

ANÁLISIS DE ESTABILIDAD EN UN REACTOR CONTINUO BAJO DIVERSOS MODELOS CINÉTICOS PARA UN PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN

ANALYSIS OF STABILITY IN A CONTINUOUS REACTOR UNDER VARIOUS KINETIC MODELS FOR A BIOLIXIVIATION PROCESS

Figueroa Estrada J. C.^{1,2}, Aguilar López R.¹, Neria González M. I.^{2,*}

¹ División de Ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec (TESE), Av. Tecnológico S/N, Valle de Anáhuac, CP. 55210, Ecatepec de Morelos, México, México.

² Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional, Col. San Pedro Zacatenco, CP. 07360, Ciudad de México, México.
*ibineria@hotmail.com

RESUMEN

Los microorganismos quimiolitautótrofos han sido estudiados con la finalidad de comprender su metabolismo y su capacidad de recuperación de metales como el oro, plata, cobre, níquel, entre otros que se encuentran en yacimientos rocosos. La caracterización fisiológica de dos cepas bacterianas quimiolitautótrofas (LR1 y LR2) aisladas de jales, indica que poseen la capacidad obtener su fuente de electrones del hierro. La oxidación del hierro durante el crecimiento de las cepas se realizó con la técnica de fenantrolina y siguiendo el potencial

oxido-reducción. Las cepas mostraron una oxidación del 21% del hierro, cuando son crecidas en medio WAYE a pH 2.5 en aerobiosis. La caracterización filogenética de las cepas indicó que pertenecen a la Clase β -Proteobacteria, por lo que las cepas podrían presentar un metabolismo heterótrofo y autótrofo. Por lo que, ambas cepas fueron cultivadas bajo diferentes fuentes de carbono orgánicas, sin embargo, las cepas no presentaron crecimiento, por lo que se reveló un posible metabolismo quimiolitautótrofo estricto. En conclusión, la cepa LR1 y LR2 son

bacilos gram positivos acidófilos quimiolitautótrofos con posible potencial de lixiviación de minerales para la recuperación de metales de interés.

Palabras clave: Fisiología, Lixiviación, Quimiolitautótrofo

ABSTRACT

The chemolithoautotrophic microorganisms have been studied in order to understand their metabolism and their capacity to recover metals such as gold, silver, copper, nickel, among others that are found in rocky deposits. The physiological characterization of two bacterial strains quimiolitautotrophs (LR1 and LR2) isolated from tailings, indicates that they have the ability to obtain their electron source of iron. Oxidation of the iron during the growth of the strains was carried out with the fenanthroline technique and following the oxidation-reduction potential. The strains showed an oxidation of 21% of the iron, when they

are grown in WAYE medium at pH 2.5 in aerobic condition. The phylogenetic characterization of the strains indicated that they belong to the Class β -Proteobacteria, so that the strains could present a heterotrophic and autotrophic metabolism. Therefore, both strains were cultivated under different organic carbon sources, but growing was not observed in strains, so a possible strict quimiolitautotrophic metabolism was revealed. In conclusion, the LR1 and LR2 strains are acidophilic chemolithoautotrophic gram-positive bacilli with potential mineral leaching potential for the recovery of metals of interest.

Keywords: Physiology, Leaching, Chemolitautotrophic

INTRODUCCIÓN

La capacidad que tienen algunas bacterias para oxidar metales está dada por su condición quimiotrofa, es decir, la

obtención de su fuente de energía es a partir de compuestos inorgánicos, por lo tanto, ellas crecen a expensas de la liberación y obtención de electrones mediante la oxidación de minerales. Estas pueden llegar a ser formadoras de esporas y gram positivas como en el caso del género *Sulfobacillus*, que son bacterias acidófilas que obtienen energía mediante la oxidación hierro o azufre elemental de minerales. Una de las principales características de estas bacterias es que generalmente son autótrofas, aeróbicas y quimiosintéticas. Su capacidad autótrofa les permite sintetizar sus componentes celulares a partir de compuestos inorgánicos, como la fijación del CO₂ de la atmósfera [6]. Otro ejemplo es *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que puede oxidar iones ferrosos, azufre elemental, tiosulfatos y es considerada una de las principales bacterias más ampliamente investigada hasta la fecha [4]. Sin embargo, es

necesario conocer su fisiología ya que en el caso de algunas bacterias quimiolitóautótrofas que utilizan As (III) como un donador de electrones y obtienen la energía de la oxidación de éste, caen dentro de dos subdivisiones de Proteobacteria. Es decir, que las bacterias oxidantes de arsenito quimiolitótrofas pertenecen a la subdivisión α -Proteobacteria, mientras que las bacterias oxidantes de arsenito heterótrofas están dentro de la división β -Proteobacteria. En este trabajo se evaluó el metabolismo de cepas aisladas de jales (LR1 y LR2) y se determinó la fisiología quimiolitóautótrofa estricta de estas bacterias. Las cepas fueron caracterizadas en su filogenética en base al gen 16S rRNA, la relación filogenética las ubicó dentro de la Clase β -Proteobacteria, por lo que las cepas podrían presentar un metabolismo heterótrofo y autótrofo y se hizo necesario evaluar las características

fisiológicas de estas cepas bacterianas quimiolitotrofas acidófilas.

METODOLOGÍA

Las cepas LR1 y LR2 fueron aisladas de lodos residuales de una mina situada en la región minera de Bolañitos, Guanajuato, y caracterizadas filogenéticamente a través del gen ribosomal 16S rRNA [8]

Medio de cultivo. El medio WAYE fue utilizado para el mantenimiento y evaluación metabólica de las cepas bacterianas. Composición del medio (g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.4, K_2HPO_4 : 0.5, KCl: 0.1, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$: 0.01 y extracto de levadura: 0.2. Se ajustó el pH a 2.5 con H_2SO_4 concentrado y se esteriliza en autoclave a 121°C a 15 lb por 15 min. Una vez estéril se añadieron 10g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Los cultivos bacterianos fueron realizados en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250

mL de medio y se inoculó con el 10% del volumen. Todos los cultivos se realizaron por triplicado, los cultivos fueron incubados a 37°C a 130 rpm. Por otro lado, se realizaron cultivos en medio WAYE suplementado con 4 g /L de mineral triturado que equivale a 2.52 mg/L de hierro, bajo las mismas condiciones. inoculó. El crecimiento microbiano se siguió mediante la oxidación del Fe^{2+} , potencial oxido-reducción y pH.

La cuantificación de Fe^{2+} , se realizó mediante la técnica de fenantrolina modificada. En un tubo de ensaye se colocan 2 mL de fenantrolina, 1 mL de acetato de amonio y 1 mL de muestra se mezclan y se deja reposar durante 5 min, después se mide la absorbancia a 595 nm. Las lecturas obtenidas se compararon contra una curva patrón de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. El potencial oxido-reducción y pH se

medieron con el equipo HI pH/ORP meter de HANNA Instruments. Los datos obtenidos en cada experimento fueron graficados.

Fuentes de carbono orgánicas. Las cepas LR1 y LR2 fueron inoculadas en 120 mL de medio basal WAYE suplementado con diferentes fuentes de carbono a una concentración final de 5 mM. Los sustratos fueron dextrosa, sacarosa, ácido pirúvico, succinato de sodio, acetato de cadmio, metanol, etanol e isopropanol. Los cultivos fueron incubados a 37°C a 130 rpm, una vez observado un cambio en la turbiedad del medio, se tomaron 6 mL de cultivo y se inocularon en 120 mL de medio fresco, manteniendo la fuente de carbono, esto fue repetido una vez más. El crecimiento bacteriano se siguió a través de la absorbancia a 620 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados indican que las cepas LR1 y LR2 son capaces de crecer en presencia de hierro oxidándolo a ion férrico en ausencia de fuentes de carbono orgánicas y pH 2.5. Lo que indica que presentan un metabolismo quimiolitotrófico, y por su capacidad de crecer bajo un pH ácido se clasifican como bacterias acidófilas extremas, tal y como se presenta en las **Figuras 1 y 2**.

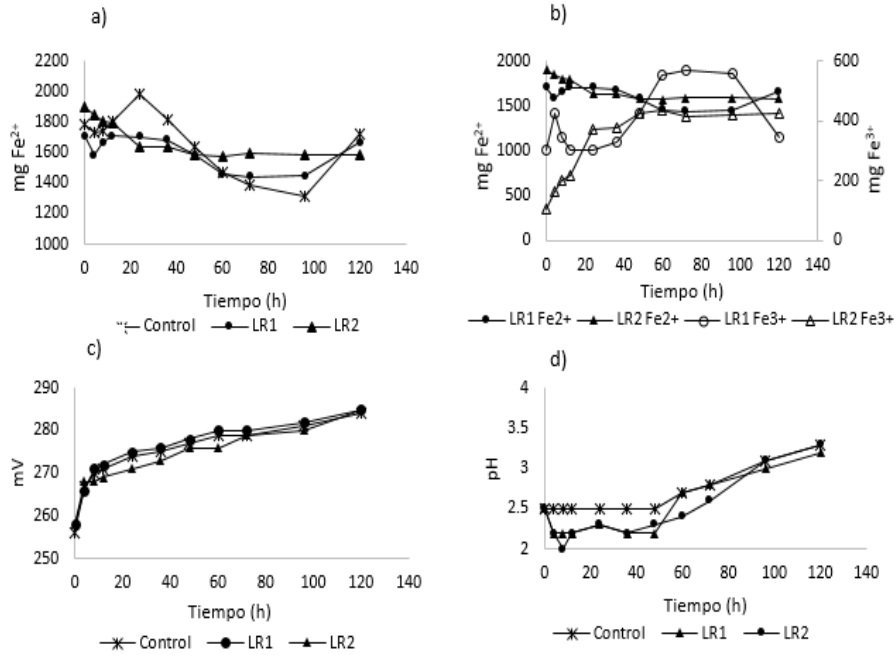


Figura. 1. Oxidación de hierro de los cultivos en medio WAYE. a) Oxidación Fe²⁺ b) balance de Fe²⁺ y Fe³⁺ c) Potencial Redox d) Seguimiento de pH

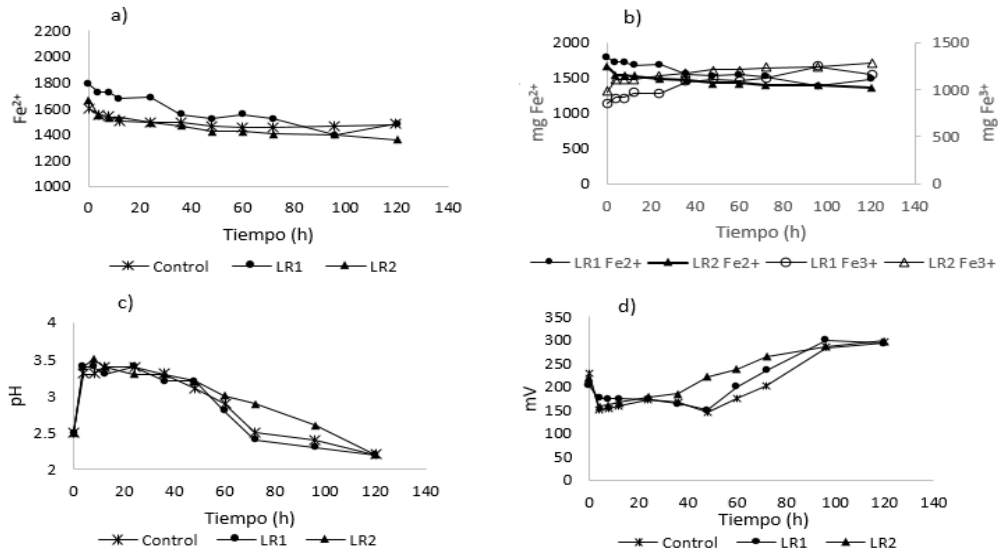


Figura. 2. Oxidación de hierro de los cultivos en medio WAYE con mineral. a) Oxidación Fe²⁺ b) balance de Fe²⁺ y Fe³⁺ c) Potencial Redox d) Seguimiento de pH

Su capacidad de crecer en presencia de mineral bajo condiciones quimilitoautótrofas, muestra que ambas cepas podrían tener un potencial en

procesos de lixiviación debido a las condiciones de crecimiento que requieren, un porcentaje de oxidación de hierro como se muestra en la **Figura. 3**

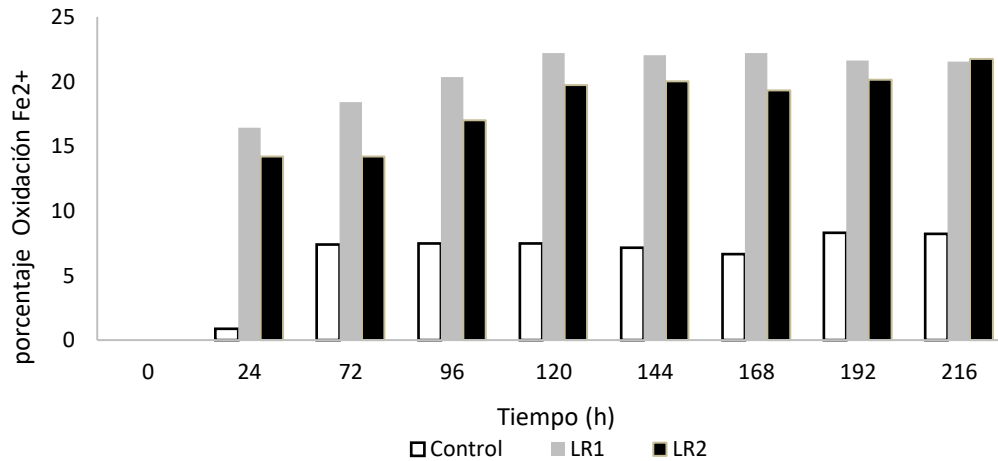


Figura. 3. Porcentaje de Oxidación de hierro de los cultivos en medio WAYE

Por otra parte, la ausencia de crecimiento de las cepas LR1 y LR2 en fuentes de carbono orgánicas, indicó que no capaces de seguir un metabolismo heterótrofo sólo autótrofo y bajo una fuente inorgánica de electrones como el hierro. Este resultado va en contra de su posición filogenética, ya que la mayoría de las especies de clase β -Proteobacterias exhiben un metabolismo

heterótrofo y algunas especies son también autótrofas, es decir presentan un metabolismo facultativo. Sin embargo, las cepas fueron cercanas a una nueva bacteria quimilitoautótrofa *Arsenite Oxidizing*, pero esta nueva especie está clasificada dentro de las alfa-Proteobacterias, y presenta condiciones diferentes de crecimiento, por ejemplo, utiliza al arsenito como fuente de

electrones y crece a un pH neutro, es gram negativa, mientras que las cepas LR1 y LR2 crecen a pH ácido y son gram positivas. Este hecho, indica que se debe profundizar más en la caracterización de

las cepas tanto a nivel genético y fisiológico, ya que este tipo de bacterias tienen gran importancia en procesos de lixiviación y tratamiento de sitios contaminados por metales.

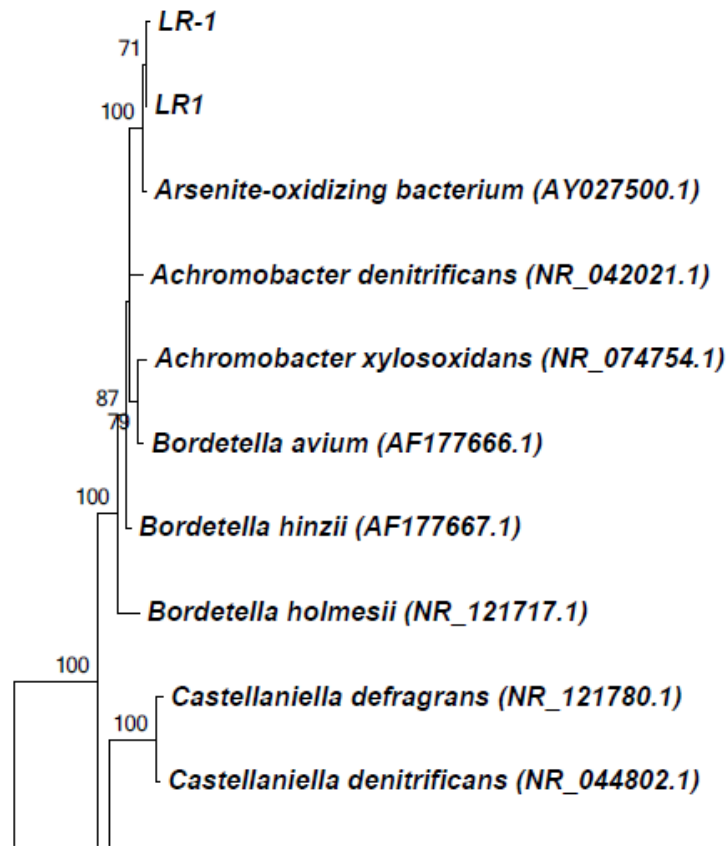


Figura. 4. Árbol filogenético para el gen 16S rDNA de las cepas LR1 y LR2. Se tomó un grupo externo Nanoarchaeum equitanses, y secuencias relacionadas a los miembros del orden β -Proteobacteria, utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia. Los números que anteceden a un nodo representan el porcentaje de frecuencia con la que se repite el árbol en 500 remuestreos. La escala de la barra indica el número de nucleótidos sustituidos. La figura fue tomada de Hidalgo-Rosas (2015).

CONCLUSIONES

Las cepas LR1 y LR2 obtienen su fuente de energía del ion ferroso para sostener su crecimiento, y presentan un metabolismo del carbono autótrofo debido a que no fueron capaces de crecer en fuentes de carbono orgánicas bajo las condiciones probadas en este trabajo. Además, su capacidad de crecer en presencia de mineral a pH ácido indica que podría ser evaluada como un posible agente de lixiviación en la obtención de metales presentes en los minerales.

REFERENCIAS

- [1] Dheeraj-Kanaparthi, Bianca Pommerenke, Peter-Casper, Marc G Dumont. (2013) Chemolithotrophic nitrate-dependent FE (II)oxidizing nature of actinobacterial subdivision lineage TM3 The ISME Journal 7, 1582–1594.
- [2] David-Ospina Juan, Mejía Restrepo Erica, Osorno-Bedoya Laura, (2012) Biooxidation of arsenopyrite concentrates by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in shake flasks Colomb.Bioctenol 14 135-145.
- [3] Yi-Liu Huaqun., Yin, Weimin-Zeng Yili., Liang, Yao-Liu Ngom., Baba, Guanzhou-Qiu Li., Shen, Xian-Fu Xueduan., Liu. (2011). The effect of the introduction of exogenous strain *Acidithiobacillus thiooxidans* A01 on functional gene expression, structure and function of indigenous consortium during pyrite bioleaching *Bioresource technology*, 102(17), 8092-8098.
- [4] Jin-lan Xia, An-an Peng, Huan He, Yu Yang, Xue-duan Liu, Guanzhou Qiu.
- [2007]. A new strain *Acidithiobacillus albertensis* BY-05 for bioleaching of metal sulfides ores. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 17(1), 168-175.
- [5] Xuecheng-Zhenga, Dongwei Li (2016). Interaction of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Rhizobium phaseoli* and *Rhodotorula* sp. in bioleaching process based on Lotka–Volterra model. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 90-97
- [6] Lagos-C, Guzmán X. (2009). Biolixiviación: Desarrollo actual y sus expectativas. Comisión Chilena del Cobre (CHOCILCO). Pág. 1-39.
- [7] Nuñez-Ramirez D., M, Solis-Soto Aquiles, Lopez-Miranda Javier, Pereyra-Alferez Benito, Rutiaga-Quiñones Miriam, Medina-Torres Luis, Medrano-Rodán Hiram

(2011) Zinc Bioleaching from an iron concentrate using *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain from Hercules Mine of Coahuila México. International Journal of Minerals, Metallurgy and Materials

- [8] Hidalgo-Rosas Y., (2015) Aislamiento e identificación molecular de bacterias quimiolitótrofos asociadas a la movilización de metales. Tesis de Maestría