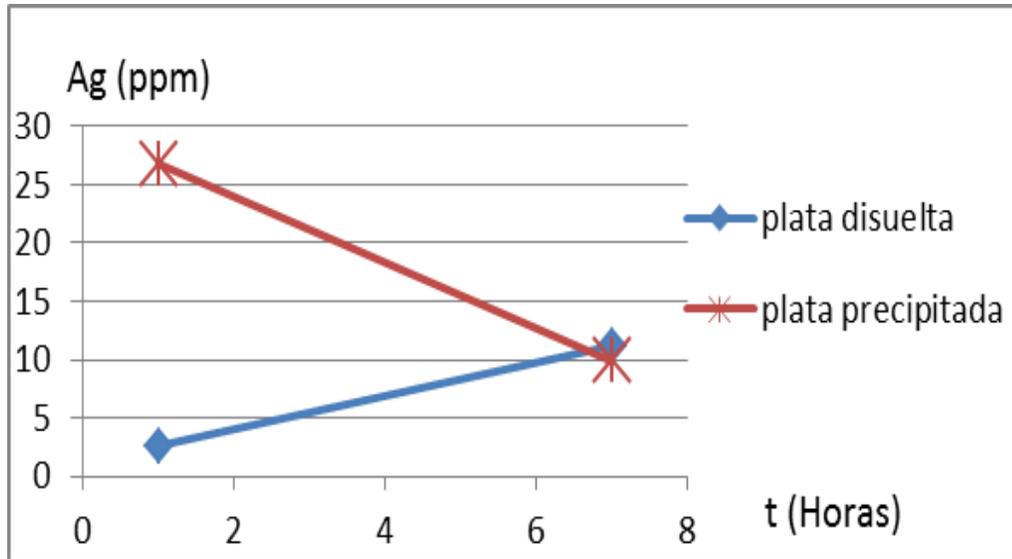


Además se presenta el análisis de concentración de plata contenida en el medio de cultivo al inicio y al final del ensayo en la Tabla 9, estos datos se presentan en el Gráfico 5.

Tabla 6: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica

Tiempo días	Concentración de Ag disuelta (ppm)	Concentración Ag precipitada (ppm)	Concentración Total Ag (ppm)
1	2,62	26,8	29,42
7	11,18	9,87	21,05
Plata absorbida (ppm)		8,37	

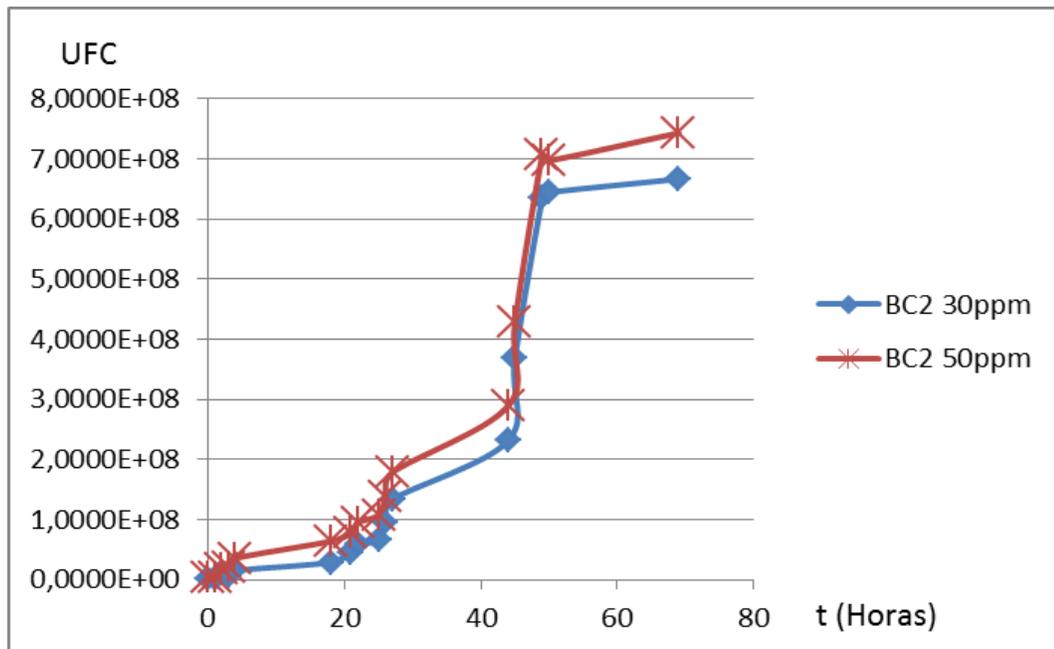
Gráfico 5: Cuantificación de plata en el medio de cultivo de BC1



4.6.2. Cinética de crecimiento para *Pseudomona luteola morf 1*

La curva cinética en el Gráfico 6 muestra que la fase de crecimiento exponencial está entre la hora 20 y la hora 54 del ensayo.

Gráfico 6: Curva de crecimiento de *Pseudomona luteola morf 1*

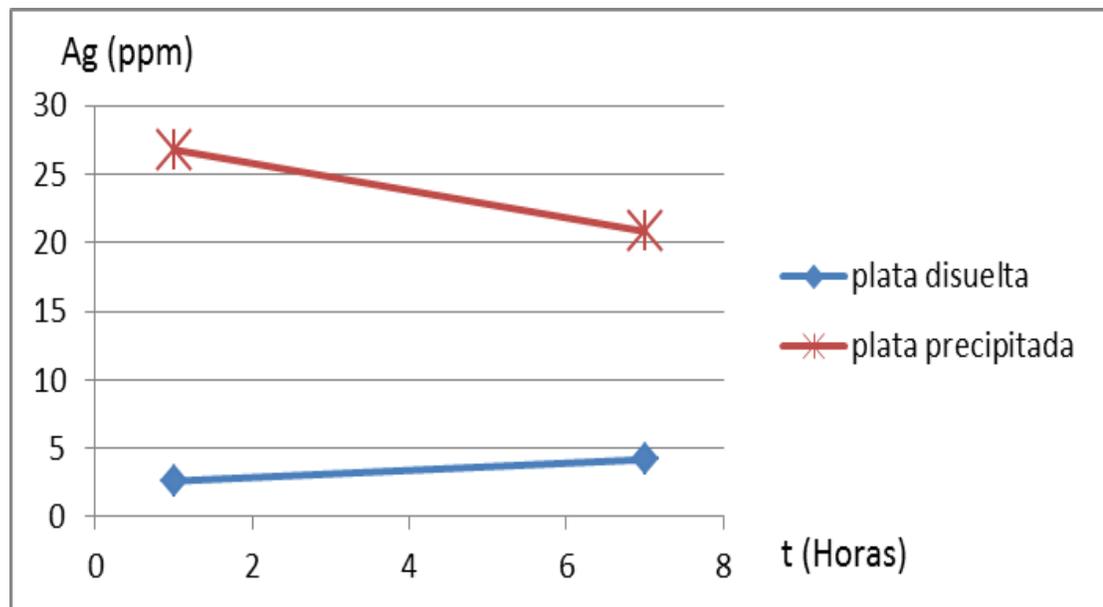


En la Tabla ^o 11 se presenta el análisis de la concentración de plata contenida en el medio de cultivo al inicio y al final del ensayo y estos datos se presentan en el Gráfico ^o 7.

Tabla 7: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica

Tiempo días	Concentración de Ag disuelta (ppm)	Concentración Ag precipitada (ppm)	Concentración Total Ag (ppm)
1	2,62	26,8	29,42
7	4,19	20,85	25,04
Plata Absorbida (ppm)		4,38	

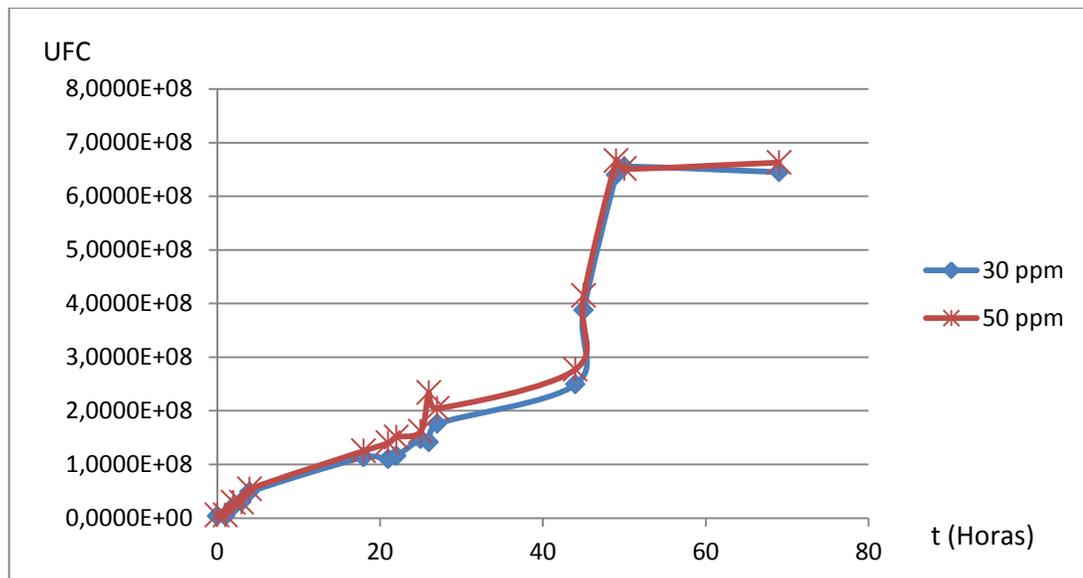
Gráfico 7: Cuantificación de plata en el medio de cultivo *Pseudomona luteola morf 1*



4.6.3. Cinética de crecimiento para *Stenotrophomona maltophilia*

La curva cinética en el Gráfico ^o 8 se muestran que la fase exponencial de crecimiento comprende la hora 26 y hora 50 del ensayo.

Gráfico 8: Cuantificación de plata en el medio de cultivo *Stenotrophomona maltophilia*

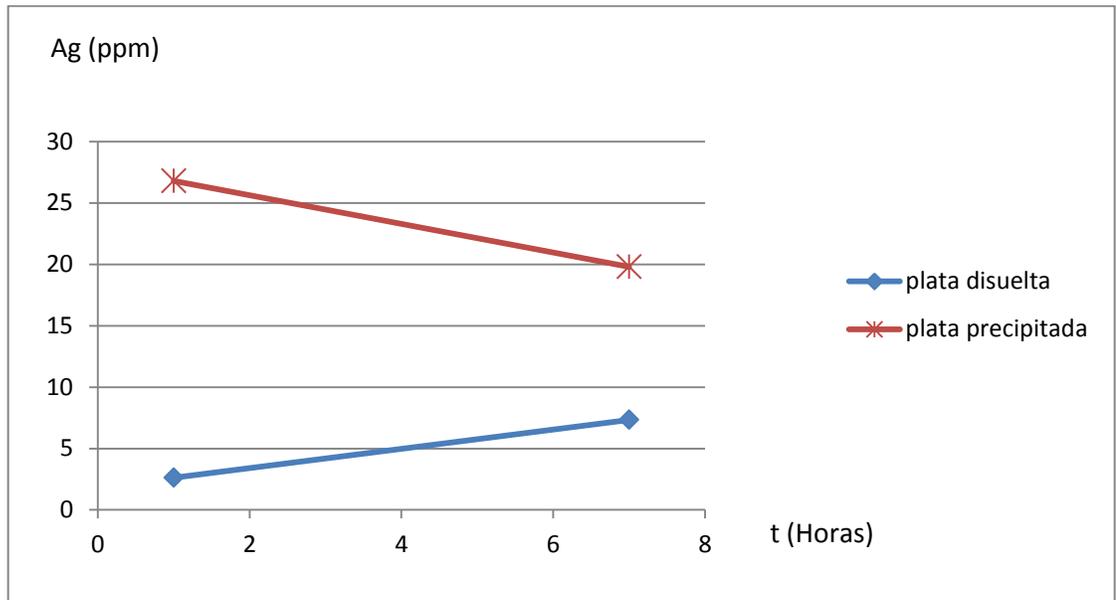


En la Tabla ^o 13 se presenta el análisis de concentración de plata contenida en el medio de cultivo al inicio y al final del ensayo y estos datos se muestran en el Gráfico ^o 9.

Tabla 8: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica

Tiempo días	Concentración de Ag disuelta (ppm)	Concentración Ag precipitada (ppm)	Concentración Total Ag (ppm)
1	2,62	26,8	29,42
7	7,33	19,8	27,13
Plata absorbida		2,29	

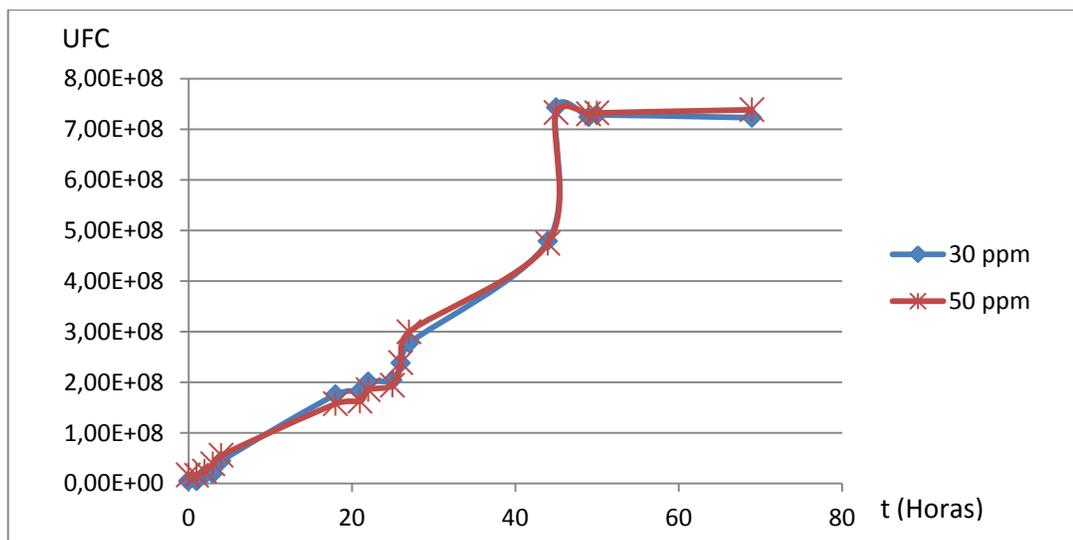
Gráfico 9: Cuantificación de plata en el medio de cultivo *Stenotrophomona maltophilia*



4.6.4. Cinética de crecimiento para *Ralstonia picketti*

La curva cinética en el Gráfico 10 muestra que la fase exponencial de crecimiento comprende la hora 25 y hora 45 del ensayo.

Gráfico 10: Cuantificación de plata en el medio de cultivo *Ralstonia picketti*

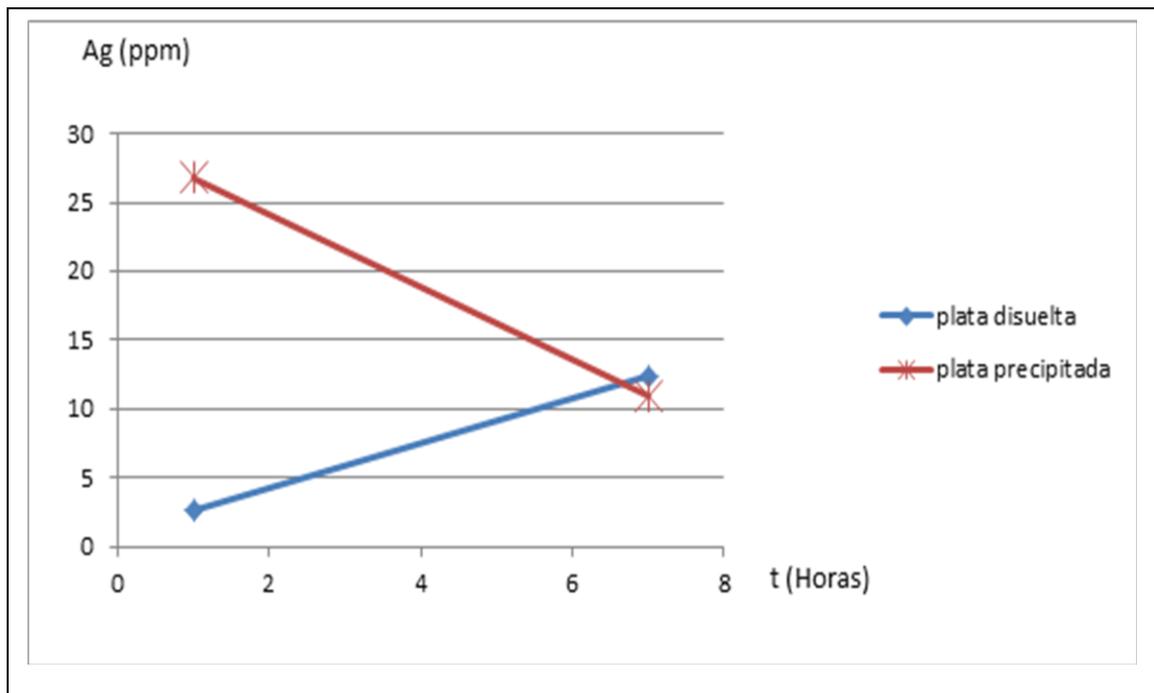


En la Tabla ^o 15 se presenta el análisis de concentración de plata contenida en el medio de cultivo al inicio y al final del ensayo en la Tabla ^o 15 y estos datos se muestran en el Gráfico ^o 11.

Tabla 9: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica.

Tiempo días	Concentración de Ag disuelta (ppm)	Concentración Ag precipitada (ppm)	Concentración Total Ag (ppm)
1	2,62	26,8	29,42
7	12,42	10,96	23,38
Plata absorbida		6,04	

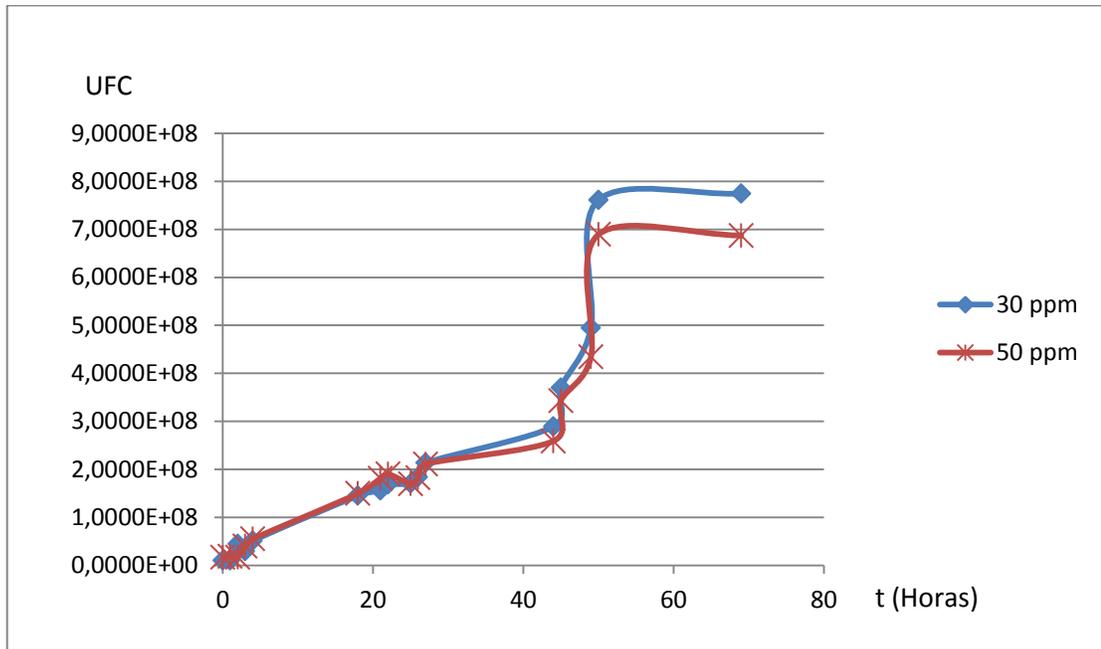
Gráfico 11: Cuantificación de plata en el medio de cultivo *Ralstonia picketti*.



4.6.5. Cinética de crecimiento para *Pseudomona fluorescens*

La curva cinética en el Gráfico 12 muestra que la fase exponencial de crecimiento comprende la hora 25 y hora 50 del ensayo.

Gráfico 12: Curva de crecimiento en el medio de cultivo *Pseudomona fluorescens*.



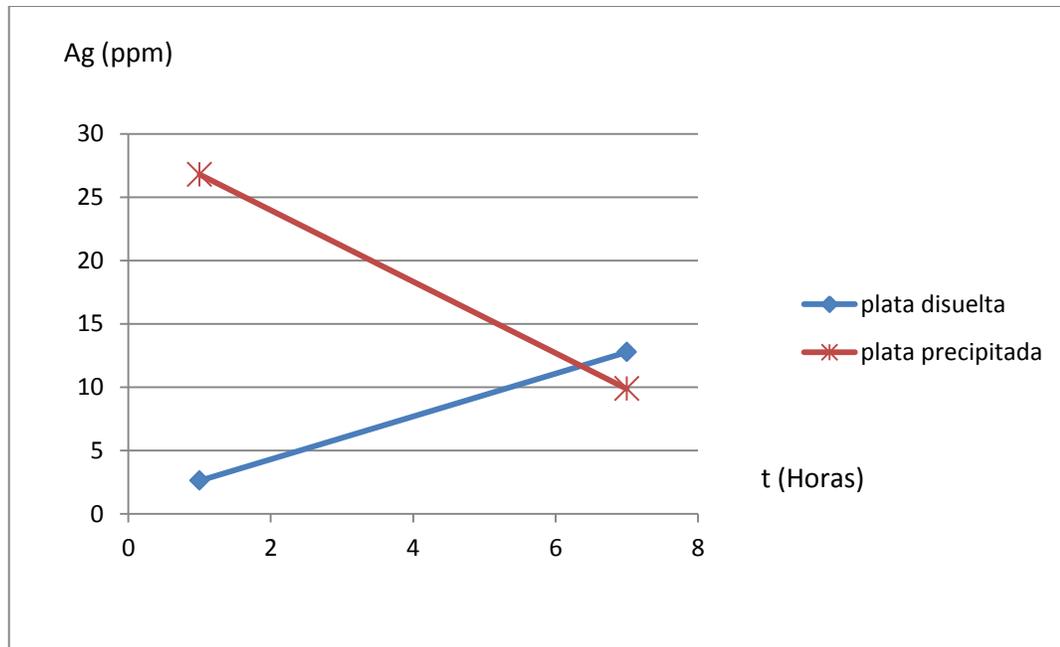
en la Tabla 17 se presenta el análisis de concentración de plata contenida en el medio de cultivo al inicio y al final del ensayo y estos datos se muestran en el Gráfico 1

Tabla 10: Cantidad de Ag determinada por Absorción atómica

Tiempo días	Concentración de Ag disuelta (ppm)	Concentración Ag precipitada (ppm)	Concentración Total Ag (ppm)
1	2,62	26,8	29,42
7	12,77	9,88	22,65
Plata absorbida		6,77	

G

Gráfico 13: Cuantificación de plata en el medio de cultivo *Pseudomona fluorescens*.



4.7. Cinética de Crecimiento Evidenciada En La Curva De Crecimiento

4.7.1. Análisis de datos a 30 ppm de Ag

En la Tabla ° 18 se muestra los resultados tabulados a partir de los datos del comportamiento cinético a 30 ppm de plata para cada una de las bacterias valiéndose de las fórmulas (3), (5) y (7) descritas en el marco teórico del presente trabajo.

Tabla 11: Resultados de la cinética bacteriana a 30 ppm de Ag.

Bacteria	Tiempo (t) horas	Tiempo de Generación (Tg) horas	Tasa específica de crecimiento (u)	Número de generación (Ng)
Bacteria sin identificar	69	6,92	0,05	9,97
<i>Pseudomona luteola</i> morf 1	69	5,33	0,08	12,94
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	69	5,55	0,08	12,42
<i>Ralstonia picketti</i>	69	5,65	0,06	12,21
<i>Pseudomona fluorencens</i>	69	6,18	0,53	11,16

Junto a esto se presenta la cantidad de plata al inicio y al final del ensayo de crecimiento bacteriano. En la Tabla ° 19 se observa estos resultados

Tabla 12: Resultados del contenido de plata al inicio y al final de la cinética a 30 ppm Ag.

Bacteria	Plata soluble (%)	Plata no soluble (%)	Plata absorbida (%)
Bacteria sin identificar	38,01	33,54	28,45
<i>Pseudomona luteola</i> morf 1	14,25	70,87	14,88
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	24,91	60,3	7,78
<i>Ralstonia picketti</i>	42,21	37,25	20,53
<i>Pseudomona fluorencens</i>	43,4	33,58	23,2

4.7.2. Análisis de datos a 50 ppm de Ag

En la Tabla ° 20 se muestra los resultados tabulados a partir de los datos del comportamiento cinético a 50 ppm de plata para cada una de las bacterias valiéndose de las formulas (3),(5) y (7) descritas en el marco teórico del presente trabajo.

Tabla 13: Resultados de la cinética bacteriana a 50 ppm de Ag.

Bacteria	Tiempo (t) horas	Tiempo de Generación (Tg) horas	Tasa específica de crecimiento (u)	Número de generación (Ng)
Bacteria sin identificar	69	6,96	0,05	9,91
<i>Pseudomona luteola</i> morf 1	69	5,72	0,07	12,07
<i>Stenotrophomona maltophilia</i>	69	5,79	0,07	11,91
<i>Ralstonia picketti</i>	69	6,20	0,06	11,12
<i>Pseudomona fluorencens</i>	69	6,75	0,54	10,22

4.8 Discusión de resultados

El 50% de las bacterias aisladas y caracterizadas en el estudio pertenecen al género *Pseudomona*, como afirma Gonzales (2005), la mayor cantidad de bacterias mesófitas no entéricas las cuales pertenecen a este género y han demostrado una gran capacidad para captar contaminantes de diversos orígenes entre ellos metales pesados como el plomo, cadmio, zinc, hidrocarburos y algunos pesticidas organoclorados,.

De las bacterias aislada BC1 no pudo ser caracterizada con el KIT API 20NE, esto pudo deberse a que este se limita a bacterias Gram – no fastidiosas, debido a que no mostro capacidad para asimilar carbono; se puede presumir que es capaz de fijar carbono del CO₂ ambiental interactuando en presencia de azufre y hierro del medio de cultivo para producir energía utilizando al ion Fe⁺²

como aceptor de electrones según describe Ly (2009). Llegando a obtener su morfología macroscópica: colonias transparentes blanquecinas amorfas y la tinción de Gram negativa.

En el proceso de adaptación a plata ion, se observó que menos del 50% de las bacterias aisladas, sobrevivieron a 30 ppm Ag, (es importante tomar esta concentración como punto referencial, debido a que según la empresa minera MINASECO esta es la concentración de plata en las menas que actualmente se explotan en el Ecuador), no obstante se demostró que bacterias del género *Pseudomona* pueden adaptarse a concentraciones mayores, como es el caso *Pseudomona luteola morf 1 y morf 2*, *Pesudomona fluorecens* y *Pseudomona putida*, las cuales sobrevivieron a concentración de 50 ppm de Ag, lo que contradice a Liesje (2011), quien afirma que la concentración mínima inhibitoria de plata iónica es de 29 ppm para bacterias de este género. Prescott (2008), por el contrario afirma: “las bacterias pueden adaptarse a los más diversos ambientes”

En este estudio, se pudo identificar que *Pesudomona fluorecens* tiene características importantes en la lixiviación de plata como es la relación entre el porcentaje de plata lixiviada y el tiempo de generación. *P fluorecens* demostró solubilizar el 43,4% de la plata que se encontraba como cloruro de plata formando un precipitado insoluble en el medo de cultivo, además su tiempo de generación a 30 ppm de plata fue de 6,18 horas. Según lo anotado por Viña (2005) el tiempo de generación de *Pseudomona fluorecens* puede ser menor ya que en sus estudios esta bacteria mostró que en un medio de cultivo que contenía contaminantes como zinc y cadmio el tiempo de generación fue de 5,7 horas.

Coyne (2000), asegura que la adaptabilidad de las bacterias del suelo es una ventaja para el desarrollo de nuevas tecnologías, se vuelve imperativo buscar alternativas para mejorar los porcentajes de lixiviación de *Pseudomona fluorescens*

CAPITULO V

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- En los procesos de aislamiento y bio-estimulación se obtuvieron 25 cepas morfológicamente diferentes, de estas 11 tuvieron la capacidad de oxidar hierro.
- Las cepas *Pseudomona luteola* morf.1, *Sphingomona paucimobilis*, *Stenotrophomona maltophilia*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomona fluorescens*, *Pseudomona luteola* morf.2, Bacteria sin identificar BC1 presentaron adaptabilidad y crecimiento a la concentración de 30 ppm de plata, mientras que a la concentración 50 ppm de plata crecieron solo: *Pseudomona luteola* morf 1, *Stenotrophomona maltophilia*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomona fluorescens* y Bacteria sin identificar BC1
- Las curvas cinéticas fueron heterogéneas mostrando diferencia en el comportamiento frente a las dos concentraciones de plata.
- *Pseudomona fluorescens* presenta el porcentaje más alto de solubilizaron respecto a las 5 bacterias del ensayo con 43,4 %, en el estudio de la cinética de crecimiento, lo cual indica que esta bacteria es una buena candidata para estudios de remediación y recuperación industrial de plata.
- La bacteria sin identificar BC1, presentó el mayor porcentaje de bioacumulación de plata con un 28,45%, lo que indica su potencial uso en remediación de ambientes contaminados con plata.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda profundizar en la interacción metabólica de las bacterias con la plata presente en el medio de cultivo, con el fin de desarrollar nuevas tecnologías capaces de remplazar a los actuales métodos de extracción de metales.
- Como se expresa en las conclusiones BC1 demuestra ser una bacteria con potencial aplicación en biorremediación por lo que se recomienda aplicar una técnica genética de caracterización taxonómica
- Se recomienda realizar estudios de estos microorganismos en ensayos similares con otros metales y en otras condiciones. Adicionalmente se puede realizar ensayos combinando microorganismos los cuales pueden potenciar el resultado con plata y otros metales de interés industrial.
- Para finalizar se recomienda continuar con el estudio a fin de obtener resultados más amplios de la interacción de las bacterias con metales con un valor comercial Ag, Au, etc. o metales pesados Pb, Cr, Cd etc.

5. BIBLIOGRAFÍA

Libros

- Coyne M, 2000, **Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio, capítulo diez y siete, Transformaciones del Hierro y del Magnesio**, pagina 198, editorial Paraninfo, Madrid, España.
- Godia F, López J, 2000, **Ingeniería Bioquímica, capítulo 4 cinética bacteriana**, Editorial Síntesis, Madrid-España.
- González E., 2005, **Biotecnología y medioambiente, cap. 2 ecología microbiana molecular**, pagina 39-60.
- Granados R, 2002, **Microbiología tomo II, capítulo 3, 4 y 5 Pruebas Bioquímicas**, editorial Internacional Thomson Editoriales, Madrid-España.
- Madigan M, Martinko J, 1999, **Biología de los Microorganismos, capítulo cuatro nutrición y metabolismo**, pagina 109, editorial Isabel Capella, Madrid, España.
- Prescott et al, 2008, **Microbiología**, Séptima Edición, editorial Mc Graw Hill, Madrid España, capítulo 6 crecimiento bacteriano y capítulo 5 nutrición bacteriana.
- Skoog, Douglas, 2005, **Fundamentos de Química Analítica, octava edición, capítulo 24 introducción a los análisis espectro-químicos**, Editorial Thompson, México D.F., México.

Web

- Acevedo, f. Gentina, C., 2005, **Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras**, disponible en línea: http://www.euv.cl/archivos_pdf/libros_nuevos/fundamentos_biomineras.pdf Chile, consultado el 16 de mayo de 2011.
- Alpaca M, 2009, **Revista del instituto de investigación de la facultad de ingeniería geológica**, consultado en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-08881998000200006 (25 de abril de 2010).

- Bacelar-Nicolau. P, Johnson D.B, 1999, **Leaching of pyrite by acidophilic heterotrophic iron oxidizing bacteria in pure and mixed cultures**, Appl. Environ. Microbiol. 65:585-590.
- Ballesteros A. M.L., Gutiérrez O.J.J., 2001, **Selecting bacteria with leaching capability for ore refractory silver**, IV Foro de postgrado de Norteamérica, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. (Memoria in extenso).
- Bañuelos, G.S., 1994, **Minerales refractarios al proceso de cianuración con un pre tratamiento por lixiviación bacteriológica**, Seminario sobre instrumentación en plantas de beneficio y desarrollo en procesamiento de minerales. Guanajuato, Gto. México.
- Barreno, P; Yépez, F, 2008, **Contaminación por mercurio en Zaruma y Portovelo: conclusiones y recomendaciones**. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/> consultado el 30 de abril de 2010.
- Belliveau, B.H., Starodub, ME, Cotter, C., Trevors, J.T. 1987. **Metal resistance and accumulation in bacteria**. Biotech. Adv. 5:101-127.
- Biomerieux S.A., 2006, **Sistema de identificación de bacilos Gram negativos no entéricos, API 20 NE**. Sección en español paginas 5-8.
- Castro W., 2007, **Informe sobre el potencial de la exploración minera**, disponible en: http://www.innocentinc.com/uploads/maria_olivia_report_spanish_2010_05_26_11_24_17.pdf consultado el 17 de agosto del 2011.
- Diario Hoy, 2010, periódico en línea disponible en: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/zaruma-y-portovelo-contaminados-321462.html> consultado el 20 de abril de 2010. **Artículo Zaruma y Portovelo, contaminados**.
- Felix W. Hruschk, 1997, **Costos y beneficios de la pequeña minería en los países en vías de desarrollo**, disponible en línea:

<http://www.hruschka.com/felix/article/costbene.html> consultado el 13 de octubre de 2011.

- García, F., 2006, **Sensibilidad de la plata coloidal en cultivos de actinobacillus actinomycetemcomitans**, disponible en línea: http://www.lulu.com/items/volume_45/685000/685217/1/print/685217.pdf consultado el 16 de mayo de 2011.
- Liesje Sintubin & Bart De Gussemé, 2011, **The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action**, Springer-Verlag
- Ly M, 2009, **Perspectivas de la Biominería en el Perú, 1ª Conferencia Nacional de Biotecnología** - Mayo 2009, disponible en línea en: http://www.perubiotec.org/PDFs/15_M_Ly-Biomineria_en_Peru.pdf consultado el 8 de junio de 2011.
- Torres, R., 2003, **El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos, Ecosistemas 2003 / 2** disponible en (<http://www.aeet.org/ecosistemas/032/informe1.htm>).
- Viñas, M., 2005, **Biorremediación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos: Caracterización Microbiológica, Química Y Ecotoxicológica, Chile**, Disponible en línea: http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2396/TESIS_MVINAS_CANALS.pdf?sequence=1. Consulta: 16 de mayo de 2011.
- Vullo, D., 2003, **Microorganismos y Metales Pesados: Una Interacción en Beneficio del Medio Ambiente. Química Viva**. Disponible en: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>
- Ybarra R., 2009, **Biblioteca de la joyería**, disponible en línea: http://www.raulybarra.com/notijoya/archivosnotijoya/plata_extraccion.htm consultado el 6 de junio de 2011.

ANEXO 1: Acta de entrega-recepción del cerapio

**ACTA DE ENTREGA RECEPCIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS CORRESPONDIENTES AL PROYECTO DE TESIS
"AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS NO ENTÉRICAS CON CAPACIDAD DE
ADAPTARSE EN ALTAS CONCENTRACIONES DE PLATA, PRESENTES EN UNA LAGUNA DE SEDIMENTACIÓN DE LA
PLANTA MINERA DEL SECTOR EL PACHE, PROTOVELO, EL ORO"**

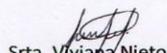
En la ciudad de Quito, a los 11 días del mes de abril de dos mil doce, los suscritos, el señor Lenin Javier Ramírez Cando, quien entrega las cepas bacterianas, señorita Viviana Nieto, quien recibe las cepas, en conocimiento de la Ing. María Belén Aldás, en calidad de Coordinadora Técnica de los Laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad, se procede con la constatación física y entrega-recepción de las cepas bacterianas correspondientes al proyecto de tesis indicado.

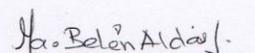
Se deja constancia de que las cepas quedan almacenadas en el Laboratorio de Microbiología, con el siguiente listado:

Nombre científico	Código
Pseudomona Putida	BC3
Pseudomona fluorescens	BC4
Ralstonia picketti	BC6
Stenotrophomona maltophilia	BC10
Pseudomona luteola morf 1	BC14
Pseudomona luteola morf 2	BC13
Pseudomona luteola morf 3	BC24
Sphingolmona plaucimobilis	BC19
Burkholderia ceparia morf 1	BC21
Burkholderia ceparia morf 2	BC23
Barcteria sin identificar	BC1

Para constancia de lo actuado, suscriben la presente acta de entrega-recepción, firman los suscritos:


Sr. Lenin Ramirez


Srta. Viviana Nieto


Ing. María Belén Aldás M.Sc.

ANEXO 2: Hojas de resultados Kit API 20NE

07224 REF: 2011/06/06

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie:

BIOMÉRIEUX

24 h	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-				
48 h	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	4			
	NO ₂ N ₂	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	LADJ	IMLT	LCIT	LPAC	OX	
24 h	0			4			4			8			3			6					4	
48 h																						

Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy: BC 19

Ident. / Ταυτοποίηση: *Sphingomonas paucimobilis*

07224 B REF: B107 2011/06/01

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie:

BIOMÉRIEUX

24 h	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+			
48 h	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4	
	NO ₂ N ₂	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	LADJ	IMLT	LCIT	LPAC	OX	
24 h	4			1			4			3			4			5					3	
48 h																						

Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy: BC 3

Ident. / Ταυτοποίηση: *Pseudomonas putida*

07224 B REF: SS 2 2011/06/06

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie:

BIOMÉRIEUX

24 h	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+		
48 h	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	4	
	NO ₂ N ₂	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNG	GLU	ARA	IMNE	IMAN	INAG	IMAL	IGNT	ICAP	LADJ	IMLT	LCIT	LPAC	OX	
24 h	0			2			5			7			5			7					4	
48 h																						

Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy: BC 4

Ident. / Ταυτοποίηση: *Pseudomonas fluorescens*

07224 REF: SSS 2011/10/105

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

24 h	NO ₂ h ₂	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	OX
48 h																				
24 h		0			0			0			0			5		6			2	
48 h																				

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy : BC6

Ident. / Ταυτοποίηση :
Ralstonia pickettii

Imprimé en France / Printed in France

07224 B REF: ML 2011/10/106

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

24 h	NO ₂ h ₂	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	OX
48 h																				
24 h		0			0			7			7			7		5			3	
48 h																				

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy : BC23

Ident. / Ταυτοποίηση :
Burkholderia cepacia prof 2

Imprimé en France / Printed in France

ANEXO 3: Resultados del contenido de Ag en el medio de cultivo (Absorción Atómica)



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 7454-04-10-11-11-Q

Empresa: LENIN RAMÍREZ
Nombre de representante: LENIN RAMÍREZ
Dirección: San Pedro de Taboada
Teléfono: 84454656 **FAX:**
Identificación de la muestra: MEDIO DE CULTIVO
Descripción de la muestra: Líquido turbio color café claro.
Contenido declarado: 20mL
No. de Lote o código: M4 *Blanco*
Fecha de elaboración: ND **Fecha de caducidad:** ND
Muestreo: Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND
Fecha de recepción: 10-Nov-11
Fecha de ensayo: 11 y 17 Nov-2011
Fecha de reporte: 17-Nov-11

Resultados analíticos: Pag.: 1 de 1

Muestra	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Muestra filtrada	Plata (Ag)	APHA 3500	mg/L	2.62
Muestra digerida				26.80

BQ.F Raquel Rosas R.
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Análisis



Dr. Germánico Silva M.
Director Técnico
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Director Técnico

Notas:
ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis. Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis. La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

ref.:POE.5.10.1 Rev.:03 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús
Telfs: (593 2) 2230342
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872
e-mail: info@centrocesal.com
www.centrocesal.com
QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.**

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 7454-06-10-11-11-Q

Empresa: LENIN RAMÍREZ
Nombre de representante: LENIN RAMÍREZ
Dirección: San Pedro de Taboada
Teléfono: 84454656 **FAX:**
Identificación de la muestra: MEDIO DE CULTIVO
Descripción de la muestra: Líquido turbio color café claro.
Contenido declarado: 20mL
No. de Lote o código: M6 BC 7.
Fecha de elaboración: ND **Fecha de caducidad:** ND

Muestreo: Por el cliente **Fecha de toma de muestra:** ND
Fecha de recepción: 10-Nov-11
Fecha de ensayo: 11 y 17 Nov-2011
Fecha de reporte: 17-Nov-11

Resultados analíticos: Pag.: 1 de 1

Muestra	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Muestra filtrada	Plata (Ag)	APHA 3500	mg/L	12.77
Muestra digerida				9.88

BQ.F Raquel Rosas R.
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Análisis



Dr. Germánico Silva M.
Director Técnico
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Director Técnico

Notas:
ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

rfref.:POE:5.10.1 Rev.:03 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús
Telfs: (593 2) 2230342
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872
e-mail: info@centrocesal.com
www.centrocesal.com
QUITO - ECUADOR



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 7454-02-10-11-11-Q

Empresa: **LENIN RAMÍREZ**
Nombre de representante: **LENIN RAMÍREZ**
Dirección: **San Pedro de Taboada**
Teléfono: **84454656** FAX:
Identificación de la muestra: **MEDIO DE CULTIVO**
Descripción de la muestra: **Líquido turbio color café claro.**
Contenido declarado: **20mL**
No. de Lote o código: **M2 BCL**
Fecha de elaboración: **ND** Fecha de caducidad: **ND**

Muestreo: **Por el cliente** Fecha de toma de muestra: **ND**
Fecha de recepción: **10-Nov-11**
Fecha de ensayo: **11 y 17 Nov-2011**
Fecha de reporte: **17-Nov-11**

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

Muestra	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Muestra filtrada	Plata (Ag)	APHA 3500	mg/L	11.18
Muestra digerida				9.87

BQ.F Raquel Rosas R.
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Análisis



Dr. Germánico Silva M.
Director Técnico
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Director Técnico

Notas:
ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis
Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio
y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

f.ref.:POE:5.10.1 Rev..03 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús
Telfs: (593 2) 2230342
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872
e-mail: info@centrocesal.com
www.centrocesal.com
QUITO - ECUADOR



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cia. Ltda.

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 7454-03-10-11-11-Q

Empresa: **LENIN RAMÍREZ**
Nombre de representante: **LENIN RAMÍREZ**
Dirección: **San Pedro de Taboada**
Teléfono: **84454656** FAX:
Identificación de la muestra: **MEDIO DE CULTIVO**
Descripción de la muestra: **Líquido turbio color café claro.**
Contenido declarado: **20mL**
No. de Lote o código: **M3 BC 6**
Fecha de elaboración: **ND** Fecha de caducidad: **ND**

Muestreo: **Por el cliente** Fecha de toma de muestra: **ND**
Fecha de recepción: **10-Nov-11**
Fecha de ensayo: **11 y 17 Nov-2011**
Fecha de reporte: **17-Nov-11**

Resultados analíticos:

Pag.: 1 de 1

Muestra	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Muestra filtrada	Plata (Ag)	APHA 3500	mg/L	12.42
Muestra digerida				10.96

BQ.F Raguél Rosas R.
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Responsable de Análisis



Dr. Germánico Silva M.
Director Técnico
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Director Técnico

Notas:

ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis.
Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio
y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

f.ref.:POE-5.10.1 Rev.:03 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús

Teléfono: (593 2) 2230342

Fax: Ext. 102 Celular: 099649872

e-mail: info@centrocesal.com

www.centrocesal.com

QUITO - ECUADOR



CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cía. Ltda.

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 7454-05-10-11-11-Q

Empresa: **LENIN RAMÍREZ**
Nombre de representante: **LENIN RAMÍREZ**
Dirección: **San Pedro de Taboada**
Teléfono: **84454656** FAX:
Identificación de la muestra: **MEDIO DE CULTIVO**
Descripción de la muestra: **Líquido turbio color café claro.**
Contenido declarado: **20mL**
No. de Lote o código: **M5** *BC10*
Fecha de elaboración: **ND** Fecha de caducidad: **ND**

Muestreo: **Por el cliente** Fecha de toma de muestra: **ND**
Fecha de recepción: **10-Nov-11**
Fecha de ensayo: **11 y 17 Nov-2011**
Fecha de reporte: **17-Nov-11**

Resultados analíticos: Pag.: 1 de 1

Muestra	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Muestra filtrada	Plata (Ag)	APHA 3500	mg/L	19.8
Muestra digerida				7.33

B.Q.F. Raquel Rosas R.
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Responsable de Análisis



Dr. Germánico Silva M.
DIRECTOR TÉCNICO
CENTROCESAL Cía. Ltda.

Director Técnico

Notas:
ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis
Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cía. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio
y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

f.ref.:POE:5.10.1 Rev.:03 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús
Telfs: (593 2) 2230342
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872
e-mail: info@centrocesal.com
www.centrocesal.com
QUITO - ECUADOR



**CENTRO DE SOLUCIONES ANALITICAS INTEGRALES
CENTROCESAL Cia. Ltda.**

AREA QUÍMICA

INFORME DE ENSAYO No.: 7454-01-10-11-11-Q

Empresa: **LENIN RAMÍREZ**
Nombre de representante: **LENIN RAMÍREZ**
Dirección: **San Pedro de Taboada**
Teléfono: **84454656** FAX:
Identificación de la muestra: **MEDIO DE CULTIVO**
Descripción de la muestra: **Líquido turbio color café claro.**
Contenido declarado: **20mL**
No. de Lote o código: **M1 BC 14**
Fecha de elaboración: **ND** Fecha de caducidad: **ND**

Muestreo: **Por el cliente** Fecha de toma de muestra: **ND**
Fecha de recepción: **10-Nov-11**
Fecha de ensayo: **11 y 17 Nov-2011**
Fecha de reporte: **17-Nov-11**

Resultados analíticos: Pag.: 1 de 1

Muestra	Parámetro	Método	Unidades	Resultado
Muestra filtrada	Plata (Ag)	APHA 3500	mg/L	4.19
Muestra digerida				20.85



BQ.F Raquel Rosas R.
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Responsable de Análisis

Dr. Germánico Silva M.
Director Técnico
CENTROCESAL Cia. Ltda.

Director Técnico

Notas:
ND: No declara
NA: No aplica

Los resultados reportados son válidos solo para las muestras analizadas de este reporte.
Las condiciones ambientales de temperatura y humedad no influyen en este análisis
Muestras recibidas en el Laboratorio, CENTROCESAL Cia. Ltda. se responsabiliza únicamente de los análisis.
La declaración sobre la incertidumbre de medición, se puede solicitar al laboratorio
y será información cuando el cliente lo requiera o cuando afecte a los límites de una especificación.

f.ref.POE:5.10.1 Rev.03 Anexo 1

Este informe no podrá ser reproducido parcial o totalmente, sin la autorización escrita del Laboratorio

Av. América N31-232 y Av. Mariana de Jesús
Telfs: (593 2) 2230342
Fax: Ext. 102 Celular: 099649872
e-mail: info@centrocesal.com
www.centrocesal.com
QUITO - ECUADOR

ANEXO 4: Material fotográfico



Imagen °7 Estriado, Ramírez, 2011



Imoagen °8 Cambi de color, Ramírez, 2011



Imagen °9 Crecimiento en Ag, Ramírez,2011



Imagen °10 Incubacion, Ramírez, 2011



Imagen °11 Espectrofotometria, Ramírez, 2011



Imagen °12 BC1 al microscopio, Ramírez, 2011



Imagen ° 13 Materiales, Ramírez, 2011 Imagen °14 Kit API , Ramírez, 2011



Imagen ° 15 Muestreo 1, Ramírez, 2011 Imagen °16 Muestreo 2, Ramírez, 2011

Anexo 3 Datos del crecimiento bacteriano

Bacteria sin identificar

Tabla 14: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.

Tiempo Horas	BC1 30ppm	BC1 50ppm
0	1,6587E+08	1,6950E+08
1	1,9440E+08	1,8053E+08
2	2,1140E+08	2,0023E+08
3	2,4273E+08	2,1903E+08
4	2,8023E+08	2,4273E+08
18	4,1773E+08	3,5077E+08
21	4,3530E+08	4,3623E+08
22	4,9530E+08	4,8663E+08
25	5,8290E+08	6,5643E+08
26	7,4217E+08	9,8657E+08
27	1,0581E+09	1,6190E+09
44	1,7428E+09	2,9412E+09
45	3,0482E+09	5,4984E+09
49	5,6062E+09	5,4996E+09
50	5,5873E+09	5,5023E+09
69	5,5990E+09	5,5021E+09

Fuente: El Autor, 2012

Pseudomona luteola morf 1

Tabla 15: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.

Tiempo (Horas)	BC2 30ppm	BC2 50ppm
0	2,5000E+06	5,1000E+06
1	2,5000E+06	5,1000E+06

2	1,0900E+07	1,7600E+07
3	7,6000E+06	2,0140E+07
4	1,5470E+07	3,5670E+07
18	2,9200E+07	6,4370E+07
21	4,5740E+07	7,7670E+07
22	5,8470E+07	9,5240E+07
25	6,6240E+07	1,0797E+08
26	9,5200E+07	1,3944E+08
27	1,3350E+08	1,7857E+08
44	2,3160E+08	2,8927E+08
45	3,6887E+08	4,2977E+08
49	6,3443E+08	7,0620E+08
50	6,4404E+08	6,9720E+08
69	6,6637E+08	7,4307E+08

Fuente: El Autor, 2012

Stenotrophomona maltophilia

Tabla 16: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.

Tiempo (horas)	30 ppm	50 ppm
0	3,4701E+06	5,0890E+06
1	3,4600E+06	5,1000E+06
2	2,1530E+07	2,8800E+07
3	3,0260E+07	2,9100E+07
4	4,8760E+07	5,3770E+07
18	1,1360E+08	1,2523E+08
21	1,0993E+08	1,3980E+08
22	1,1550E+08	1,5090E+08

25	1,4690E+08	1,6140E+08
26	1,4116E+08	2,3380E+08
27	1,7536E+08	2,0413E+08
44	2,4916E+08	2,7733E+08
45	3,8713E+08	4,1463E+08
49	6,3976E+08	6,6650E+08
50	6,5520E+08	6,5117E+08
69	6,4506E+08	6,6293E+08

Fuente: El Autor, 2012

Ralstonia picketti

Tabla 17: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag.

Tiempo (horas)	30 ppm	50 ppm
0	4,50E+06	1,63E+07
1	4,53E+06	1,62E+07
2	1,66E+07	2,44E+07
3	1,89E+07	3,85E+07
4	4,42E+07	5,55E+07
18	1,75E+08	1,57E+08
21	1,83E+08	1,63E+08
22	2,01E+08	1,85E+08
25	2,04E+08	1,94E+08
26	2,38E+08	2,39E+08
27	2,77E+08	2,99E+08
44	4,79E+08	4,75E+08
45	7,43E+08	7,33E+08

49	7,24E+08	7,30E+08
50	7,28E+08	7,32E+08
69	7,23E+08	7,38E+08

Fuente: El Autor, 2012

Pseudomona fluorescens

Tabla 18: Datos obtenidos por espectrofotometría UV-VIS en medio con 30 y 50 ppm Ag

Tiempo (horas)	30 ppm	50 ppm
0	1,0010E+07	1,7050E+07
1	1,0000E+07	1,8800E+07
2	4,4370E+07	1,7000E+07
3	2,9530E+07	4,0230E+07
4	5,1070E+07	5,5030E+07
18	1,4513E+08	1,4980E+08
21	1,5627E+08	1,8146E+08
22	1,6840E+08	1,9040E+08
25	1,7053E+08	1,6990E+08
26	1,8403E+08	1,8260E+08
27	2,1337E+08	2,1116E+08
44	2,8933E+08	2,5896E+08
45	3,6990E+08	3,4313E+08
49	4,9477E+08	4,3423E+08
50	7,6103E+08	6,8923E+08
69	7,7447E+08	6,8713E+08