

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA

“Alberto Cazorla Talleri”



**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LOS CULTIVOS
MIXTOS DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS LIBRES E
INMOVILIZADOS EN PERLAS DE GEL DE ALGINATO DE CALCIO
DE DISMINUIR IONES DE HIERRO EN SOLUCIÓN**

SARA LIZ PACHECO HUERTA

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA
EN BIOLOGÍA**

LIMA – PERÚ

2020

ASESOR DE TESIS

Dr. Jasmin Hurtado Custodio de Berastain

DEDICATORIA

Para mis excelentes padres, quienes estuvieron conmigo en todo el proceso del presente trabajo. Estas personas me brindaron apoyo, consuelo, y más que nada, demostraron tolerancia en varios aspectos desde el inicio de la realización de este trabajo. Sin ellos no hubiera podido seguir adelante y superar los obstáculos que se presentaban, pues en todo momento me incentivaban con sus consejos y actos a no rendirme jamás. Mi admiración y agradecimientos para con ellos serán eternos y poco es esta dedicatoria para estas personas tan nobles, ejemplares y maravillosas. Asimismo, quisiera también dedicar este trabajo a dos personas que se encuentran en el cielo: tío Juve y mama Rosa, ellos fueron parte de otros éxitos profesionales pero que esta vez no pudieron acompañarme, sintiendo altamente su ausencia. Sé que siempre están conmigo y que desde arriba me observan con orgullo y felicidad por todo lo logrado. Jamás dejaran de estar presentes en los éxitos personales y profesionales de mi vida, se los prometo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Dios y a San Judas Tadeo, por su bendición, iluminación y fortaleza en los momentos difíciles, permitiéndome salir adelante frente a cualquier adversidad.

A mis padres, personas increíblemente maravillosas, por estar a mi lado durante todo momento y ayudarme a salir adelante cuando las cosas se volvían difíciles. Mi padre, el hombre más admirable, ejemplar e inteligente que puede haber, por compartir sus conocimientos y ayudarme con estos en la elaboración de presente trabajo, enseñándome a no rendirme mediante sus palabras: todo esfuerzo vale la pena. Mi madre, la mujer más noble, tolerante y comprensible del mundo, por sus consejos, apoyo y cuidados durante este proceso, no dejándome caer y brindándome su mano en cualquier momento para lograr mis objetivos a pesar de las dificultades. Nunca me cansare de agradecerles por todo lo brindado a nivel profesional y personal, ya que estoy donde estoy por el esfuerzo de ellos. Padres míos, los amo con todo mi corazón y no me alcanzara la vida para regresarles todo lo que me han dado.

A una persona muy especial en mi vida, considerado mi ángel, mi amigo, mi guía, mi consejero, mi todo, quien me ha motivado a cumplir este objetivo y me ha enseñado a que todo puede volverse realidad si lo haces de corazón e invirtiendo todas las ganas. Su apoyo y tolerancia ha sido ejemplo de admiración, ya que en todo momento, inclusive sin pedírselo, estuvo acompañándome en este arduo camino. Asimismo, por sus palabras dichas día a día que me permitieron tener seguridad y no dejarme dudar de nada: todo va a estar bien, ten confianza, tú puedes lograrlo. Siempre estarás en mi corazón y doy gracias por haberte conocido y ser parte de todo esto.

A mi asesora, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y aprender cada vez más de ella, personal y profesionalmente. Su orientación y conocimientos han sido la base de concluir muchos propósitos profesionales. Además de su paciencia y comprensión en situaciones complicadas en varios aspectos de mi vida. Por todo esto, la considero una gran mentora y una segunda madre, y le agradezco por todas las oportunidades ofrecidas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	OBJETIVOS	18
	2.1. Objetivo general	18
	2.2. Objetivos específicos	18
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	3.1. Flujograma	19
	3.2. Muestras	20
	3.3. Lugar de ejecución	21
	3.4. Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	21
	3.5. Caracterización e identificación de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	21
	A. Caracterización morfológica	22
	A.1. Caracterización macroscópica	22
	A.1.1. Cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	22
	A.1.2. Cultivos puros de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	22
	A.2. Caracterización microscópica	23
	A.2.1. Cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	23

A.2.1.1. Coloración Gram	23
A.2.2. Cultivos puros de Bacterias	
Sulfato Reductoras (BSR)	23
A.2.2.1. Coloración Gram	23
A.2.2.2. Coloración de esporas	24
A.2.2.3. Motilidad	24
B. Caracterización bioquímica	24
B.1. Fermentación de carbohidratos	25
B.2. Consumo de glicerol ($C_3H_8O_3$)	25
B.3. Consumo de ácido fórmico (CH_2O_2)	25
B.4. Consumo de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$)	26
B.5. Presencia de desulfoviridina	26
3.6. Estandarización del método de determinación de hierro (Fe) en Solución	27
3.7. Elaboración de las perlas de gel de alginato calcio ($((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$)	28
3.8. Inmovilización de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) en perlas de gel de alginato de calcio ($((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$)	30
3.9. Determinación de la capacidad de las perlas de gel de alginato calcio ($((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$), cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) libres y cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) inmovilizadas de disminuir iones de hierro (Fe) en solución	31

A. Tratamiento previo de las muestras	31
B. Fórmula de la titulación con dicromato de potasio	31
C. Controles	31
D. Determinación de la capacidad de las perlas de gel de alginato de calcio ((C ₁₂ H ₁₄ O ₁₂ Ca) _n) de disminuir iones de hierro (Fe) en solución	32
E. Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) libres de disminuir iones de hierro (Fe) en solución	33
F. Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) inmovilizadas en perlas de gel de alginato de calcio ((C ₁₂ H ₁₄ O ₁₂ Ca) _n) de disminuir iones de hierro (Fe)	34
G. Análisis comparativo de la disminución de iones de hierro (Fe) en solución entre los cultivos mixtos de BSR libres e inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ((C ₁₂ H ₁₄ O ₁₂ Ca) _n)	35
3.10. Análisis estadístico	35
3.11. Conservación de los cultivos mixto de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	36
IV. RESULTADOS	37
4.1. Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	37
4.2. Caracterización e identificación de los cultivos mixtos de las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)	37
4.3. Estandarización del método de determinación de hierro (Fe) en solución	42
4.4. Elaboración de las perlas de gel de alginato de calcio ((C ₁₂ H ₁₄ O ₁₂ Ca) _n)	43

4.5. Inmovilización de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) en perlas de gel de alginato de calcio ((C ₁₂ H ₁₄ O ₁₂ Ca) _n)	43
4.6. Determinación de la capacidad de las perlas de gel de alginato de calcio ((C ₁₂ H ₁₄ O ₁₂ Ca) _n) de disminuir iones de hierro (Fe) en Solución	44
4.7. Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) libres de disminuir iones de hierro (Fe) en solución	45
4.8. Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ((C ₁₂ H ₁₄ O ₁₂ Ca) _n) de disminuir iones de hierro (Fe) en solución	46
4.9. Análisis comparativo de resultados	48
V. DISCUSIÓN	49
VI. CONCLUSIONES	60
VII. RECOMENDACIONES	61
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMEN

La contaminación por metales pesados está muy extendida en diversos ambientes y se desarrollan diversas alternativas para remediarla. Entre estas se considera el uso de microorganismos, dentro de los cuales se encuentran las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR). Las BSR realizan la reducción, de manera desasimilatoria, del sulfato y la producción del sulfuro de hidrógeno, siendo este último el que reacciona con los metales para formar sulfuro metálico que, por su naturaleza insoluble, precipita, permitiendo así que los metales sean removidos fácil y rápidamente. El propósito del presente estudio fue determinar la capacidad de los cultivos mixtos de BSR libres e inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio de disminuir iones de hierro en solución. Se emplearon 3 muestras de suelos, de los cuales se seleccionaron 11 cultivos mixtos de BSR. En los 11 cultivos se determinó la presencia de 8 especies: *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfotomaculum* spp., *Desulfovibrio sapovorans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas* y *Desulfovibrio baculatus*. Los cultivos mixtos de BSR libres permitieron una disminución máxima de hierro en solución de 60.8%, mientras que los cultivos inmovilizados obtuvieron un 94.4%. Estos resultados determinaron la buena capacidad que presentan los cultivos mixtos libres e inmovilizados; no obstante, el empleo de BSR inmovilizadas destaca e indica, a la vez, que este estado es la mejor alternativa en los procesos de biorremediación de hierro en solución, ya que ejerce un potencial efecto sobre este ion.

Palabras Claves: Hierro, BSR libres, BSR inmovilizadas, Alginato de calcio, Cultivos mixtos.

ABSTRACT

Heavy metal contamination is widespread in various environments and various alternatives are developed to remedy it. Among these is considered the use of microorganisms, among which are the Sulfate Reducing Bacteria (SRB). The SRB perform the reduction, in an assimilatory way, of the sulfate and the production of the hydrogen sulphide, the latter being the one that reacts with the metals to form metallic sulphide that, due to its insoluble nature, precipitates, thus allowing the metals to be quickly and easily removed. The purpose of the present study was to determine the ability of mixed cultures of free and immobilized SRB on calcium alginate gel beads to decrease iron ions in solution. 3 soil samples were used, from which 11 mixed SRB cultures were selected. The presence of 8 species was determined in the 11 mixed cultures: *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfotomaculum* spp., *Desulfovibrio sapovorans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas* and *Desulfovibrio baculatus*. The mixed cultures of free SRB allowed a maximum decrease in iron in solution of 60.8%, while the immobilized cultures obtained 94.4%. These results determined the good capacity of free and immobilized mixed cultures; however, the use of immobilized SRB stands out and indicates, at the same time, that this state is the best alternative in the bioremediation processes of iron in solution, since it exerts a potential effect on this ion.

Keywords: Iron, Free SRB, Immobilized SRB, Calcium alginate, Mixed cultures.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el medio ambiente se encuentra afectado por varios contaminantes que alteran el equilibrio de los ecosistemas. Entre estos contaminantes, la contaminación por metales pesados es un problema de interés significativo a nivel mundial, ya que perjudica en alto grado a los seres bióticos y abióticos de los ecosistemas.

Existen varias maneras de definir el término “metal pesado”, una de ellas es referida al número atómico, es decir, los metales pesados son aquellos que presentan un número atómico mayor a 20 (excluidos alcalinos y alcalinotérreos), mientras que otra hace referencia a los metales de densidad mayor a 5 g/cm³ (1). De manera estricta, y a partir del enfoque químico, se menciona que los metales pesados están compuestos, principalmente, por los metales de transición, algunos metaloides, lantánidos e actínidos (1).

Los metales pesados, según el punto de vista biológico, se dividen en 2 grupos: los micronutrientes u oligoelementos y los metales pesados sin función biológica conocida. Los micronutrientes u oligoelementos son utilizados por los organismos en pequeñas cantidades para poder desarrollar algunas actividades metabólicas, por ejemplo: zinc (Zn), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), etc.; mientras que los metales pesados sin función biológica conocida, como su mismo nombre lo dice, son aquellos que no ejercen función biológica alguna como el bario (Ba), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), etc. (1).

Los metales pesados están presentes en la corteza terrestre como elementos naturales a bajas concentraciones, y se encuentran en estado libre y de forma natural en algunos ecosistemas; no obstante, pueden variar sus concentraciones y convertirse en tóxicos para los organismos y su entorno, representando así un serio problema medio ambiental denominado contaminación ambiental por metales pesados (1).

La contaminación ambiental por metales pesados tiene 2 diferentes orígenes: contaminación de origen natural y de origen antropogénico. La contaminación de origen

natural consiste en la emisión de metales al ambiente a través de las actividades volcánicas, erosión de rocas, etc.; mientras que la de origen antropogénico ocurre por las industrias mineras, vertidos industriales, actividades agrícolas, entre otras (1).

La causa principal de esta emisión es atribuida a las actividades antropogénicas, ya que ocasionan la eliminación descuidada e imprudente de los metales pesados al medio ambiente. La más importante entre ellas son las industrias mineras (2), pues producen elevados niveles de contaminación por el empleo excesivo e inadecuado de una gran variedad de productos químicos destinados a la explotación y extracción de numerosos recursos (plata, oro, cobre, etc.); además, por la producción de drenajes ácidos mineros (DAM), erosión de escombreras y depósitos de colas de explotaciones (3).

Los metales pesados, una vez liberados al ambiente, son abandonados como material de desecho y algunos de ellos se movilizan por medio de masas de agua y/o de viento, provocando la contaminación de los sistemas de agua, suelo y aire (1). En el caso de la contaminación del agua, los ríos se ven afectados por el continuo desemboque de las aguas residuales no tratadas, procedentes de diversos procesos antropogénicos; mientras que las aguas subterráneas se encuentran contaminadas por residuos industriales y los mares por el desboque de los desagües que contienen aguas ácidas provenientes de la lixiviación de metales pesados; además, los metales se encuentran formando parte de los sedimentos en suspensión de las aguas de los arroyos y ríos, pudiendo llegar así hasta las aguas subterráneas (1). Por otro lado, con respecto al suelo, la incorporación de metales pesados en este sistema provoca la infertilidad y polución del mismo (1). En el suelo, los metales pesados pueden seguir 4 rutas diferentes, que a su vez originan otras formas de contaminación (1):

- a) Pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución del suelo o fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación.
- b) Pueden ser absorbidos por las plantas e incorporarse a las cadenas tróficas.
- c) Pueden pasar a la atmósfera por volatilización.
- d) Pueden movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas.

La importancia de la presencia de los metales pesados en el medio ambiente, es que a diferencia de los agentes contaminantes orgánicos, estos poseen una principal y distintiva característica: no son biodegradables. Esta característica confiere a los metales pesados su potente poder contaminante, ya que le permite permanecer en el ambiente por largos periodos de tiempo, acumulándose y dispersándose sin ningún inconveniente por una gran diversidad de ecosistemas (1).

La toxicidad, a nivel químico, que provocan los metales pesados se debe principalmente a la capacidad de estos para adherirse a las moléculas orgánicas (1). Esta toxicidad en los organismos vivos, de manera específica, depende de las reacciones de los metales con los ligandos, que ocurren por interacción con sus grupos funcionales (sulfhidrilo, fosfato, carboxilo, hidroxilo y radicales amino), pues los metales presentan gran afinidad por ellos (1). Los ligandos se encuentran en grandes cantidades en las células, ya sea como moléculas individuales o integrando moléculas complejas, y son piezas fundamentales para la incorporación y bioacumulación de los metales pesados (1).

El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula. Estos efectos perjudiciales son (4): 1) modificación de la conformación activa de las biomoléculas, por ejemplo el mercurio reacciona con las uniones disulfuro, afectando la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, y la inserción de este metal extiende la longitud normal de la unión disulfuro en 0.3 nm aproximadamente, lo que en algunos casos es suficiente para reducir la actividad biológica de la proteína blanco; 2) desplazamiento de iones metálicos esenciales en biomoléculas, uno de los mejores ejemplos es la inhibición por plomo de ácido δ -aminolevulínico dehidratasa (ALAD) en vertebrados, donde el zinc es desplazado por dicho metal así como la alteración en la composición y conformación de los eritrocitos en *Bufo arenarum* expuesto a iones plomo; 3) bloqueo de grupos funcionales de las biomoléculas, como es el caso del complejo piruvato dehidrogenasa, que es inhibido por el arsénico debido a su reacción con dos grupos sulfhidrilos del ácido dihidrolipoico (cofactor esencial); y 4) la inducción del estrés oxidativo por la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) o por alteración del mecanismo de defensa antioxidante.

Las manifestaciones fisiológicas procedentes de las uniones ligando-metal pueden ser diferentes y dependientes de cada metal. Todos los metales pesados actúan y generan efectos fisiológicos considerables, cada uno de diferente manera, permitiendo su distinción entre ellos. Con respecto al hierro (Fe), este elemento químico, liberado al medio por eliminación de desechos mineros y fabricación de hierro y acero, provoca situaciones patológicas como inflamación crónica, repercusión isquémica causada por una lesión o neurodegeneración y, en general, enfermedades cardiovasculares y hemocromatosis (5). La contaminación y toxicidad provocada por el hierro ha sido indicada en varias investigaciones (6). El hierro es mencionado pues es considerado como tóxico según US Environmental Protection Agency (EPA); sin embargo, también se encuentran otros metales como el mercurio (Hg), el plomo (Pb), el cadmio (Cd), el cromo (Cr), el arsénico (As), entre otros (7).

La solución al problema de la contaminación ambiental por metales pesados se ha basado en la búsqueda de estrategias que garanticen la reducción y el control del impacto ambiental, permitiendo así la mejora de los ecosistemas y el retorno de este a su condición natural. Para este propósito se ha encontrado que una de las estrategias es el uso de microorganismos, seres vivos capaces de ejercer un significativo potencial de acción contra los metales pesados y de promover, de esta manera, la limpieza del ambiente y la remediación del mismo (1).

Los microorganismos y los metales pesados dan origen a una relación que ha permitido el desarrollo de una serie de procesos adaptativos, expresándose como mecanismos de resistencia hacia los contaminantes (8). Estos mecanismos confieren a los microorganismos tolerancia y capacidad de contrarrestar la presencia de los metales pesados, que es evidenciado por su crecimiento y desarrollo en ambientes contaminados con dichos metales (8). Los mecanismos de resistencia son: 1) producción de compuestos quelantes de metales como los sideróforos, 2) adsorción de los iones metálicos en la pared celular por interacciones electrostáticas, 3) almacenamiento de metales en el citoplasma mediante su unión a proteínas, 4) precipitación extracelular de metales a través de su reacción con metabolitos y 5) transformación de la especiación química del metal por enzimas microbianas capaces de convertirlo a una forma menos tóxica (1).

Existen números investigaciones sobre una gran cantidad de microorganismos resistentes a los metales pesados y remediadores de diversos ambientes. No obstante, dentro de estos microorganismos se encuentra un grupo catalogado como el más importante para enfrentar este problema, las bacterias. Las bacterias son organismos procariotas unicelulares que han sido reportadas como óptimas biorremediadoras ambientales, entre las cuales se hallan: *Micrococcus* spp. (9), *Staphylococcus* spp. (9), *Neisseria* spp. (9), entre otros.

Dentro del reino bacteria (10), se encuentran las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), microorganismos capaces de interactuar con los metales pesados y consideradas como una alternativa para remediar la contaminación ambiental (11). Las BSR son un grupo especializado de procariotas metabólicamente versátiles y con una fisiología compleja. Estas bacterias son mayormente Gram negativas pero existen géneros que son Gram positivas, además se encuentran acompañadas con una morfología celular ampliamente variada, pudiendo ser bacilos, vibrios, cocos, sigmoides o espirilos, y dependiendo del género, presentar esporas y flagelos como *Desulfotomaculum* (12).

La clasificación taxonómica de las BSR estuvo inicialmente basada en técnicas tradicionales (pruebas morfológicas y fisiológicas) y fue considerada la primera clasificación reportada. No obstante, el empleo de las técnicas tradicionales presentó inconvenientes, pues algunos aislamientos no se encontraban dentro de los patrones establecidos, motivo para catalogar a la primera clasificación como incompleta e inexacta (13). Posteriormente, la clasificación fue mejorada mediante la intervención de técnicas moleculares, sistemas confiables y sofisticados desarrollados con el avance de la ciencia y tecnología. Las técnicas moleculares consisten en el análisis comparativo entre secuencias del ARNr y secuencias de BSR registradas en bases de datos (GenBank, EMBL-EBI y RDP), permitiendo así organizar familias, géneros y especies, y realizar el diseño del árbol filogenético (14). Esta última clasificación ha determinado que las BSR provienen de varias familias y géneros (Tabla 1), organizados en 6 subgrupos filogenéticamente distintos (Figura 1) (14,15).

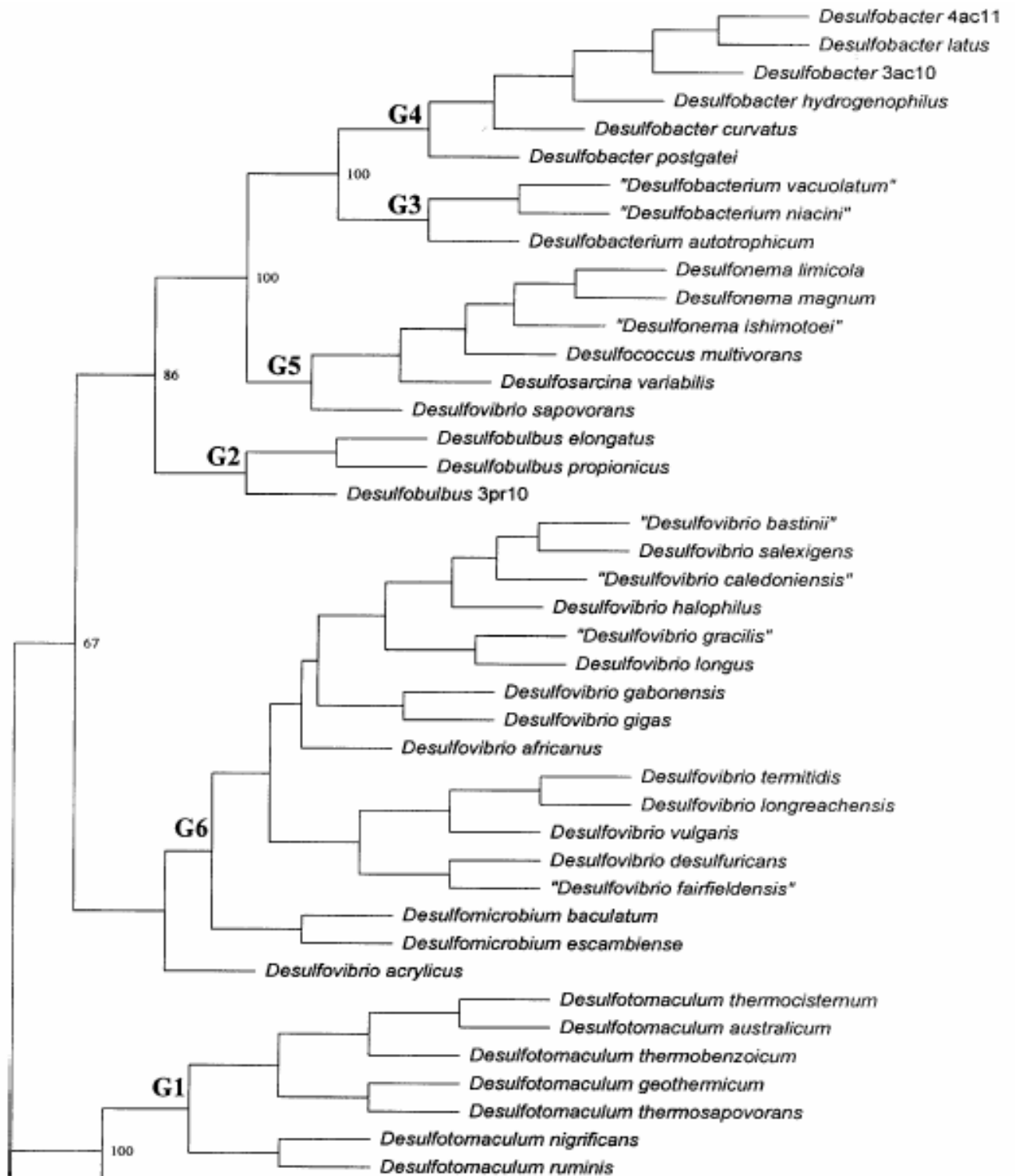


Figura 1: Árbol filogenético de Bacterias Sulfato Reductoras Fuente: Daly et al. (2000) (14)

Tabla 1: Clasificación taxonómica de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR). Fuente: Castro et al. (2000) (13), Daly et al. (2000) (14) y Mormontoy (2011) (15).

Familia	Géneros	SubGrupo
Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfomicrobium</i>	6
Desulfobacteriaceae	<i>Desulfobulbus</i>	2
	<i>Desulfobacter</i>	4
	<i>Desulfobacterium</i>	3
	<i>Desulfococcus</i>	5
	<i>Desulfosarcina</i>	5
	<i>Desulfonema</i>	5
Syntrophaceae	<i>Desulfomonile</i>	5
Peptococcaceae	<i>Desulfotomaculum</i>	1
Thermodesulfobacteriaceae	<i>Thermodesulfobacterium</i>	2
Desulfuromonaceae	<i>Desulforomonas</i>	6
Desulfomonadaceae	<i>Desulfomonas</i>	2
Desulfurellaceae	<i>Desulfurella</i>	6

Las BSR están presentes en ambientes neutros y levemente alcalinos (7-7.8); sin embargo, hay reportes que indican sus hallazgos en ambientes ácidos (pH 2-4) y altamente alcalinos (pH 9-10) (16). El crecimiento de las BSR se realiza a temperaturas entre 25°C y 40°C, es decir, son mesófilas (17). Algunas BSR son anaerobias estrictas y se encuentran en ambientes anóxicos (16), mientras que otras pueden resistir bajas concentraciones de oxígeno por un tiempo limitado, denominándolas bacterias anaerobias aerotolerantes (16), tal es el ejemplo de *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio vulgaris* (18).

Las BSR son aisladas en el laboratorio mediante medios de cultivos selectivos, ya sean medios líquidos y/o sólidos. El medio más empleado para el crecimiento y aislamiento de BSR es el diseñado por J.R. Postgate, quién lo nombró precisamente con su nombre y atribuyó su óptimo rendimiento a la presencia de agentes reductores y compuestos orgánicos, estos últimos empleados como fuente de carbono (16). Los agentes reductores utilizados son el ácido ascórbico y ácido tioglicólico, y los compuestos orgánicos son el lactato, etanol, propanol, glucosa, piruvato, succinato, entre otros; además, pueden desarrollarse en presencia de ácidos grasos de cadenas cortas y largas, y compuestos aromáticos (16,19).

El hábitat de las BSR abarca diversos ambientes acuáticos y terrestres; no obstante, es necesario que estos sean anóxicos por sus condiciones de crecimiento. Los principales hábitats de las BSR son los que presentan alto contenido de sulfatos, por ejemplo los sedimentos marinos o aguas profundas, estuarios, lodos, pantanos, lagos y suelos. Estas bacterias también han sido reportadas en plantas anaerobias de tratamiento, plantas industriales petrolíferas, plantas de drenaje o alcantarillado, residuos de alimentos, contenidos de rumen, digestores ácidos y heces de animales y humanos. La presencia de las BSR en estos ambientes se identifica por el ennegrecimiento del agua y sedimento, esto a consecuencia de la precipitación del sulfuro metálico y del olor a sulfuro de hidrógeno (huevo podrido) (16).

La importancia de las BSR es atribuida a la actividad que realizan, pues de esta depende su empleo en los procesos de biorremediación. Las BSR, como su nombre lo indica, son capaces de reducir el sulfato (SO_4^{2-}) a sulfuro (S), empleando este ion como aceptor final de electrones en la respiración; además, tienen la facultad de usar el azufre elemental u otros oxidados de azufre (sulfito, tiosulfato, etc.) como aceptores de finales de electrones (20). La reducción del sulfato se realiza de manera desasimilatoria, es decir, el sulfuro producido en esta reducción no es incorporado a la biomasa bacteriana, sino todo lo contrario, es excretado; en cambio, en la reducción asimilatoria, el sulfuro es integrado a esta biomasa, convirtiéndose en azufre orgánico en forma de aminoácidos (20). El sulfuro producido y excretado por las BSR reacciona con una gran variedad de metales presentes en ambientes contaminados, provocando la precipitación e inmovilización de los mismos en forma de sulfuro metálico (mecanismo de precipitación extracelular) y permitiendo así, la remoción de los metales y la remediación de dichos ambientes (20).

Desde un punto de vista biológico, la reducción del sulfato a sulfuro por las BSR ocurre en etapas y con la intervención de enzimas. La primera etapa de la reducción es el transporte del sulfato desde afuera hasta dentro de la célula a través de la membrana. La segunda etapa sucede cuando el sulfato es activado por una molécula de ATP. La tercera acontece por participación de la enzima ATP sulfurilasa, que une el ion sulfato con el fosfato del ATP, dando como producto adenosina fosfosulfato (APS). Seguidamente, el sulfato de

APS se reduce a sulfito (SO_3^{2-}) por acción de la enzima APS reductasa, originando la liberación del AMP. Este sulfito es el primer producto de la reducción desasimilatoria del sulfato por parte de las BSR. Por último, el sulfito se reduce a sulfuro, en forma de sulfuro de hidrógeno (H_2S), mediante la enzima sulfito reductasa, siendo excretado y el producto final de la reducción (Figura 2) (21).

La capacidad de las BSR de contrarrestar la presencia de los metales pesados ha sido reportada en diversos trabajos, tal es el caso del hierro (Fe) (22), cobre (Cu) (23), entre otros.

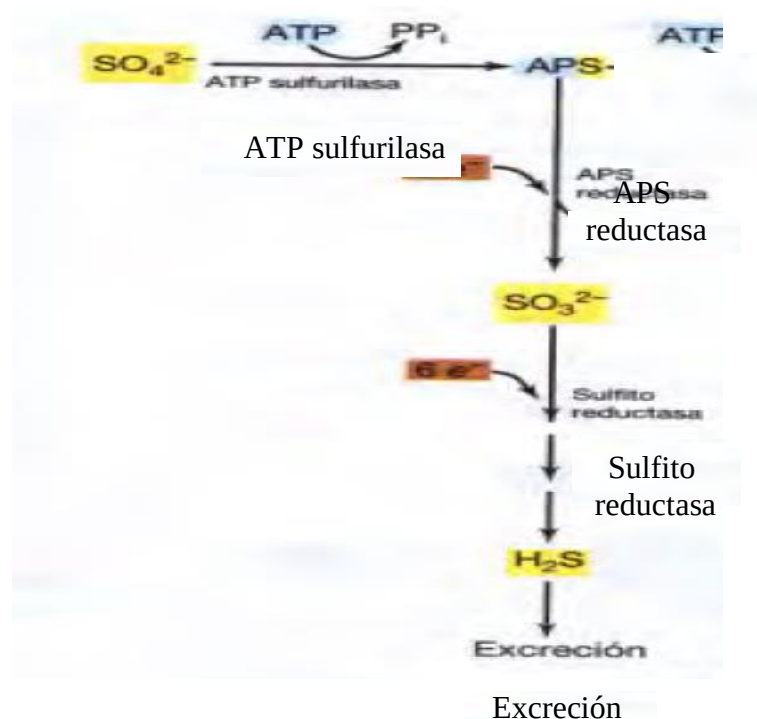


Figura 2: Reducción desasimilatoria de las BSR. Fuente: Madigan et al. (2004) (21).

Todo lo expuesto previamente hace mención a las bacterias en estado libre o en suspensión; sin embargo, en los últimos tiempos, ha surgido otro método considerado eficaz en el campo de la investigación, ya que permite la elaboración de un sistema biológico más eficiente y con la obtención de óptimos resultados, siendo este método la inmovilización bacteriana (24).

La inmovilización bacteriana es definida como el confinamiento físico de bacterias en una región específica del espacio (24). Esta inmovilización se clasifica en dos tipos: pasiva o natural y activa o artificial (24). La inmovilización pasiva o natural ocurre cuando las bacterias naturalmente forman biofilms y crecen en la superficie o dentro del material de soporte por sustancias que ellas mismas segregan, por sus estructuras celulares (cápsula y fimbrias) o por interacciones electrostáticas (24,25). Este tipo de inmovilización comprende las técnicas de adsorción y la colonización de materiales porosos (25). Por otro lado, la inmovilización activa o artificial se refiere al uso de agentes químicos o físicos que inducen dicha inmovilización (25), y en donde se incluyen las técnicas de entrecruzamiento de células entre sí, unión covalente a superficies (ataque o adhesión química) y atrapamiento en geles de polímeros (25).

La técnica de inmovilización bacteriana más empleada, por su fácil manejo y buenos resultados, es el atrapamiento en geles de polímeros (24). El atrapamiento en geles de polímeros consiste en la retención e inmovilización de bacterias dentro de una matriz polimérica, un soporte suficientemente fuerte que evita la difusión de las bacterias en el medio (25). Esta técnica permite la retención e inmovilización de diversas bacterias y microorganismos, e incluso su uso se expande hacia enzimas, organélas (animal o vegetal), microalgas, entre otras, esto a causa de que su acción no se produce por unión directa a la matriz polimérica sino por simple atrapamiento dentro de ella (Figura 3) (25).

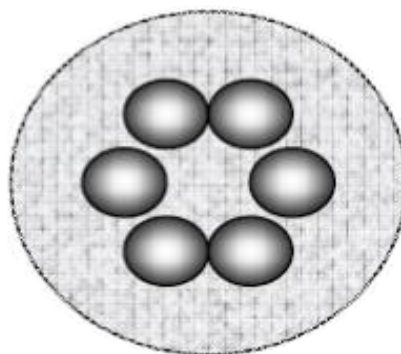


Figura 3: Inmovilización bacteriana por atrapamiento en geles de polímeros. Fuente: Garzón et al. (2008) (24).

La inmovilización por atrapamiento en geles de polímeros se realiza mediante el empleo de diversos materiales. Estos materiales de acuerdo a su origen, se dividen en polímeros naturales y sintéticos. Los polímeros naturales son el alginato, la k-carragenina y el agar, mientras que los polímeros sintéticos más usados son el poliuretano, sol gel, poliacrilonitrilo, poliacrilamida y alcohol polivinílico (25).

Los materiales más utilizados para el atrapamiento bacteriano son los alginatos, pues son considerados los más seguros, efectivos y de mayor accesibilidad (26). Los alginatos son sales del ácido algínico $((C_6H_8O_6)_n)$, que se originan a partir de la unión de este ácido con el sodio $((C_6H_7O_6Na)_n)$, potasio $((C_6H_7O_6K)_n)$, magnesio $((C_6H_7O_6)_2Mg)_n$, calcio $((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$, amonio $((C_6H_7O_6NH_4)_n)$, entre otros (27). El ácido algínico es un polisacárido localizado en la matriz amorfa de la pared celular de las algas pardas marinas (Figura 4), siendo su función principal esquelética, ya que brinda fuerza, elasticidad y flexibilidad al tejido de las algas (27).

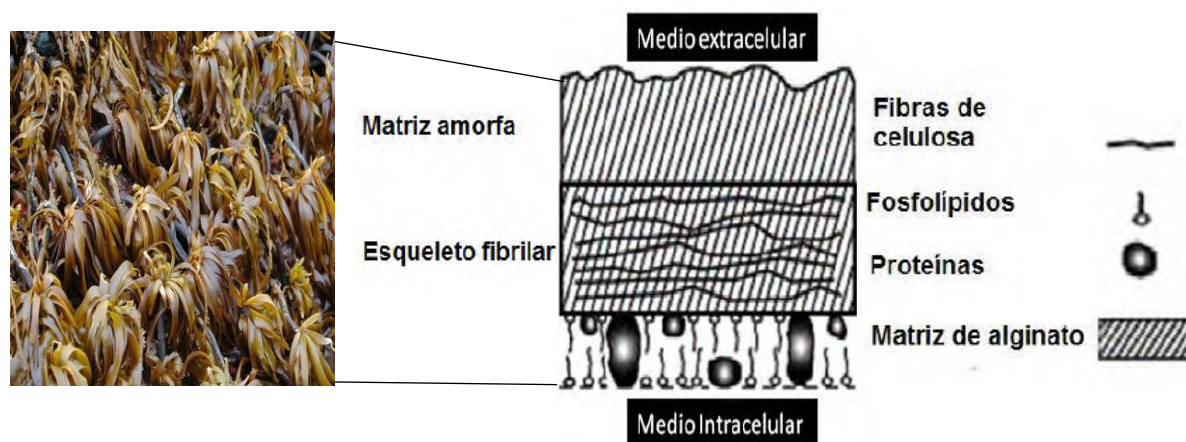


Figura 4: Estructura de la pared celular de las algas pardas marinas. Fuente: Davis et al. (2003) (28).

El ácido algínico ((C₆H₈O₆)_n) es un heteropolímero, que está formado por 2 tipos de de ácidos urónicos: ácido β (1-4) D-manurónico (M) y ácido α (1-4)-L-gulurónico (G) (Figura 5). Los ácido β (1-4) D-manurónico (M) y ácido α (1-4)-L-gulurónico (G) se encuentran en diferentes proporciones y secuencias de acuerdo a la especie de alga marina del que son aislados (27).

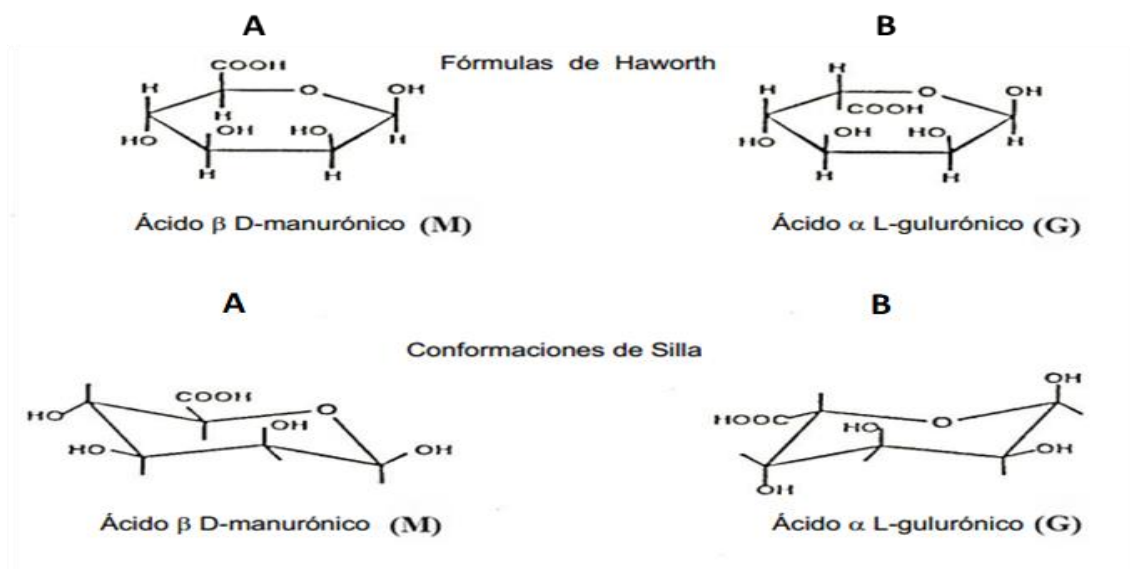


Figura 5: Ácidos urónicos constituyentes el ácido algínico, presentados en las fórmulas de Haworth y conformaciones de silla. A. Ácido β (1-4) D-manurónico (M) y B. Ácido α (1-4)-L-gulurónico (G). Fuente: McHugh (1987) (29).

Los ácidos urónicos (G) en el ácido algínico (Figura 6A) están presentes y organizados en bloques de cadenas de tipo M, G y MG/GM. El bloque M está compuesto por unidades de ácido β (1-4) D manurónico (-MMM-), el bloque G contiene unidades de ácido α (1-4)-L-gulurónico (-GGG-) y el bloque MG/GM se basa en unidades alternadas de ambos ácidos (-MGMG-) (Figura 6B) (28). Las unidades manométricas del bloques M y MG se encuentran unidas por enlaces glucosídicos β (1-4), mientras que las unidades de los bloques G y GM están unidas por enlaces glucosídicos α (1-4) (28). Estos bloques presentan diferentes conformaciones espaciales, donde el bloque M corresponde a cadenas lineales y el bloque G presenta una estructura en forma de bucle (Figura 6C) (28).

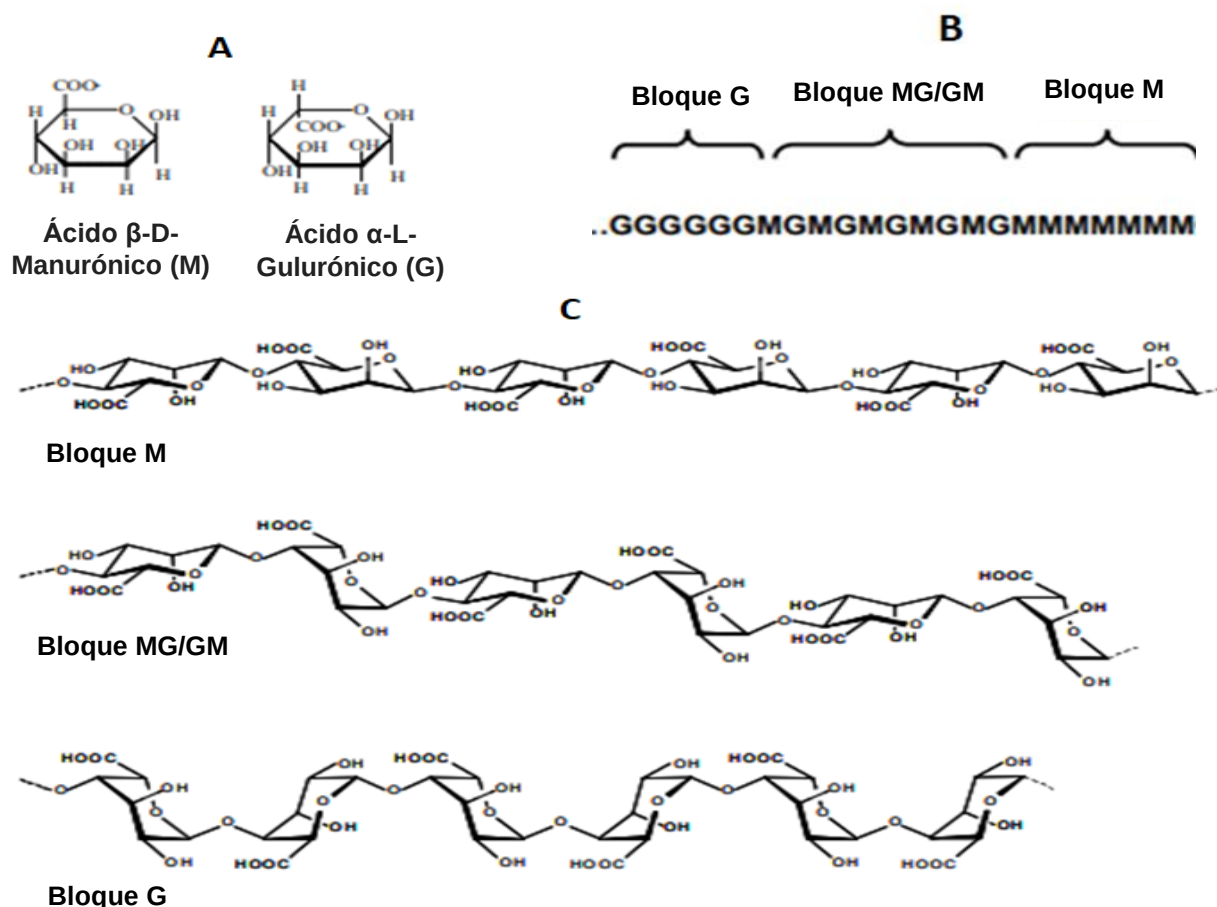


Figura 6: Características estructurales del ácido alginico. A. Estructura química del ácido β (1-4) D-manurónico (M) y ácido α (1-4)-L-gulurónico (G). B. Distribución de los bloques M, G y MG/GM. C. Configuración espacial de los bloques M, G y MG/GM. Fuente: Mørch (2008) (30).

Los alginatos presentan numerosas propiedades funcionales, consideradas de vital importancia en el campo de la biotecnología ambiental e industrial (30). La propiedad funcional principal de este polímero es la formación de geles insolubles (27), que es de gran interés para diversas industrias y áreas de investigación, por su contribución en el desarrollo de nuevos e innovadores procesos biotecnológicos (27,30).

La formación de geles de alginato es un proceso sencillo, que está basado en la participación activa de los cationes multivalentes (Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2} , etc.) y ácido gulurónico

(G). Este proceso consiste en la alineación de dos cadenas de bloques G, que debido a su conformación de bucles, permiten la formación de sitios de coordinación. Los sitios de coordinación son cavidades entre las dos cadenas de bloques G y espacios adecuados para la incorporación de los cationes multivalentes. Estos cationes multivalentes, en los sitios de coordinación, se posicionan y, de manera muy cooperativa, interactúan y coordinan con los bloques G, esto a causa de la presencia de grupos carboxilo, grupos hidroxilo y átomos de oxígeno electromagnéticos en dichos sitios (28). La interacción y coordinación entre los cationes multivalentes y las cadenas de los bloques G permite mantener unidas las estructuras de los alginatos a través de los enlaces que forman entre ellos (31), siendo descrita como modelo de “caja de huevos”, precisamente por su similaridad con la estructura (Figura 7A) (31). La asociación de estos componentes da lugar a cambios conformacionales en la estructura original de los alginatos, permitiendo obtener geles insolubles en forma de una red, conocida como red tridimensional biopolimérica (Figura 7B) (31). Los geles formados son de tipo químico, de gran tensión superficial, no reversibles al calentarlos y de dureza variable según los pesos moleculares de los polisacáridos componentes (32).

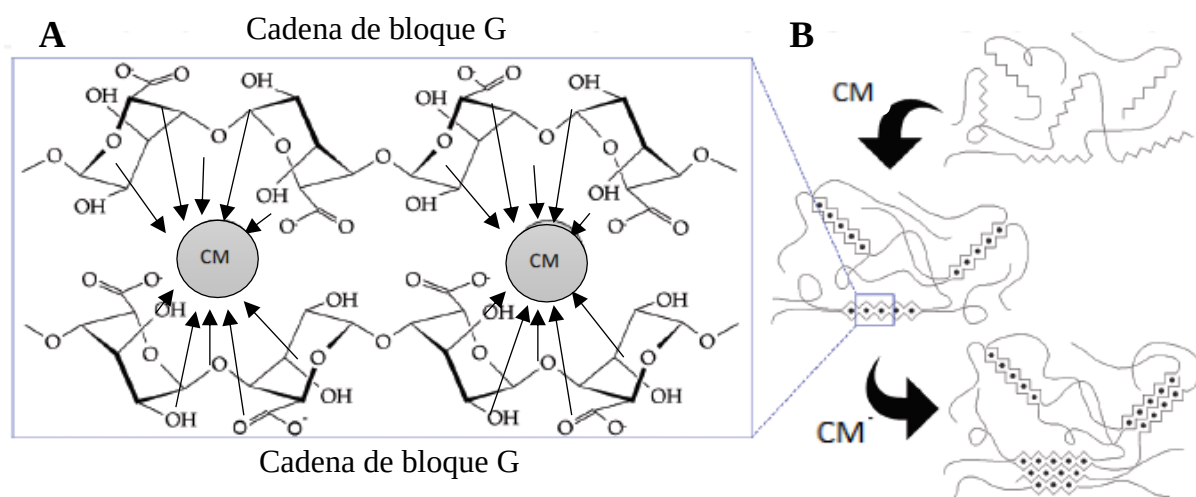


Figura 7: Formación del gel de alginato en presencia de cationes multivalentes (CM) y ácidos gulurónicos (G). A. Modelo de “caja de huevos”, basada en la asociación de los cationes multivalentes (CM) con las cadenas de bloques G a través de las interacciones con los grupos funcionales de los sitios de coordinación formados entre estas dos las cadenas G. B. Asociación lateral de cadenas de los bloques G formando un gel de red tridimensional biopolimérica con el modelo de “caja de huevos”. Fuente: Lopes Da Silva et al. (2017) (31).

La formación de geles se realiza mediante el empleo de diferentes tipos de alginatos. Entre ellos el más usado, por su mayor disponibilidad comercial, es el alginato de sodio, que reacciona con los iones de calcio (Ca^{+2}) por intercambio iónico, para así desplazar al Na en la estructura del alginato e incorporarse en los sitios de coordinación de las cadenas de bloques G, produciendo de esta manera alginato de calcio en forma de gel (32).

El uso del alginato en la inmovilización bacteriana se realiza por medio de dos pasos, siendo el primero la mezcla de bacterias y alginatos, y el segundo el goteo de esta mezcla en una solución con cationes multivalentes (29,30). El procedimiento tiene como resultado 1) la formación de perlas de geles de alginatos (Figura 8A) (31), y 2) el atrapamiento de las bacterias dentro de estas perlas, esto a causa de la estructura de red tridimensional de los geles, ya que retiene e inmoviliza estas bacterias (27). La estructura de la red tridimensional de estos geles presenta porosidades de tamaño más pequeño que el de las bacterias, evitando de este modo la liberación de ellas al medio; no obstante, este tamaño es de suficiente dimensión para el paso de nutrientes y compuestos, que son requeridos para el metabolismo y la actividad de estas bacterias (Figura 8B y 8C) (33). El paso de nutrientes hacia y desde el interior de los geles se encuentra gobernado exclusivamente por el proceso físico de difusión.



Figura 8: Morfología microscópica de geles de alginato. A. Perla de gel de alginato. B. Porosidad de la perla de gel de alginato a menor aumento. C. Porosidad de la perla de gel de alginato a mayor aumento. Fuente: Nadeem et al. (2014) (34).

La aplicación de la inmovilización bacteriana con geles de alginato en los procesos científicos e industriales ha aumentado con el tiempo a causa de las numerosas ventajas que presenta. Estas ventajas son (24,26): 1) separación sencilla de las bacterias del medio donde se encuentra, 2) reutilización bacteriana, 3) ejecución de diferentes funciones por especies bacterianas espacialmente separadas en un reactor, 4) protección bacteriana contra agentes tóxicos, 5) reducción del tiempo del proceso, 6) elevación de la productividad, 7) reducción de los costos de producción y 8) reducción del riesgo de contaminación en el transporte, aplicación y almacenamiento.

La inmovilización bacteriana con geles de alginato es considerada una alternativa biotecnológica en el área ambiental, permitiendo de esta manera dar soluciones y mejoras a los sistemas de tratamiento de agua y suelo contaminados con metales pesados (24,26), pues entre sus funciones destaca el contrarrestar este contaminante (26). La participación de esta inmovilización sobre los metales pesados sucede de dos formas: 1) por la acción de los geles de alginatos y 2) por la actividad biológica de las bacterias. Con respecto a los geles de alginatos, éstos por sí mismos son capaces de ejercer acción sobre los metales pesados, produciendo su remoción y disminución en el medio (28,35). Esta acción de los geles de alginato se basa en los procesos de intercambio iónico, quelación y adsorción física (Figura 9) (35). Por otra parte, con relación a las bacterias, estas realizan sus usuales actividades contra los metales pesados pero con mayor eficiencia por la protección que les confiere el gel de alginato contra la toxicidad del metal.

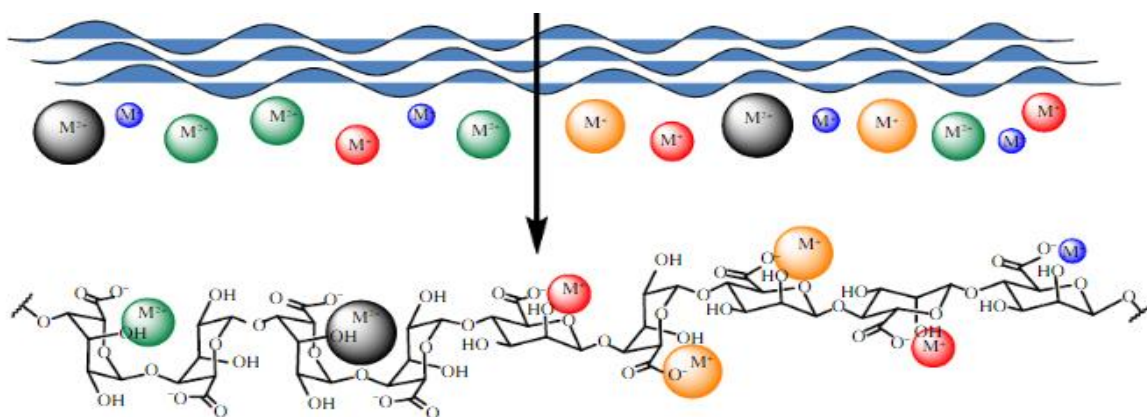


Figura 9: Esquema de captación de iones metálicos (M) por parte de los geles de alginatos. Fuente: Rowbotham et al. (2013) (36).

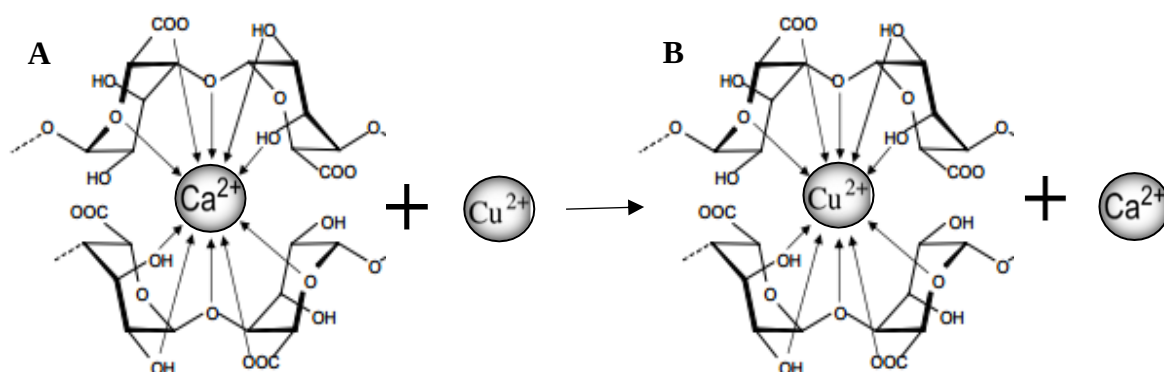


Figura 10: Modelo de intercambio iónico. A. Alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) y metal cobre (Cu) en el medio. B) Incorporación del cobre (Cu) en lugar del calcio (Ca), removiendo el metal presente en el medio. Fuente: Mørch (2008) (30) y Oliveira (2003) (32).

Existen varios estudios que reportan la acción de los geles de alginatos sobre los metales pesados, como es en el caso del cobalto (Co) (Figura 11A) (35), cobre (Cu) (Figura 11B) (32), entre otros. Además, hay estudios referidos a la inmovilización bacteriana en geles de alginatos que contrarrestan la presencia de los metales pesados, entre estos se encuentran *Bacillus subtilis* (37), *Acinetobacter junii* (37), *Escherichia coli* (37), entre otros.

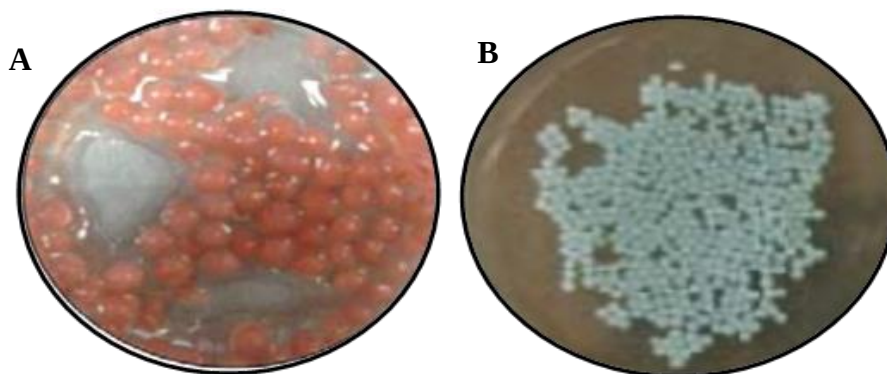


Figura 11: Geles de alginatos en forma de perlas. A. Perlas de geles de alginato de calcio después de la biosorción de cobalto (Co). B. Perlas de geles de alginato de calcio después de la biosorción de cobre (Cu). Fuente: Zhuang et al. (2018) (35) y Oliveira (2003) (32).

II.- OBJETIVOS

2.1. General

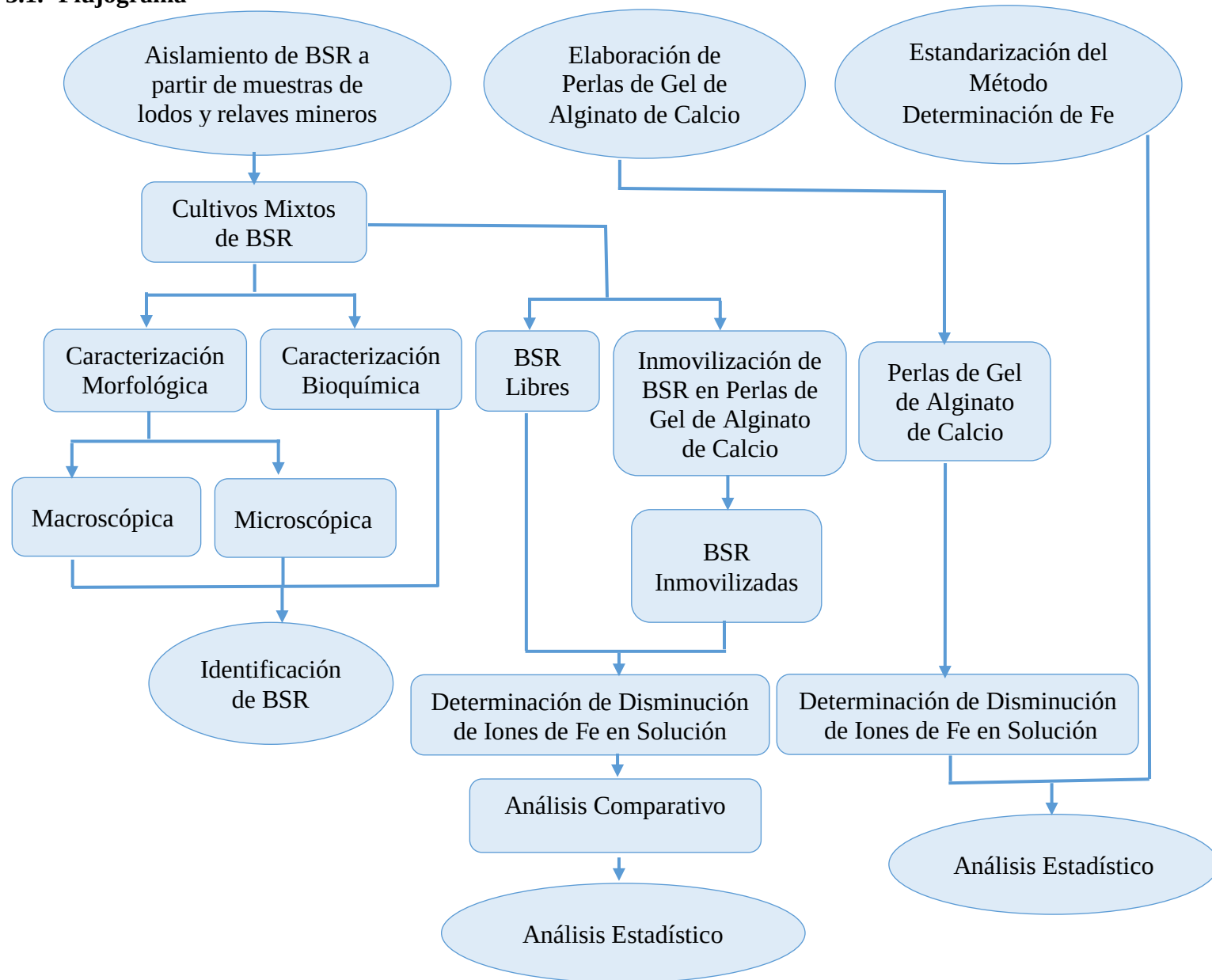
Determinar la capacidad de los cultivos mixtos de bacterias sulfato reductoras (BSR) libres e inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ($(C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n$) de disminuir iones de hierro (Fe) en solución.

2.2 Específicos

- Aislar BSR de relaves mineros y lodos.
- Determinar la capacidad de los cultivos mixtos de BSR libres de disminuir iones de Fe en solución.
- Inmovilizar cultivos mixtos de BSR en perlas de gel de alginato de calcio.
- Determinar la capacidad de los cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio de disminuir iones de Fe en solución.
- Realizar un análisis comparativo de la disminución de iones de Fe en solución entre los cultivos mixtos de BSR libres e inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Flujograma



3.2.- Muestras

Para el presente trabajo, se han empleado 11 muestras frescas de relave minero y lodo, que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, perteneciente al LID (Laboratorio de Investigación y Desarrollo) de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las muestras de relave minero procedieron de Minera Los Quenuales y Compañía Minera Buenaventura; mientras que las muestras de lodo fueron de los Pantanos de Villa, ambientes considerados hábitats de BSR debido al alto contenido de sulfato presente. Las 11 muestras fueron nombradas de acuerdo al lugar del que provinieron (Tabla 2).

Tabla 2: Número y nombre de las muestras de relaves mineros y lodos.

Lugares	N° de Muestras	Nombre de las Muestras
Minera Buenaventura	1	B1
	2	B2
	3	B3
	4	B4
	5	B5
	6	B6
Minera Los Quenuales	1	Q1
	2	Q2
	3	Q3
Pantanos de Villa	1	P1
	2	P2

3.3.- Lugar de ejecución

Este trabajo de investigación fue ejecutado en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental, perteneciente al LID (Laboratorio de Investigación y Desarrollo) de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.4.- Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

El aislamiento de BSR se llevó a cabo mediante la siembra de 1 g de cada una de las 11 muestra en viales con 4.5 ml de caldo Postgate B (Anexo 1), medio de cultivo selectivo para estas bacterias por sus componentes, entre ellos, el hierro (Fe). Los viales fueron llenados al tope para favorecer el ambiente anaeróbico que las bacterias necesitaban. Estos viales se incubaron a 30°C durante 2 semanas en condiciones anaeróbicas: cámaras 2.5 L (jarras) de anaerobiosis con sistemas de generación de anaerobiosis (sobres de anaerobiosis de 2.5 L) (22). El tiempo de incubación indicado es óptimo para estas bacterias, ya que así las BSR alcanzan el crecimiento estacionario, obteniendo a la vez, una nivelación estable entre la concentración de sulfato y la constante tasa de producción de sulfuro según revisión bibliográfica (38). Se sembró por triplicado cada muestra. El desarrollo de las BSR fue evidenciado por el ennegrecimiento del medio y por la precipitación del hierro en forma de sulfuro de hierro (FeS) (22). Para este ensayo se emplearon 2 controles: 1) control medio, que consistió en el medio de cultivo caldo Postgate B completo sin inocular y 2) control muestra/Fe⁻, en el cual el caldo Postgate B no tenía hierro.

3.5.- Caracterización e identificación de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

Con la obtención de los cultivos mixtos de BSR, aislados de cada muestra de relave minero y lodos, se procedió a la caracterización e identificación de las BSR mediante diversos criterios indicados en la Manual de Determinación Bacteriológico de Bergeys (39), The Prokaryotes (40) y Gibson (20), que incluyen caracterización morfológica y bioquímica.

A.- Caracterización morfológica

A.1.- Caracterización macroscópica

A.1.1.- Cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

Los 11 cultivos mixtos de BSR aislados anteriormente (apartado numérico 3.4) fueron sembrados por agotamiento en agar Postgate B (Anexo 1) por duplicado. Las placas de agar Postgate B sembradas fueron incubadas a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas (22). El crecimiento de los cultivos mixtos de BSR en el agar Postgate B fue evidenciado por el ennegrecimiento del medio, esto a consecuencia de la formación de sulfuro de hierro (FeS), que se da luego de la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) por parte de las BSR. La evaluación del crecimiento se realizó mediante la observación de las características morfológicas macroscópicas de las colonias de cada uno de los 11 cultivos mixtos de BSR en el agar Postgate B, empleando un estereoscopio para este fin. Las características evaluadas fueron tamaño, forma, color, borde, elevación, superficie y consistencia de las colonias (22).

A.1.2.- Cultivos puros de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

Los cultivos puros de BSR fueron obtenidos mediante la siembra en agar Postgate B (Anexo 1) de cada colonia diferente presente en los 11 cultivos mixtos procedentes de la prueba de caracterización macroscópica (apartado numérico A.1.1). Las placas sembradas fueron incubadas a 30°C de 2 semanas en condiciones anaeróbicas (22). Se repico 2 veces adicionales para comprobar la pureza y características coloniales. Las características macroscópicas de los cultivos puros obtenidos fueron evaluadas a través de su observación en un estereoscopio, donde se determinó el tamaño, forma, color, borde, elevación, superficie y consistencia de las colonias (22,41).

A.2.- Caracterización microscópica

A.2.1.- Cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

La caracterización microscópica de los cultivos mixtos (procedentes del apartado numérico 3.4) se realizó para visualizar los distintos tipos de BSR presentes en las 11 muestras de relave minero y lodos, justificando de esta manera el mix bacteriano del presente estudio.

A.2.1.1.- Coloración Gram

Los cultivos fueron sometidos a la coloración Gram (Anexo 2) y observados al microscopio con un aumento de 100X. Esta observación determinó la morfología celular y el tipo de Gram al que corresponden (22,42).

A.2.2.- Cultivos puros de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

La caracterización microscópica de los cultivos puros ayudó a determinar los géneros y especies de BSR cultivadas presentes en cada uno de los 11 cultivos mixtos. La caracterización se realizó mediante distintas pruebas, que requirieron, previamente, inóculos de BSR para garantizar los resultados. Estos inóculos de BSR fueron obtenidos a través de la siembra en caldo Postgate B (Anexo 1) de cada cultivo puro procedente de la prueba de caracterización macroscópica (apartado numérico A.1.2.).

A.2.2.1.- Coloración Gram

Cada cultivo puro de BSR se sometió a la coloración Gram (Anexo 2). Posteriormente fueron visualizados al microscopio (100X), donde se identificó la morfología celular de las BSR y el tipo de Gram al que corresponden (22,42).

A.2.2.2.- Coloración de esporas

Para este ensayo se empleó la coloración Shaeffer-Fulton (Anexo 2), que permite la visualización de esporas formadas por las BSR. La coloración Shaeffer-Fulton es una técnica, que a diferencia de las demás, aplica calor en el momento de la tinción, debido a que modifica la impermeabilidad de la espora, permitiendo de esta manera la entrada del colorante a través de su capa externa. En esta prueba se colocó, en láminas portaobjeto, una asada de cada cultivo puro. Estos cultivos fueron coloreados en presencia de calor y visualizados al microscopio con un aumento de 100X, donde se apreció las esporas de color verde y el resto del cuerpo bacteriano de color rojo (22,42).

A.2.2.3.- Motilidad

Esta prueba permitió determinar la movilidad de las BSR por la presencia de flagelos. Los flagelos son estructuras predominantes en la mayoría de las BSR; no obstante, existen algunas que son inmóviles (43). Para esta prueba se empleó la técnica de gota suspendida, que consistió en colocar una gota de cada uno de los cultivos puros en láminas portaobjeto, siendo luego cubiertas por láminas cubreobjeto. Las láminas con los cultivos fueron observados al microscopio con un aumento de 40X, considerando motilidad positiva al visualizarse movimiento en el campo ocular (22,43).

B.- Caracterización bioquímica

La caracterización bioquímica consistió en diferentes pruebas, que requirieron inóculos de BSR para garantizar los resultados. Los inóculos de BSR empleados para cada prueba de esta caracterización fueron procedentes de la prueba de caracterización microscópica (apartado numérico A.2.2.).

B.1.- Fermentación de carbohidratos

La prueba de fermentación de carbohidratos permitió determinar la capacidad de las BSR de fermentar lactosa, sacarosa y glucosa. Esta prueba se realizó mediante la siembra de cada uno de los cultivos puros de BSR en el medio TSI (Anexo 1). Estos medios sembrados fueron incubados a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas. Los resultados se consideraron positivos para la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa cuando el color rojo de todo el medio viró a amarillo, indicando acidez en este medio (ácido en pico de flauta/ácido en la profundidad - A/A); mientras que el viraje del color rojo a amarillo solo en la profundidad del medio fue positivo para la fermentación de glucosa, indicando acidez (alcalino en el pico de flauta/ácido en profundidad - K/A), y la continuidad del color rojo en el medio se consideró negativa para la fermentación de todos los azúcares, indicando así alcalinidad (alcalino en el pico de flauta/alcalino en la profundidad- K/K). Además, la prueba fue positiva para la producción de gas por la presencia de burbujas, rotura del medio y/o elevación del agar, y para la producción de ácido sulfhídrico por el ennegrecimiento del medio (1,22).

B.2.- Consumo de glicerol ($C_3H_8O_3$)

Para este ensayo se realizó la siembra de 500 μ L de cada uno de los cultivos puros de BSR en viales que contenían 4.5 ml de caldo base (Anexo 1). Los viales se incubaron a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas. Los resultados fueron positivos para el consumo de glicerol ($C_3H_8O_3$) mediante el crecimiento turbio en el caldo base y viraje de color del medio a fucsia (15,22) debido al indicador de Andrade.

B.3.- Consumo de ácido fórmico (CH_2O_2)

Esta prueba se realizó mediante la siembra de 500 μ L de cada uno de los cultivos puros de BSR en viales que contenían 4.5 ml de caldo base (Anexo 1). Los viales se incubaron a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas. Los resultados fueron considerados

positivos para el consumo de ácido fórmico ($C_3H_8O_3$) a través del crecimiento turbio en el caldo base y viraje de color del medio a fucsia (15,22) por el indicador de Andrade.

B.4.- Consumo de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$)

Para este ensayo se empleó el medio Postgate B Modificado, que hace referencia al medio original pero con unas variaciones en su composición, por tal motivo se adiciona a su denominación el término: Modificado. El Postgate B modificado es un medio líquido que presenta el compuesto acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$), que por ser participe en este medio, fue empleado para determinar la capacidad de las bacterias de consumir dicho compuesto (15,22). Para esta prueba se realizó la siembra de 500 μ L de cada uno de los cultivos puros de BSR en viales con 4.5 ml de caldo Postgate B modificado (Anexo 1). Los viales se incubaron a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas. Se consideró positivo el consumo de acetato de sodio mediante el crecimiento bacteriano en el caldo Postgate B modificado, evidenciado por el ennegrecimiento del medio y la precipitación del hierro (Fe) en forma de sulfuro de hierro (FeS) (15,22).

B.5.- Presencia de desulfoviridina

La desulfoviridina es una proteína con actividad de sulfito reductasa. Esta proteína se encuentra en la mayoría de las BSR pertenecientes al género *Desulfovibrio*; sin embargo, también ha sido detectada en especies de los géneros como *Desulfococcus* y *Desulfonema*. La prueba se realizó mediante la centrifugación a 1500 rpm por 20 minutos de 1 ml de cada uno de los cultivos puros de BSR, siendo luego el pellet resuspendido en 100 μ L de caldo Postgate B (Anexo 1) y en donde se agregó 50 μ L de hidróxidos de sodio (NaOH) 2N. Esta mezcla se colocó en un agitador por 30 segundos y de inmediato se expuso a la luz ultravioleta de 365 nm. Los resultados se consideraron positivos al observar una fluorescencia de color roja que indica la presencia de la proteína (15,22).

3.6.- Estandarización del método de determinación de hierro (Fe) en solución

La prueba se realizó para montar un método que determine la concentración de hierro (Fe) en solución, permitiendo de esta manera que su aplicación sea operativa eficiente e idónea. Además, esta prueba se desarrolló para garantizar la obtención de resultados esperados óptimos, por lo cual el método podría ser usado en el estudio de interés.

La determinación de la concentración de hierro en solución se realizó mediante el empleo del método volumétrico analítico redox y la técnica de titulación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). La titulación con dicromato de potasio sirve para determinar la concentración de hierro en forma de ion ferroso remanente (Fe^{+2}) y también el hierro ferroso (Fe^{+2}) producto de la conversión del ion férrico (Fe^{+3}) presente en la solución debido a la oxidación natural de ferroso a férrico por el oxígeno residual en los viales (22,44). La conversión del ion férrico (Fe^{+3}) a ion ferroso (Fe^{+2}) ocurre por efecto de uno de los reactivos aplicados en el procedimiento de esta técnica: el cloruro estañoso ($SnCl_2$), considerado un agente reductor para esta titulación redox.

La titulación con dicromato de potasio trabaja con una fórmula (Anexo 3) para determinar la concentración de hierro en solución. Esta fórmula, a la vez, emplea un factor de solución de dicromato de potasio, que proviene de los resultados de esta prueba, permitiendo así aplicar dicho factor en el estudio de interés. Los resultados de la prueba también fueron utilizados para realizar la recta de calibración que asegura la calidad de los reactivos y el método a emplear (15,44).

La estandarización de la titulación con dicromato de potasio se realizó mediante el uso de muestras patrones de hierro de diferentes concentraciones: 140, 250, 500, 1000, 1400, 2000, 2400, 2800, 3000, 3200, 3600, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 y 9000 ppm (15). Estas muestras fueron preparadas a partir de sulfato de hierro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) y con volúmenes de 50 ml, en donde se agregó cada concentración antes mencionada a cada uno de ellos. Las muestras patrones se titularon por triplicado con la solución de dicromato de potasio (Anexo 3) (Figura 12). Los resultados obtenidos fueron valores de dicromato de potasio gastado

(titulante), que se introdujeron en la fórmula para determinar el factor de solución de dicromato de potasio; además, estos resultados fueron utilizados para realizar la recta de calibración (15,44).

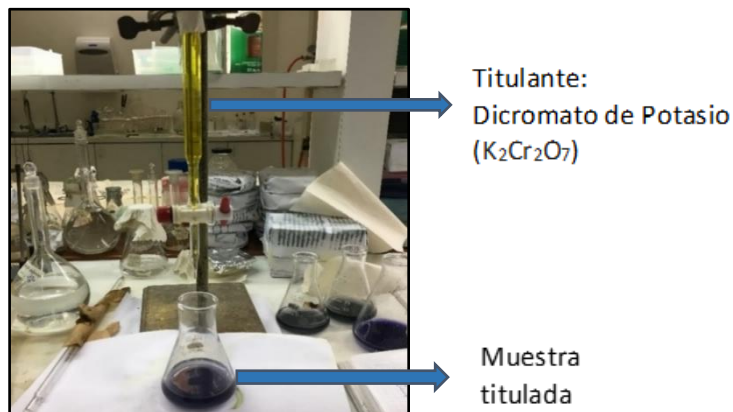


Figura 12: Montaje de la titulación con Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$).

3.7.- Elaboración de perlas de gel de alginato de calcio ($(C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n$)

Las perlas de gel de alginato de calcio se elaboraron para su posterior aplicación en la prueba de disminución de iones de hierro (Fe) en solución.; además, con la elaboración de estas perlas se pudo determinar si la técnica es adecuada, permitiendo extrapolar su uso a la inmovilización bacteriana.

La elaboración de las perlas de gel de alginato de calcio se realizó mediante el empleo del alginato de sodio 4% ($(C_6H_7O_6Na)_n$) y cloruro de calcio 2.5% ($CaCl_2$), concentraciones empleadas por otorgar buena resistencia química y mecánica a las perlas (45). El alginato de sodio, entre todas las sales de alginato, es el polímero con mayor solubilidad en agua fría y característica de transición sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el calcio (41), mientras que el cloruro de calcio es considerado la fuente con mayor porcentaje de calcio disponible (46).

La elaboración de las perlas de gel de alginato calcio se realizó a través de la técnica de goteo y en condiciones de esterilidad. Se disolvieron, por separado, alginato de sodio 4% y cloruro de calcio 2.5% en agua destilada, siendo estas soluciones esterilizadas

seguidamente. La solución de cloruro de calcio 2.5% estéril fue puesta en un agitador a 150 rpm (47) y la solución de alginato de sodio 4% estéril se colocó en una jeringa de 20 ml estéril. La solución de alginato de sodio 4% estéril se hizo gotear por medio de la jeringa en la solución de cloruro de calcio 2.5% estéril que se encontraba en agitación (técnica de goteo), dando lugar a la formación de las perlas de gel de alginato de calcio $((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$ (Figura 13). Estas perlas se mantuvieron por 10 minutos en esta agitación para permitir que el calcio tenga una buena difusión hacia la parte interna y forme la red tridimensional biopolimérica, otorgando una alta resistencia mecánica y capacidad de retener iones metálicos e inmovilizar bacterias. Además, el tiempo de agitación aplicado también contribuyó con la estabilidad y endurecimiento de las perlas, y con la eliminación de pequeñas burbujas de aire generadas al inicio de la agitación (45,48).

Posteriormente, las perlas de gel de alginato de calcio formadas fueron separadas y retiradas de la solución de cloruro de calcio 2.5% mediante filtración. Esta operación consistió en vertir la solución de cloruro de calcio 2.5% con las perlas de gel de alginato de calcio formadas en un embudo con papel filtro y matraz estéril, este último empleado como base, permitiendo de esta manera retener las perlas en este papel y almacenar la solución de cloruro de calcio restante en el matraz de base. Las perlas de gel de alginato de calcio retenidas se traspasaron a una placa Petri estéril, en donde fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril, para eliminar el cloruro de calcio 2.5% sin reaccionar de la superficie de las perlas (45,48).

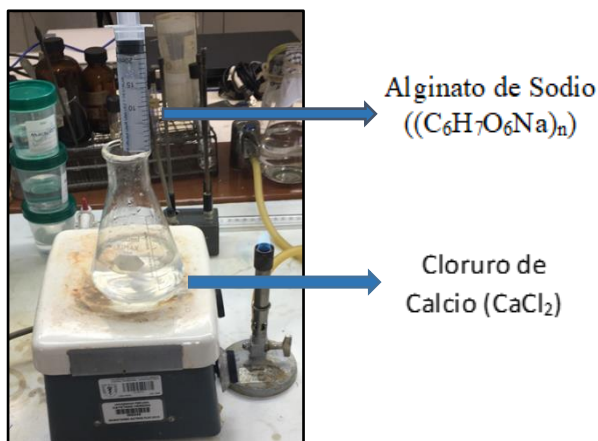


Figura 13: Elaboración de las perlas de gel de alginato de calcio $((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$.

3.8.- Inmovilización de cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) en perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n)

Los cultivos mixtos de BSR se inmovilizaron en perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) con el propósito de aplicarlas en la prueba de disminución de iones de hierro (Fe) en solución.

La inmovilización bacteriana, previamente a su proceso, requirió de inóculos de cultivos mixtos de BSR. Estos inóculos se prepararon mediante la siembra de 1000 µL de cada uno de los 11 cultivos mixtos de BSR, provenientes del aislamiento de BSR (aparatado numérico 3.4), en viales con 6 ml de caldo Postgate B (Anexo 1). Los viales fueron incubados a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas (22), tiempo requerido para alcanzar la fase estacionaria según revisión bibliográfica (38). El crecimiento de los cultivos mixtos de BSR se evidenció por el ennegrecimiento del caldo Postgate B y por la precipitación de hierro (Fe) en forma de sulfuro de hierro (FeS) (22).

La inmovilización se basó en el empleo simultáneo de cultivos mixtos de BSR, alginato de sodio 4% ((C₆H₇O₆Na)_n) y cloruro de calcio 2.5% (CaCl₂) (44). El proceso de inmovilización se realizó mediante la técnica de goteo antes mencionada. Esta técnica fue desarrollada con el procedimiento indicado, sin embargo se incluyó un paso adicional, el cual consistió en la mezcla del alginato de sodio 4% con los 6 ml de cada cultivo mixto de BSR preparados anteriormente. Estos cultivos mixtos fueron empleados inmediatamente al término del periodo de incubación. La mezcla preparada se hizo gotear en la solución de cloruro de calcio 2.5%, dando como resultado perlas de gel de alginato de calcio con BSR en su interior, es decir, BSR inmovilizadas en este tipo de perlas (Figura 14) (45,48).

3.9.- Determinación de la capacidad de las perlas de gel de alginato de calcio, cultivos mixtos de BSR libres y cultivos mixtos de BSR inmovilizados de disminuir iones de hierro (Fe) en solución

A.- Tratamiento previo de las muestras

La determinación de la capacidad de las perlas de gel de alginato de calcio, cultivos mixtos de BSR libres y cultivos mixtos de BSR inmovilizados de disminuir de iones de hierro (Fe) en solución fue evaluada mediante la técnica de titulación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) (Anexo 3). La aplicación de esta técnica, previamente, requirió de un tratamiento realizado a los viales con perlas de gel de alginato de calcio, cultivos mixtos de BSR libres y cultivos mixtos de BSR inmovilizados, con el fin de eliminar elementos que interfieren con el análisis de iones de hierro. Este tratamiento consistió en separar, por centrifugación a 1500 rpm por 20 minutos, las perlas de gel de alginato de calcio, las BSR libres, las BSR inmovilizadas y precipitados inorgánicos de la solución. La centrifugación origino dos fases, de las cuales se recuperaron los sobrenadantes y se colocaron en viales. El empleo de estos sobrenadantes permitió determinar la concentración de hierro en solución, siendo este hierro el remanente y parte del sulfato de hierro ($FeSO_4$) aún no removido (15).

B.- Fórmula de la titulación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

La fórmula de la titulación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) requirió del factor de solución de dicromato de potasio, que fue obtenido de la prueba de estandarización del método de determinación de hierro en solución (apartado numérico 3.6) (15,44).

C.- Controles

El primer control fue el “control medio”, que consistió en caldo Postgate B sin BSR y sin perlas de alginato de calcio ($(C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n$) (medio completo sin ningún inoculo), utilizado para descartar posibles precipitaciones de hierro (Fe) por los componentes y condiciones del medio y para constatar la presencia indispensable de bioagentes en la

disminución de iones de hierro en solución. El segundo fue el “control muestra/Fe”, que es caldo Postgate B pero sin hierro, empleado para determinar la importante presencia del hierro en el aislamiento de las BSR, y para confirmar la no disminución de iones de hierro por la ausencia de este elemento. El tercero fue el “control inicial”, refiriéndose a la concentración de hierro de 500 ppm, con la que se trabajó y adicionó en el caldo Postgate B inicialmente, permitiendo así realizar un análisis entre las disminuciones de la concentración de hierro inicial y final. El cuarto y último fue el “control alginato/Fe”, que se basó en caldo Postgate B conteniendo perlas de gel de alginato de calcio pero sin hierro, usado para determinar la falta de disminución del hierro por su ausencia en el medio. Todos los controles se incubaron a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas y posterior a este tiempo, fueron previamente tratadas (apartado número 3.9.A) y tituladas con dicromato de potasio (Anexo 3), para así determinar la concentración de hierro y la disminución de este ion en solución.

D.- Determinación de la capacidad de las perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) de disminuir de iones de hierro (Fe) en solución

Para la prueba, se prepararon viales con 6 ml de caldo Postgate B (Anexo 1), donde se colocaron 200 perlas de gel de alginato de calcio preparadas anteriormente (apartado numérico 3.7). Los viales fueron incubados a 30°C de 2 semanas en condiciones anaeróbicas. Las condiciones aplicadas fueron las requeridas por las BSR para su crecimiento y desarrollo, ya que así no se generó variaciones que alteren la prueba y los resultados. El desarrollo de este ensayo se realizó por triplicado (22).

Después del periodo de incubación, se determinó la concentración de hierro en solución a través de la titulación con dicromato de potasio (Anexo 3), que fue realizada por triplicado (Figura 14) (22,44) y mediante previo tratamiento (apartado número 3.9.A). Los resultados obtenidos fueron valores de dicromato de potasio gastado (titulante), que se introdujeron en la fórmula empleada en esta titulación para determinar la concentración de hierro y por ende, su disminución en solución, siendo reportada en ppm (15,44). La disminución de la concentración de hierro en solución obtenida fue comparada con el control

medio, control muestra/ Fe^- , control inicial y control alginato/ Fe^- . Además, esta prueba también fue empleada como control, denominado control alginato/ Fe^+ .

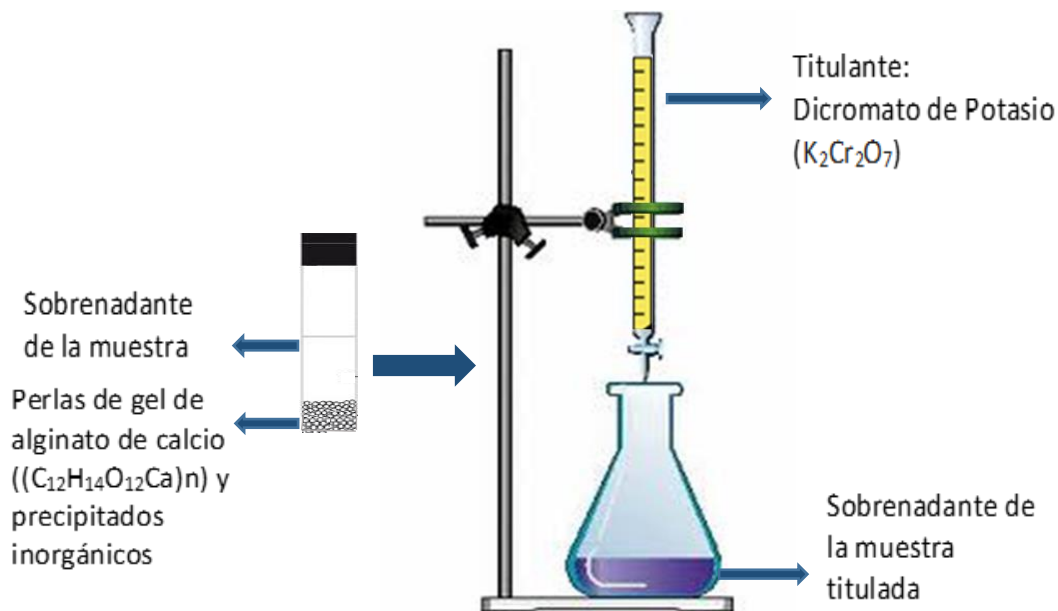


Figura 14: Determinación de la concentración de hierro (Fe) en solución mediante titulación con Dicromato de Potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en muestras tratadas con perlas de gel de alginato de calcio ($((\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_{12}\text{Ca})_n)$). Fuente: Martínez (2017) (83), Vázquez et al. (2010) (84) y Jiménez et al. (2011) (85).

E.- Determinación de la Capacidad de los Cultivos Mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) Libres de Disminuir Iones de Hierro (Fe) en Solución

La prueba inicial con la preparación de inóculos de cultivos mixtos de BSR libres. Estos inóculos se obtuvieron mediante la siembra de 1000 μL de cada uno de los 11 cultivos mixtos de BSR, procedentes de su aislamiento (aparatado numérico 3.4), en viales con 6 ml de caldo Postgate B (Anexo 1). Los viales fueron incubados en condiciones anaeróbicas a 30°C por 2 semanas para alcanzar la fase estacionaria según revisión bibliográfica (22,38). El crecimiento de los cultivos mixtos de BSR en el caldo Postgate B fue evidenciado por el ennegrecimiento del medio y por la precipitación del hierro (Fe) en forma de sulfuro de hierro (FeS) (22).

Con los inóculos bacterianos obtenidos se realizó la evaluación de la concentración de hierro (Fe) en solución, a través de la titulación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) (Anexo 3) (22,44), siendo estos previamente tratados (apartado número 3.9.A). El desarrollo del experimento fue por triplicado. Los resultados fueron valores de dicromato de potasio gastado (titulante), los cuales se incorporaron en la fórmula (Anexo 3) que emplea esta titulación para determinar la concentración de hierro (ppm), permitiendo así obtener también la disminución del metal en solución (ppm) (15,44). Para esta prueba se empleó los controles medio, muestra/ Fe^- , inicial y alginato/ Fe^+ .

F.- Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) inmovilizadas en perlas de gel de alginato de calcio ($(C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n$) de disminuir iones de hierro (Fe) en solución

Se prepararon viales con 6 ml de caldo Postgate B (Anexo 1), donde se colocaron 200 perlas de gel de alginato de calcio ($(C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n$) con cada cultivo mixto de BSR inmovilizado preparadas anteriormente (apartado numérico 3.8). Los viales fueron incubados a 30°C por 2 semanas en condiciones anaeróbicas (22). Este tiempo fue empleado para alcanzar la fase estacionaria según revisión bibliográfica (38). El montaje de este ensayo se realizó por triplicado. Los resultados fueron evaluados mediante la observación del ennegrecimiento del medio y precipitación del hierro (Fe) en forma de sulfuro de hierro (FeS) (22).

Las muestras de los viales pre-tratadas fueron tituladas, por triplicado, con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) (Anexo 3) para determinar la concentración de hierro en solución (Figura 17) (22,44). Los resultados obtenidos fueron valores de dicromato de potasio gastado (titulante), que se introdujeron en la fórmula (Anexo 3) empleada en esta titulación para determinar la concentración de hierro en solución (ppm) y por ende, también su disminución (ppm) (15,44). En esta prueba se utilizó los controles medio, muestra/ Fe^- , inicial y alginato/ Fe^+ , permitiendo realizar un análisis comparativo con ellos.

G.- Análisis comparativo de la disminución de iones de hierro (Fe) en solución entre los cultivos mixtos de BSR libres e inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n).

Para realizar el análisis comparativo, se empleó los resultados obtenidos de las pruebas de disminución de iones de hierro en solución con BSR libres e inmovilizadas en perlas de gel de alginato de calcio. Además, se utilizó los controles medio, muestra/Fe⁻, inicial y alginato/Fe⁺. Este análisis permitió determinar la mejor alternativa aplicativa de estos dos estados en las que se encuentran las BSR para contrarrestar la presencia del hierro (Fe).

3.10.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se aplicó para las pruebas de estandarización y disminución de iones de hierro (Fe) en solución. Los datos obtenidos fueron las variables cuantitativas: dicromato de potasio gastado (K₂Cr₂O₇) (ml) y la disminución de la concentración de hierro (ppm y %). Estos valores fueron registrados en el instrumento de recolección de datos, para después elaborar una base de datos en el software estadístico STATA versión 15.

El dicromato de potasio gastado (K₂Cr₂O₇) (ml) y la disminución de la concentración de hierro (ppm) se presentaron mediante la media (M) (medida de tendencia central) y desviación estándar (DS) (dispersión adecuada). Además, la diferencia entre las capacidades de disminuir iones de hierro en solución por parte de los cultivos mixtos libres y cultivos mixtos inmovilizados fue evaluada mediante la prueba t de student para muestras independientes. La aplicación de esta prueba, requirió previamente evaluar los supuestos de normalidad a través de la prueba Shapiro Wilk y el supuesto de homogeneidad de varianzas por medio de la prueba F. Las pruebas estadísticas se emplearon con un nivel de significancia (α) de 0.05 y se presentaron con intervalos de confianza al 95%.

3.11.- Conservación de los cultivos mixto de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

La conservación de los cultivos de BSR sirve para mantener la viabilidad y estabilidad genética bacteriana, permitiendo de esta manera ser empleadas en futuras investigaciones. Esta conservación se realizó mediante la siembra de 1000 μL de cada cultivo mixto y puro de BSR en viales con 4.5 ml de caldo Postgate B (Anexo 1). Los viales se incubaron a 30°C en condiciones anaeróbicas por 2 semanas (Figura 15). El desarrollo de esta prueba se realizó por triplicado. El crecimiento de las BSR en el caldo Postgate B fue evaluado por el ennegrecimiento del medio y por la precipitación del hierro (Fe) en forma de sulfuro de hierro (FeS). Una vez observado el ennegrecimiento del medio y la precipitación del hierro, se mantuvieron incubados los cultivos mixtos de BSR por 10 días más. Posterior a estos días, los cultivos fueron nuevamente sembrados en caldo nuevo del mismo medio en iguales condiciones de crecimiento, siendo este procedimiento repetido cada periodo de tiempo (Figura 15) (15).

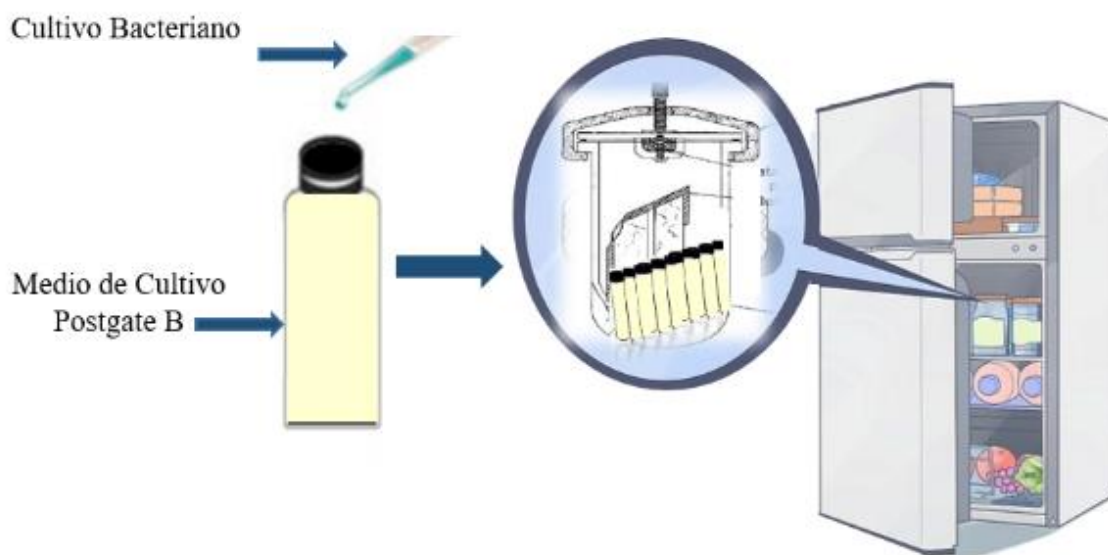


Figura 15: Proceso de conservación de los cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR). Fuente: Wikihow (86) y Caballero (87).

IV.- RESULTADOS

4.1.- Aislamiento de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

Se logró aislar BSR de los 3 lugares y de las 11 muestras de relave minero y lodo, lo cual fue evaluado mediante una visualización de su crecimiento en el caldo Postgate B. (Figura 16). El aislamiento de las BSR fueron cultivos mixtos, que consistieron en mezclas de diferentes géneros y especies de BSR presentes en las muestras. Estos cultivos mixtos fueron denominados con los mismos nombres de las muestras del cual fueron aislados, permitiendo de esta manera facilitar la presentación e interpretación de los resultados posteriores.

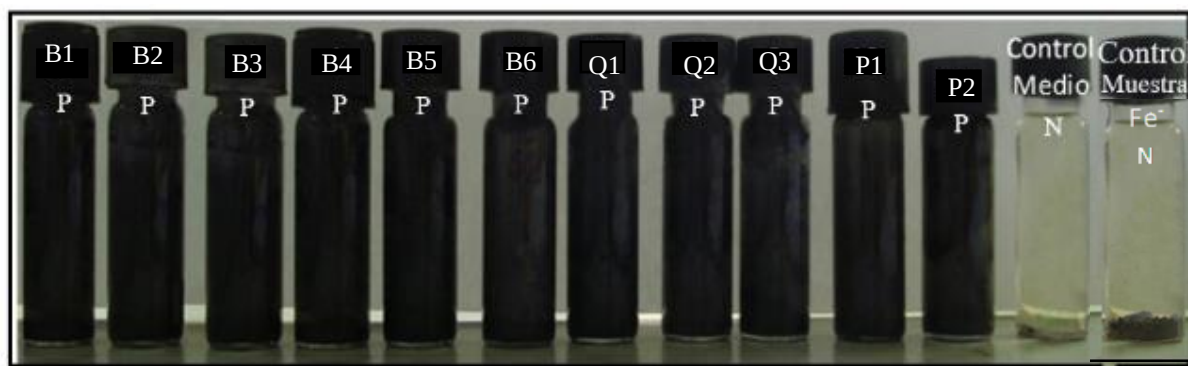
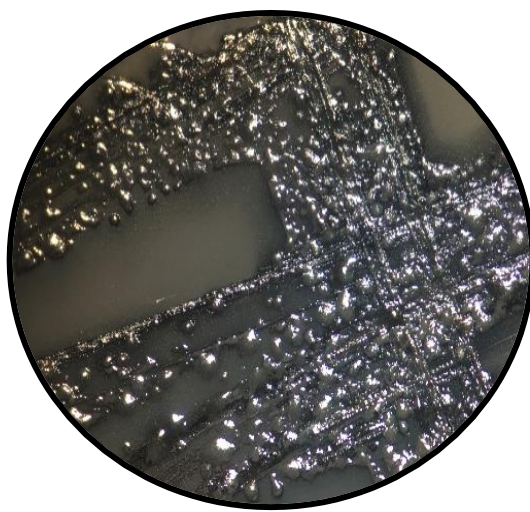


Figura 16: Aislamiento de BSR de los 3 lugares y 11 muestras de relave minero y lodo. Control medio: medio Postgate B completo sin inocular y Control muestra/ Fe^{3+} : muestra sin hierro en el medio Postgate B. P: Crecimiento y aislamiento positivo, N: Crecimiento y aislamiento negativo.

4.2.- Caracterización e identificación de las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR)

En la caracterización macroscópica de los 11 cultivos mixtos, se pudo observar, en las placas de agar Postgate B, la presencia de numerosas colonias con gran diversidad morfológica, la cual estuvo relacionada con el tamaño, forma, color, borde, elevación, superficie y consistencia (Figura 17). Con respecto a la caracterización microscópica, se

obtuvo como resultado dos grupos bacterianos: Gram positivas y Gram negativas, que fueron observadas en cada uno de los 11 cultivos mixtos de BSR (Figura 18). Además, la morfología celular de los 11 los cultivos mixtos de BSR presentó una gran variedad de tamaños y formas (Figura 18). Todos los resultados obtenidos fueron comparados con las establecidas en el Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (39), The Prokaryotes (40) y Gibson (20), indicando una similitud con todos los registrados e estimando la pertenencia de sus identidades a todos los géneros de BSR.



Tamaño: Grande, mediano, pequeño y muy pequeño
Forma: Circular
Color: Gris oscuro y gris oscuro/crema
Borde: Entero y ondulado
Elevacion: Convexa
Superficie: Lisa y brillante
Consistencia: Cremosa

Figura 17: Características macroscópicas de los cultivos mixtos de BSR.

Gram: Positiva y Negativa
Morfología Celular: Bacilos ovoides o cocobacilos, bacilos rectos o curvados, vibrios curvados y espirilos.
Tamaño: Grande, mediano y pequeño.

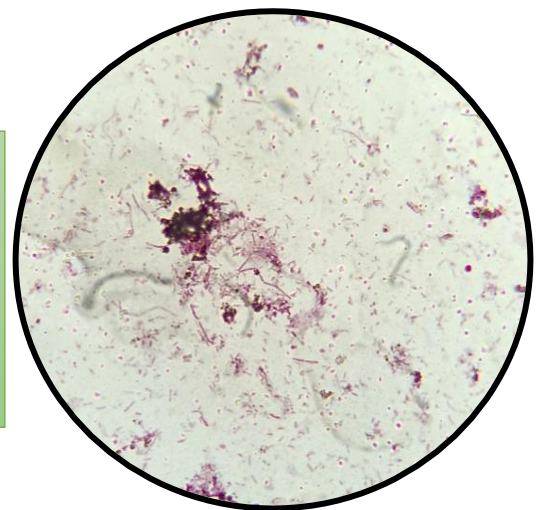
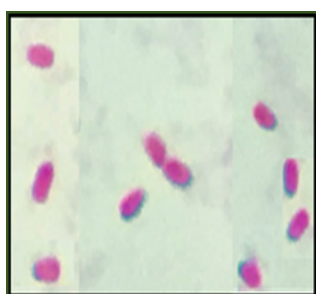


Figura 18: Características microscópicas de los cultivos mixtos de BSR

La caracterización de las BSR, a partir de los cultivos puros y por medio de las pruebas morfológicas y bioquímicas, permitió determinar e identificar los géneros y especies de estas bacterias. Los resultados obtenidos de la caracterización macroscópica, microscópica y bioquímica fueron comparados con las establecidas en el Manual de Determinación Bacteriológico de Bergey (39), The Prokaryotes (40) y Gibson (20), indicando que cada uno de los 11 cultivos mixtos contenían distintas especies de BSR, las cuales fueron identificadas como *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfotomaculum* spp., *Desulfovibrio sapovorans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas* y *Desulfovibrio baculatus* (Figura 19,20 y 21).

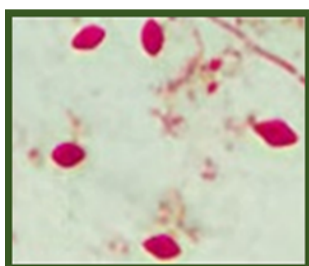
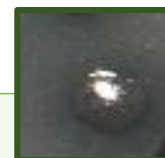


Desulfobacter postgatei

Colonia circular, mediana, gris oscuro, con borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram negativa. Bacilo ovoide o cocobacilo de tamaño grande.

No presenta esporas y desulfovirdina, presenta motilidad, fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, consume acetato de sodio pero no glicerol ni ácido formico.



Desulfobulbus propionicus

Colonia circular, grande, gris oscuro, con borde ondulado, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram negativa. Bacilo ovoide, con forma similar a un limón, de tamaño grande.

No presenta esporas, motilidad y desulfovirdina, No fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, no consume glicerol, ácido formico y acetato de sodio.

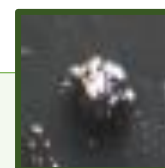
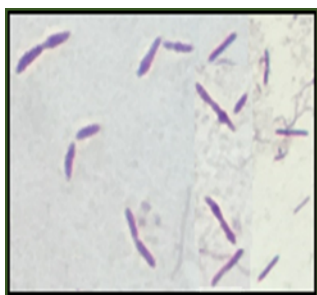
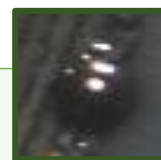


Figura 19: Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de *Desulfobacter postgatei* y *Desulfobulbus propionicus* presentes en los cultivos mixtos de BSR.



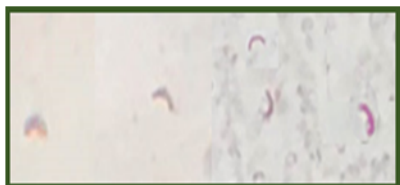
***Desulfotomaculum* spp.**



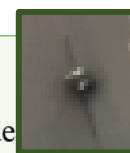
Colonia circular, grande, gris oscuro, con borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram positiva. Bacilo recto individual y en pares, de tamaño grande.

Presenta esporas y motilidad, no presenta desulfovirdina, no fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, consume ácido fórmico pero no glicerol ni acetato de sodio.



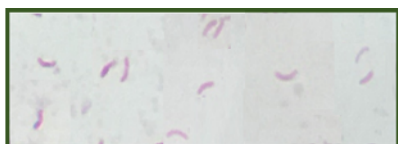
Desulfovibrio sapovorans



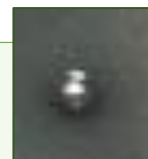
Colonia circular, muy pequeño, gris oscuro, con borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram negativa. Vibrio muy curvado, con forma de frijol, de tamaño mediano.

No presenta esporas y desulfovirdina, presenta motilidad, fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, no consume glicerol, ácido fórmico ni acetato de sodio.



Desulfovibrio desulfuricans



Colonia circular, pequeño, gris oscuro, con borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram negativa. Vibrio ligeramente curvado, de tamaño mediano.

No presenta esporas, presenta motilidad y desulfovirdina, no fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, consume ácido fórmico, no consume glicerol ni acetato de sodio.

Figura 20: Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de *Desulfotomaculum* spp., *Desulfovibrio sapovorans* y *Desulfovibrio desulfuricans* presentes en los cultivos mixtos de BSR.



Desulfovibrio vulgaris



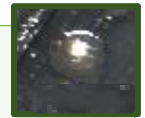
Colonia circular, muy pequeño, gris oscuro/crema, con borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram negativa. Vibrio ligeramente curvado, de tamaño grande.

Presenta motilidad y desulfoviridina, no presenta esporas, no fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, no consume acetato de sodio pero si glicerol y ácido fórmico.



Desulfovibrio gigas



Colonia circular, pequeño, gris oscuro/crema, con borde entero, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram negativa. Espirilo, con forma helicoidal, de tamaño grande y de larga longitud.

Presenta esporas, motilidad y desulfoviridina, no fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, consume ácido fórmico pero no consume glicerol ni acetato de sodio.



Desulfovibrio baculatus



Colonia circular, mediana, gris oscuro/crema, con borde ondulado, elevación convexa, superficie lisa brillante y consistencia cremosa.

Gram negativa. Bacilo, de tamaño pequeño.

No presenta espora y desulfoviridina, presenta motilidad, no fermenta glucosa, lactosa y sacarosa, consume ácido fórmico pero no glicerol ni acetato de sodio.

Figura 21: Características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas de *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas* y *Desulfovibrio baculatus* presentes en los cultivos mixtos de BSR.

4.3.- Estandarización del método de determinación de hierro (Fe) en solución

Los resultados obtenidos en esta prueba fueron valores de dicromato de potasio gastado ($K_2Cr_2O_7$) en la titulación de las muestras patrones de hierro (Fe) (Figura 22). Estos valores se analizaron estadísticamente, encontrando ausencia de variabilidad entre las repeticiones de cada concentración patrón de hierro ($p>0.05$) y determinando, por el contrario, diferencias significadas entre todas las concentraciones patrones de hierro ($p<0.05$), es decir, dependiendo de la concentración de hierro el titulante gastado varia.

Los valores de dicromato de potasio permitieron obtener el factor de solución, y realizar la recta de calibración. Este factor fue 0.0014 (Anexo 4), indispensable para determinar la concentración de hierro en las siguientes pruebas, mientras que con la recta de calibración el resultado fue una relación directamente proporcional entre el titulante gastado (ml) y la concentración de hierro (ppm), es decir, al aumentar esta concentración aumentó el titulante gastado (Figura 22). Este último garantizó la óptima calidad de los reactivos y método a emplear, contribuyendo así con la extrapolación de la titulación con dicromato de potasio a los posteriores ensayos.

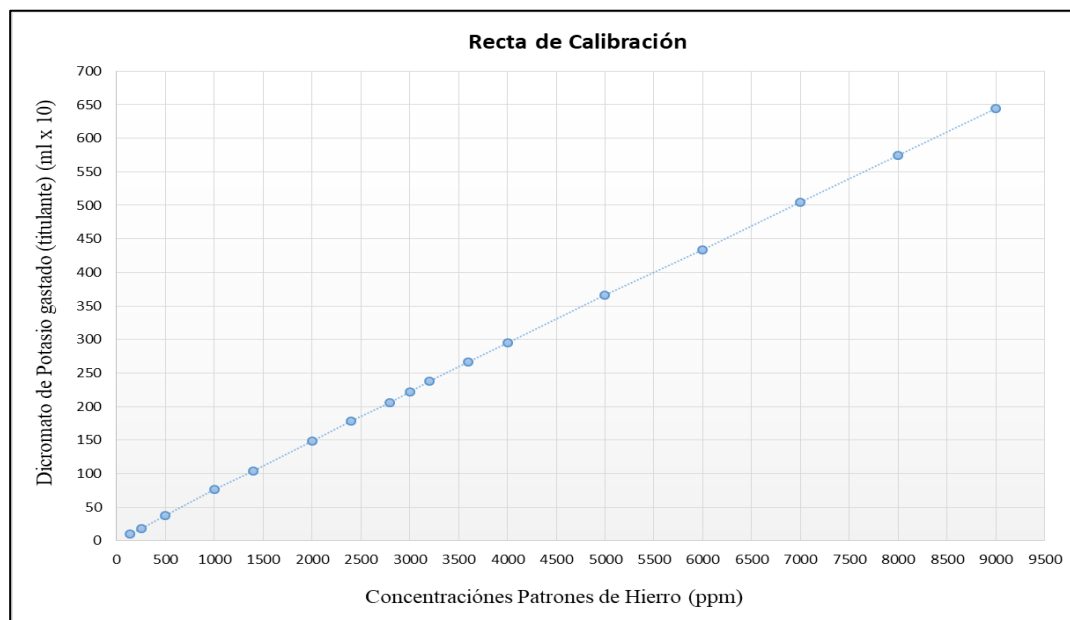


Figura 22: Recta de calibración con valores de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$) gastado (ml) en la titulación de muestras patrones de hierro (Fe) a diferentes concentraciones (ppm) y correspondientes a 1000 ml.

4.4.- Elaboración de perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n)

Este ensayo se realizó mediante la técnica de goteo, con la que se obtuvo una gran cantidad de perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) en corto tiempo (Figura 23A). Estas perlas presentaron un tamaño pequeño con 3.5 mm de diámetro, una forma esférica, un color blanco, una superficie lisa y una textura suave pero consistente (Figura 23B). Los resultados obtenidos permitieron determinar que la aplicación de la técnica de goteo es apropiada para la prueba de interés, pues las características de las perlas de gel de alginato de calcio fueron óptimas, principalmente la textura de las perlas. Esta textura representa un biomaterial no quebradizo, lo cual contribuiría con la retención de las bacterias sin probabilidad de su fácil liberación al medio.

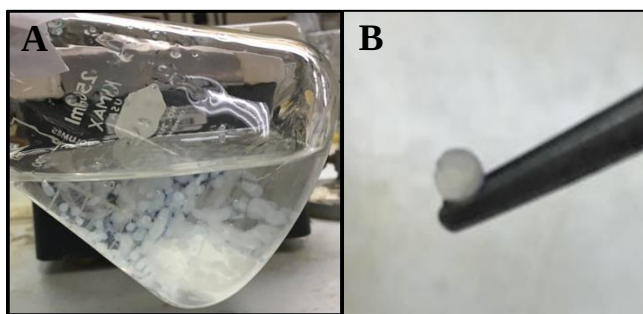


Figura 23: Perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) formadas. A. Perlas en conjunto y B. Perla individual.

4.5.-Inmovilización de cultivos mixtos de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) en perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n)

En este ensayo se obtuvieron, mediante la técnica de goteo, perlas con BSR inmovilizadas y con características similares a las perlas sin BSR: tamaño pequeño, de 3.5 mm de diámetro, forma esférica, color negro, superficie lisa y textura suave pero consistente (Figura 24 A y B).

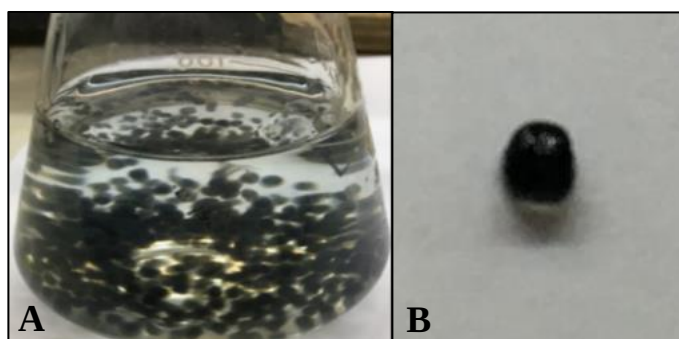


Figura 24: Cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio $((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$. A. Perlas en conjunto y B. Perla individual.

4.6.-Determinación de la capacidad de las perlas de gel de alginato de calcio $((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$ de disminuir iones de hierro (Fe) en solución

En esta prueba se obtuvo las disminuciones de las concentraciones de hierro (Fe) en solución, que fueron analizadas estadísticamente. Este análisis estadístico indicó la ausencia de variabilidad entre las repeticiones del experimento ($p > 0.05$) y la presencia de diferencias significativas con la concentración inicial de hierro de 500 ppm ($p < 0.05$) (control inicial), donde la disminución fue cero (Figura 25). Este último se consideró dato relevante, pues determinó el efecto que ejercen las perlas de gel de alginato de calcio $((C_{12}H_{14}O_{12}Ca)_n)$ sobre los iones de hierro (Figura 25), permitiendo la remoción de poco más de la mitad en la solución. Además, se pudo observar que la disminución de la concentración de hierro también presentó diferencias significativas con el control medio, control muestra/ Fe^- y control alginato/ Fe^- ($p < 0.05$) (Figura 25). Con respecto al control medio, esta diferencia descartó precipitaciones de hierro por los componentes y condiciones del medio e indicó la presencia necesaria de biomateriales para remover los iones de hierro en solución como lo es en este caso la presencia de las perlas de gel de alginato de calcio, mientras que con el control muestra/ Fe^- y control alginato/ Fe^- no hubo remoción alguna por la ausencia de hierro (Figura 25).

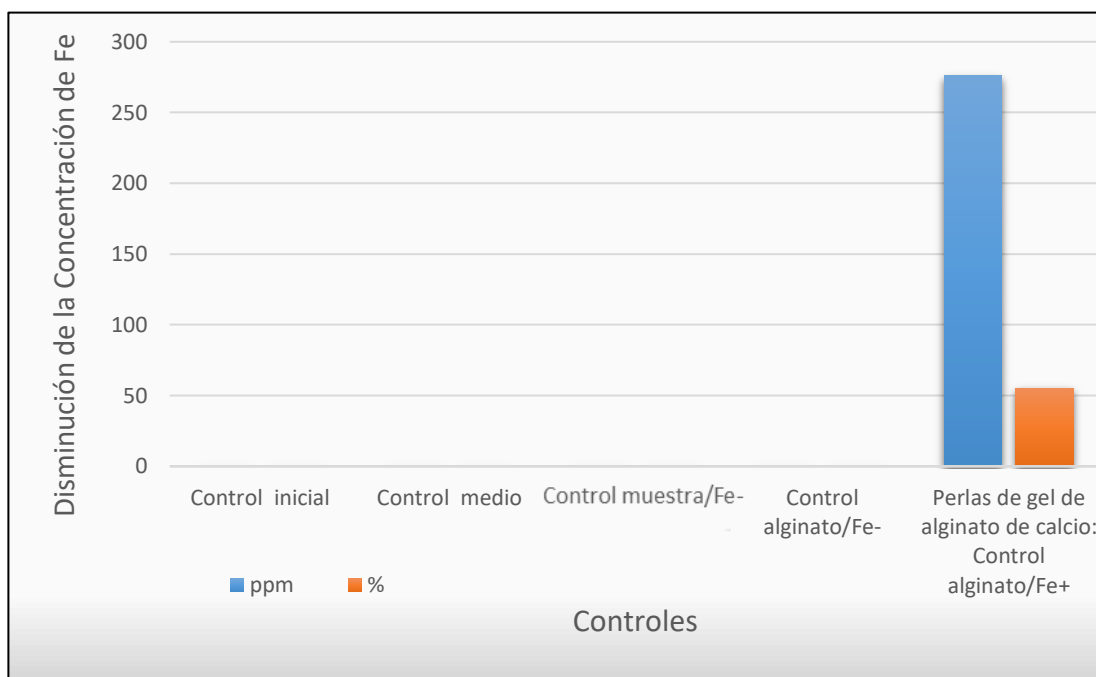


Figura 25: Disminución de la concentración de hierro (Fe) en solución (ppm y %) en presencia de las perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) (Control alginato/Fe⁺).

4.7.-Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de BSR libres de disminuir iones de hierro (Fe) en solución

En esta prueba, las disminuciones de las concentraciones de hierro (Fe) en solución en presencia de los 11 cultivos mixtos de BSR libres procedentes de los 3 lugares fueron analizadas estadísticamente (Figura 26). El análisis indicó que cada disminución de la concentración de hierro obtenida mostró diferencias significativas con la concentración inicial de 500 ppm de hierro (disminución nula) ($p < 0.05$) (control inicial), pues la disminución del metal fue $\geq 49.6\%$ que la concentración inicial; además, con este resultado se determinó que cada cultivo mixto de BSR libre cumplió un rol importante en la remoción de hierro (Figura 26). De la misma manera, se pudo encontrar que cada una de las disminuciones de las concentraciones de hierro obtenidas presentó diferencias significativas con el control medio y control muestra/Fe⁻ ($p < 0.05$), indicando con respecto al primer control, la ausencia de precipitación del metal por el medio Postgate B y la relevancia de los bioagentes en la remoción del hierro en solución como los cultivos mixtos de BSR libres en

esta prueba, mientras que con el segundo control la remoción fue nula debido la ausencia del metal (Figura 26). No obstante, se apreció todo lo contrario con el control alginato/ Fe^{+} , es decir, no hubo diferencias significativas con este ($p>0.05$), demostrando que tanto los cultivos mixtos de BSR libres como las perlas de gel de alginato de calcio son óptimos removedores de hierro (Figura 26). Este análisis también mostro ausencia de variabilidad entre las repeticiones de cada tratamiento y entre todas las disminuciones de las concentraciones de hierro obtenidas ($p>0.05$).

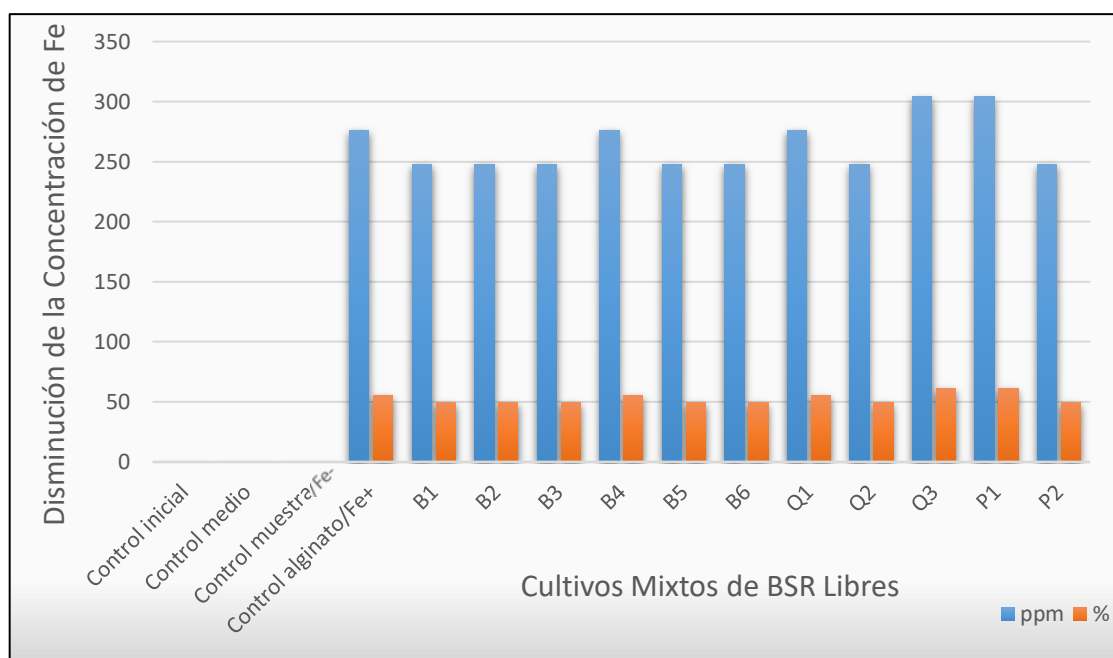


Figura 26: Disminución de las concentraciones de hierro (Fe) en solución (ppm y %) en presencia de cultivos mixtos de BSR libres procedentes de los 3 lugares.

4.8.- Determinación de la capacidad de los cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ($(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_{12}\text{Ca})_n$) de disminuir iones de hierro (Fe) en solución

Las disminuciones obtenidas de iones de hierro (Fe) en solución por parte de los 11 cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ($(\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_{12}\text{Ca})_n$) procedentes de los 3 lugares, fueron superiores al 83%, siendo removido la mayor parte del

metal en la solución (Figura 27). Estos resultados se analizaron estadísticamente, encontrando la presencia de diferencias significativas con la concentración inicial de hierro ($p < 0.05$), cuya disminución fue cero, y demostrando así el importante papel de cada cultivo mixto de BSR inmovilizado en perlas de gel de alginato de calcio para remover este ion en solución (Figura 27). Los resultados obtenidos también presentaron diferencias significativas con otros controles como el control medio, control muestra/ Fe^- y control alginato/ Fe^+ ($p < 0.05$), indicando que este bioagente inmovilizado es necesario para disminuir los iones de hierro en solución debido a su mejor y eficaz acción ejercida sobre el metal a diferencia del resto (Figura 27). Por otra parte, se apreció la ausencia de variabilidad entre las repeticiones de cada experimento y entre todas las disminuciones de hierro correspondientes a los 11 cultivos mixtos de BSR ($p > 0.05$) (Figura 27).

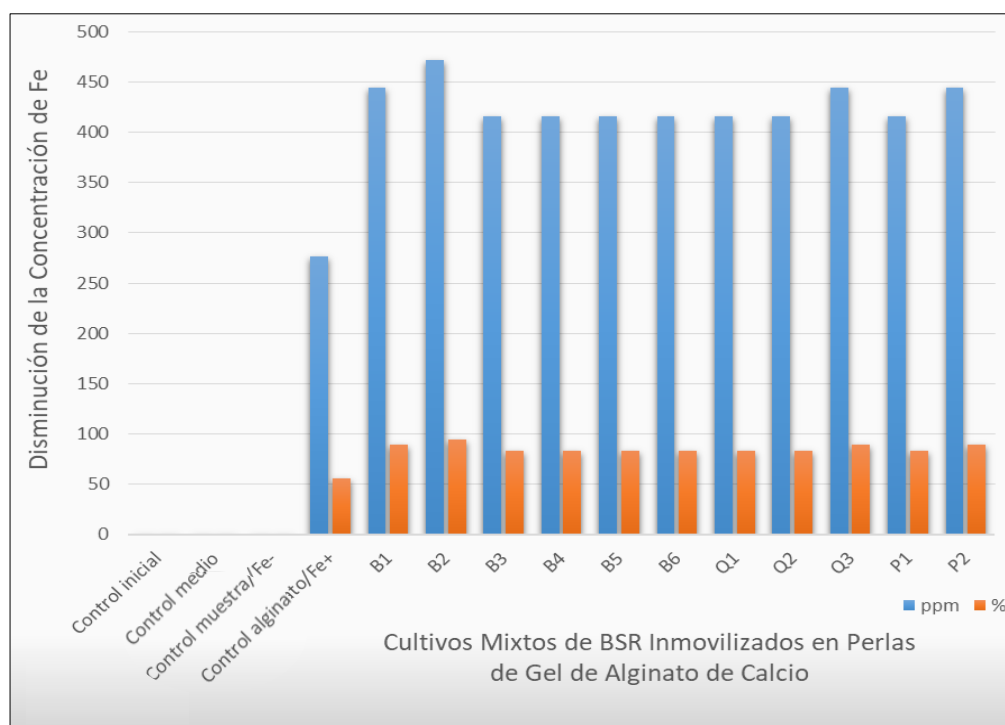


Figura 27: Disminución de las concentraciones de hierro obtenida en solución (ppm y %) en presencia de cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio $((\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_{12}\text{Ca})_n)$ procedentes de los 3 lugares.

4.9.- Análisis comparativo de resultados

Con todos los resultados obtenidos, se pudo analizar comparativamente la capacidad que presentan las baterías y biomateriales de disminuir iones de hierro (Fe) en solución. Este análisis determino la buena capacidad de los cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) de contrastar al hierro (Fe), siendo reconocido así como el mejor entre todos, ya que ejercieron un efecto significativamente superior y óptimo sobre este metal en solución a diferencia de los cultivos mixtos de BSR libres y las perlas de gel de alginato de calcio (p<0.05) (Figura 28).

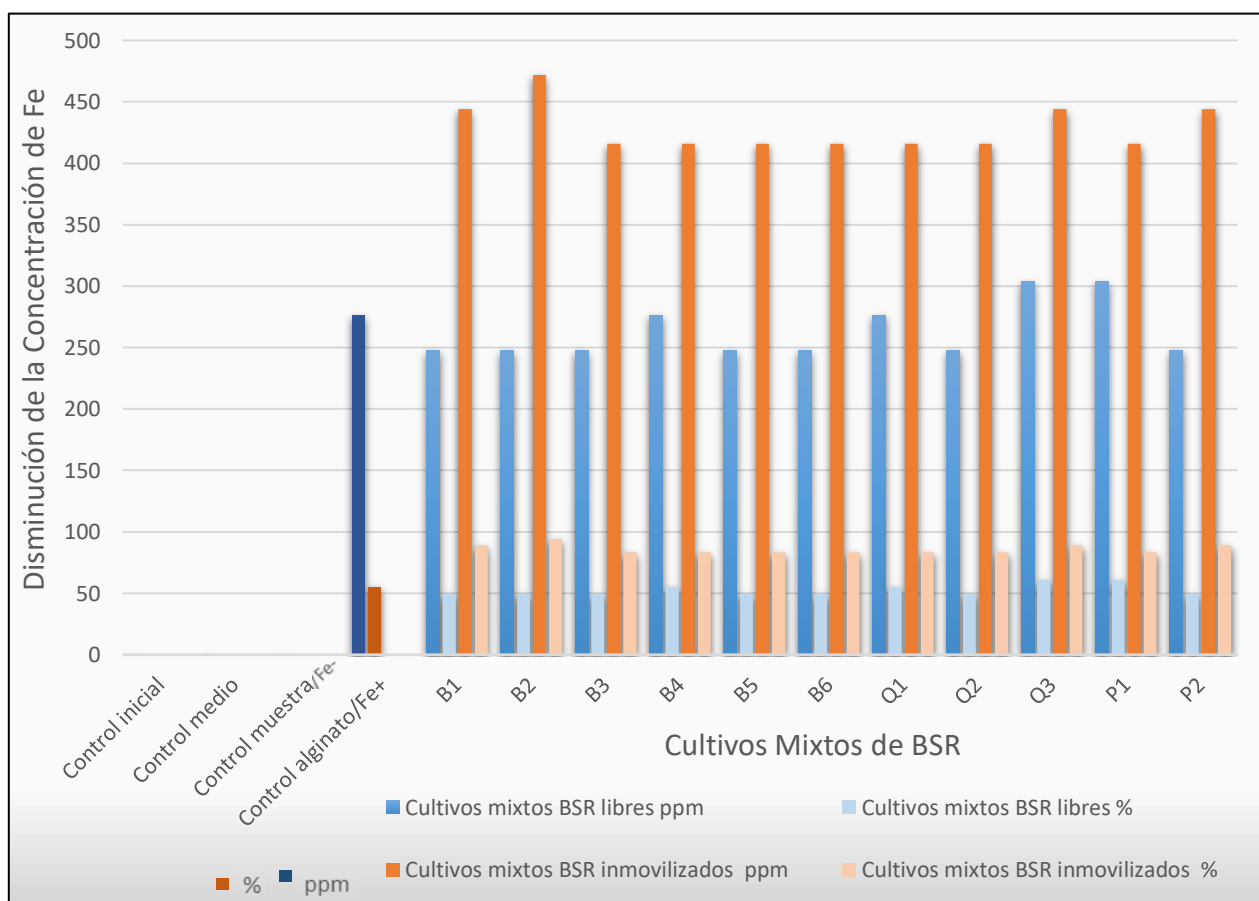


Figura 28: Evaluación comparativa de la disminución de la concentración de hierro (Fe) en solución (ppm y %) en presencia de cultivos mixtos de BSR libres y cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) procedentes de los 3 lugares.

V.- DISCUSIÓN

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) representan un grupo de microorganismos que han sido catalogadas como una de las formas más antiguas de vida bacteriana en la tierra y provenientes de varias familias y diferentes géneros (20). Estas BSR, objeto de estudio del presente trabajo, fueron aisladas a partir de 11 muestras de relaves mineros y lodos, procedentes de 3 lugares del Perú. Los relaves mineros y lodos son considerados hábitats de las BSR debido a la presencia de sulfatos (11), que provienen de la oxidación natural de los desechos urbanos y mineros contenidos en estos ambientes (49).

El aislamiento de las BSR, generalmente, es poco frecuente, esto a causa del lento crecimiento que presenta, el cual, incluso, puede extenderse hasta 28 días. Este crecimiento puede ser por la pequeña cantidad de energía obtenida y destinada para su desarrollo, ya que el 80% del sustrato es utilizado para el mantenimiento y el 20% para la síntesis de biomasa (50). Además, existe otro factor causante del lento crecimiento: el tipo de aceptor de electrones que emplean estas bacterias. Fichtel et al. (2012) (51) reportaron que con el empleo del sulfito y tiosulfato como aceptor de electrones, las BSR presentaron un crecimiento demasiado tardío y con bajas densidades celulares; mientras que con el sulfato, el crecimiento fue de menos días y con altas densidades celulares.

En el aislamiento se obtuvieron 11 cultivos mixtos de BSR, cada uno correspondiente a cada muestra de suelo de los 3 lugares. Cada cultivo mixto estaba compuesto por un consorcio de diferentes géneros y especies de BSR, las cuales fueron identificados como *Desulfotomaculum* spp., *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfobacter postgatei*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas* y *Desulfovibrio baculatus*. Estos géneros de BSR también se aislaron en el estudio realizado por Salazar (2008) (52) y Sánchez (2005) (53).

Las BSR identificadas constituyen el grupo más estudiado y representativo de dichas bacterias, ya que la mayoría de los conocimientos obtenidos sobre el proceso de reducción

desasimilatoria del sulfato provienen de investigaciones realizadas en especies de estos géneros: *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus* y *Desulfobacterium* (53). La característica más importante de estas BSR para este trabajo es su pertenencia al grupo de anaerobios aerotolerantes, es decir, son bacterias capaces de resistir bajas concentraciones de oxígeno por tiempo limitado a pesar que la reducción de sulfato es anaeróbica (54). Estas BSR aerotolerantes no pierden su actividad de reducción de sulfato, ya que en ambientes homogéneamente aireados solo se tornan inactivas, pudiendo recuperar esta actividad al encontrar nuevamente condiciones anaeróbicas (18,54). Las BSR anaerobias aerotolerantes tienen la capacidad de tolerar el oxígeno debido a la presencia de enzimas antioxidantes, el superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, las cuales representan un mecanismo de defensa contra las formas tóxicas del oxígeno (52); no obstante, también se ha determinado la presencia de otras enzimas como rubreritina, nigeritina, neelaredoxina, desulfoferrodoxina y rubredoxina u oxígeno oxireductasa, reduciendo el oxígeno a agua en ciertos mecanismos de respiración (52,55). Esta característica que presentan las 8 BSR del trabajo, ha permitido y contribuido con el desarrollo del estudio de interés, pues el proceso de inmovilización se realizó en condiciones aeróbicas.

Aparte de la característica mencionada, cabe resaltar que cada BSR presenta sus propias características, como es el caso del género *Desulfotomaculum*, que pertenece al subgrupo I, miembro de las bacterias Gram positivas y compuesto por 30 especies y 1 subespecie (56). *Desulfotomaculum* spp. presenta una característica diferencial entre todas las BSR, la cual es la capacidad de formar esporas (56). Esta formación de esporas otorga resistencia y supervivencia a condiciones ambientales extremas como la desecación, altas temperaturas, cambios de pH y oxigenación del medio (56). Con respecto a este último, Scheid et al. (2001) (57) indicaron que estas bacterias han sido encontradas en ambientes aerobios y anaerobios, en donde se ven sometidos a cambios cíclicos en el medio ambiente. Referente a la temperatura, Nielsen et al. (1996) (58) aislaron, estudiaron y reportaron BSR termófilas del género *Desulfotomaculum*, que debido a la presencia de esporas, fueron capaces de tolerar y crecer a una elevada temperatura, 75°C. Por otro lado, la relación del pH con las esporas de las BSR también fue estudiado por varios investigadores como Pikuta et al. (2000) (59), quienes indicaron que *Desulfotomaculum alkaliphilum* se desarrolló a un pH

entre 8 y 9.15, mientras que Nilsen et al. (1996) (58) mencionaron para el caso de *Desulfotomaculum thermocisternum* un pH entre 6.2-8.9.

Otra BSR identificada fue *Desulfobulbus propionicus*, que es un organismo quimiorganotrofo y clasificado dentro de la familia Desulfobulbaceae (60). Esta BSR, como ya se sabe, reduce el sulfato, azufre elemental u otros oxidados de azufre (sulfito, tiosulfato, etc.) a sulfuro (20); sin embargo, *Desulfobulbus propionicus* es capaz de ejercer otra función: emplear el nitrato como aceptor final de electrones y reducirlo a amoníaco (60), compitiendo de esta manera con las bacterias nitrificantes. Este último fue reportado por Widdel et al. (1982) (60), quienes demostraron que *Desulfobulbus propionicus* reduce el nitrato mediante el empleo de la cepa 1pr3T aislada e identificada como tal. Asimismo, esta BSR también es capaz de producir sulfato y sulfuro a partir de azufre elemental, siendo catalogada por Lovely et al. (1994) (61) como la primera especie conocida por realizar la dismutación del azufre elemental.

Por otro lado, *Desulfobacter postgatei* es una bacteria que se destaca entre las demás por presentar la capacidad de crecer y desarrollarse en acetato de sodio, es decir, es una especie altamente especializada en utilizar el acetato como sustrato orgánico (62). Este sustrato es empleado como fuente de carbono, oxidándolo de manera completa y efectiva debido a que poseen toda la maquinaria funcional para realizar el ciclo del ácido cítrico (62). Brandis et al. (1983) (62) realizaron estudios indicando que *Desulfobacter postgatei* presenta enzimas oxidantes de acetato que participan en el ciclo del ácido cítrico.

En este estudio se identificó 5 especies del género *Desulfovibrio*: *D. desulfuricans*, *D. sapovorans*, *D. vulgaris*, *D. gigas* y *D. baculatus*. *Desulfovibrio* es considerado el género más predominante debido a su prevalencia en ambientes anaeróbicos y ricos en sulfatos, permitiendo de esta manera ser el más aislado y estudiado de las BSR (63). No obstante, existen varios informes de la capacidad de dicho género para tolerar condiciones aeróbicas o casi aeróbicas, lo que contribuye con su hallazgo en otros ambientes (63). Este último fue reportado por Baumgarten et al. (2001) (64) quienes trabajaron con *D. vulgaris* y *D. desulfuricans*; lo mismo indicaron Cypionka (2000) (54) pero con una BSR adicional, *D.*

gigas. Este género es selectivamente aislado en medios que contienen H_2/CO_2 y lactato o etanol, aunque también crecen con otros sustratos orgánicos como el piruvato, malato, fumarato, entre otros (55). Además, hubo reportes de la capacidad de estas BSR de utilizar carbohidratos, tal como lo indicaron Petrova et al. (2002) (65), quienes estudiaron y determinaron que algunas cepas de *Desulfovibrio* fueron capaces de utilizar poliglucosa y nitrocelulosa como fuente de carbono.

Posteriormente, se realizó la elaboración de las perlas de gel de alginato de calcio a través de la técnica de goteo. Estas perlas elaboradas se emplearon para evaluar su capacidad de disminuir iones de hierro en solución, siendo ésta la siguiente prueba que se realizó. En dicha prueba se determinó el efecto positivo de estas perlas sobre los iones de hierro en solución, el cual es resultante de los procesos de intercambio iónico, quelación y adsorción física (35). En el caso del intercambio iónico, este proceso ocurre cuando el calcio del gel, que se encuentra inicialmente unido a la cadena de bloques G, es desplazado y reemplazado por el hierro hasta alcanzar la concentración de equilibrio en ambas fases (32). El segundo proceso, la quelación, consiste en la actuación de los geles de alginatos como agentes quelantes con el hierro, ya que por el modelo de la “caja de huevos”, los ácidos gulurónicos (G) tienen un efecto quelante sobre este metal (31). Por último, la adsorción física hace referencia a la unión entre el hierro y la superficie de los geles de alginatos, esto a causa de que la estructura de los geles deja grupos funcionales libres cargados negativamente que permiten esta adsorción física del metal (66).

Estudios recientes con biomasa de algas marinas, fuente de obtención de los alginatos, han reportado que el proceso predominante es el intercambio iónico (67). El intercambio iónico es considerado un concepto importante en la biosorción de metales debido a que ciertos polisacáridos naturales, como el alginato, presentan la propiedad de intercambiar iones metálicos con los cationes multivalentes que ocupan sus sitios de coordinación (68). Estos sitios se encuentran revestidos de grupos funcionales (66), entre los cuales el grupo carboxilo es generalmente el más abundante en las algas, constituyendo aproximadamente el 70%, mientras que el grupo hidroxilo se encuentra en menos abundancia, realizando así un papel secundario en la unión de metales (28). La función del grupo carboxilo en la remoción

de metales ha sido estudiado por Fourest et al. (1996) (69), quienes demostraron, mediante análisis de espectrofotometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR), la biosorción del cadmio a través de los grupos carboxilos del alginato. De la misma manera, Yang et al. (2019) (70) mencionaron que el proceso de remoción del cobre, plomo y cadmio por parte de las perlas de alginato fue a través del intercambio del calcio por estos metales en su estructura de "caja de huevos"; además, determinaron que la interacción del cobre con esta estructura del alginato ocurrió con el grupo carboxilo por su mayor afinidad que el calcio. Por lo expuesto, el intercambio iónico ha recibido atención especial en los últimos años, enfocando su rol de los alginato a la remoción de metales y mejora de la calidad ambiental.

En esta prueba se han obtenido resultados que han sido comparados con otros estudios, los cuales son reportes de autores que trabajaron con diversos metales, y con los que se determinó una similitud. Entre estos estudio, se encuentra la investigación realizada por Nitã et al. (2007) (71) sobre la remoción de los iones metálicos plomo y cadmio usando perlas de alginato de calcio, en donde se obtuvo como resultado la remoción del 60% de plomo y 80% de cadmio en presencia de elevadas concentraciones: 200-300 mg/L (200-300 ppm). Lopes da Silva et al. (2017) (31) obtuvieron los mismos resultados que el autor anterior cuando trabajaron con plomo y cadmio; además, estos autores también indicaron un alto porcentaje de disminución con respecto al cobre y cromo. Asimismo, Oliveira (2003) (32) estudió y analizó la biosorción del cobre por parte de perlas de alginato de calcio, determinando que hubo diferencia entre las perlas húmedas y secas, pues el equilibrio se alcanzó más rápido con las perlas húmedas por su saturación a las 3 horas del inicio del proceso de biosorción y, por ende, sólo se logró un porcentaje de remoción de cobre del 18.03%, mientras que las perlas secas se saturaron a las 24 horas del inicio del proceso logrando un porcentaje de remoción de cobre mayor al 80%.

En el ensayo sobre la determinación de la capacidad de los 11 cultivos mixtos de BSR libres de disminuir iones de hierro en solución, se obtuvieron resultados favorables. Estos resultados fueron comparados con otros estudios, que son reportes de autores que trabajaron con diversos metales y con los que se determinó una similitud. Entre estos estudio, se encuentra la investigación realizada por Mormontoy et al. (2011,2013) (15,22), quienes

aislaron y obtuvieron cultivos mixtos de BSR libres compuestos por *Desulfobacter* spp., *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfovibrio sapovorans*, e indicaron la óptima capacidad de remoción de hierro en diferentes condiciones de pH (5, 7 y 9) por parte de estos cultivos. Asimismo, McIntire et al. (1990) (72) también reportaron la remoción de hierro empleando cultivos mixtos de BSR libres, que fue evidenciado por la disminución de la concentración de dicho metal de 237 a 27 ppm; además, indicaron la remoción de otros metales como níquel, cobre, zinc, cadmio y plomo en más del 70%, concluyendo con todos estos resultados que las BSR pueden ser aplicadas en procesos de tratamientos de drenaje ácido de minas con el propósito de mejorar la calidad del agua. De la misma manera, Martins et al. (2009) (73) obtuvieron resultados similares, reportando que sus cultivos mixtos de BSR libres, aislados de plantas de tratamiento de aguas residuales y compuestos por *Desulfovibrio desulfuricans* y *Desulfobulbus rhabdiformis*, fueron capaces de disminuir las concentraciones iniciales de hierro (400 mg/L), zinc (150 mg/L) y cobre (80 mg/L).

Estos resultados obtenidos previamente se debieron a la función biológica de las BSR para contrarrestar la presencia del hierro (precipitación del metal); sin embargo, también es atribuido al empleo de cultivos mixtos de BSR, los cuales han sido catalogados como los más recomendados, pues su aplicación ha permitido la obtención de mejores resultados que los cultivos puros. El empleo de cultivos puros es considerado un factor limitante en los procesos de biorremediación, esto a causa de que el uso de una sola especie, que está adaptada a un tipo de ambiente, no permite el control de las variables de crecimiento y desarrollo, por ende al presentarse alguna variación ambiental, su crecimiento y desarrollo se ven sumamente afectados (15). Por el contrario, al utilizar cultivos mixtos en los procesos de biorremediación, la resistencia y la tolerancia a los cambios ambientales incrementan considerablemente por la diversidad de especies que los componen, pues dentro de éstas existe diversidad metabólica y especies tolerantes a un tipo de contaminante, siendo las que sobrevivan y continúen con el proceso de biorremediación (74). Ayangbenro et al. (2018) (75) indicaron en su investigación que el empleo de los cultivos mixtos de BSR en los procesos de biorremediación e ingeniería es una herramienta eficaz para la degradación óptima de los residuos ácidos de relaves mineros.

Con respecto a la diversidad metabólica, varios autores consideran que es una propiedad importante que poseen los cultivos mixtos, ya que la diversidad de especies que conforman estos cultivos le otorga un ambiente donde hay esta diversidad metabólica, permitiendo así con el mejor empleo de la fuente de carbono (15,22). En un estudio realizado por White et al. (1998) (74), se investigó y comparó dos tipos de biopelículas de BSR, una formada por un cultivo puro y la otra por un cultivo mixto, las cuales fueron expuestas a la toxicidad del cadmio, obteniendo como resultado que el cultivo mixto obtuvo mayor cantidad de energía proveniente del consumo del lactato en comparación con el cultivo puro. Dichos autores indicaron que este resultado fue por la incapacidad de las bacterias del cultivo puro de utilizar el acetato como fuente de carbono, pues el compuesto es producto del empleo del lactato como donador de electrones por parte de estas bacterias, es decir, son capaces de emplear lactato pero no su producto final que es el acetato; sin embargo, el cultivo mixto, que contenía una diversidad de BSR fueron capaces de emplear el acetato como fuente de carbono, es decir, pudieron utilizar ambos compuestos (lactato y acetato), obteniendo de esta manera una mayor cantidad de energía. El actual estudio realizado coincide con lo mencionado previamente, debido a que los 11 cultivos mixtos de BSR empleados estaban compuestos por una diversidad de géneros y especies de BSR, siendo estos capaces de emplear el acetato y lactato a causa de la diversidad metabólica presente. Asimismo, esto sería considerado la razón por la cual existe una variación, aunque no significativa, entre los 11 cultivos mixtos de BSR libres para disminuir hierro en solución, ya que habría la posibilidad en algunos cultivos de estar presente mayor biomasa de una especie de BSR capaz de emplear los dos compuestos, mientras que en otros se encontraría una concentración más elevada de BSR que utilizan solo uno.

Una ventaja adicional que presenta el empleo de los cultivos mixtos es la resistencia a la toxicidad del sulfuro de hidrógeno. El sulfuro de hidrógeno libre en exceso puede ser tóxico para las bacterias debido a que puede reaccionar con los grupos funcionales de sus aminoácidos y coenzimas, perjudicando así el desarrollo de estas células bacterianas (76); no obstante, el empleo de cultivos mixtos minimiza este problema ya que están conformados por una diversidad de especies, de las cuales se encuentran especies tolerantes al sulfuro de hidrógeno (15,22). Hay investigaciones que reportan que la resistencia a la toxicidad del

sulfuro de hidrógeno varía de acuerdo al grupo bacteriano. En el caso de las BSR, Mormontoy (2011,2013) (15,22) y Rinzema et al. (1988) (77) indicaron que los géneros más afectados por el sulfuro de hidrógeno fueron *Desulfonema*, *Desulfobulbus* y *Desulfobacteria*, mientras que *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* y *Desulfococcus* fueron los más resistentes; además, mencionaron que entre todos los géneros *Desulfococcus* resalto debido su alta resistencia a mayores concentraciones de sulfuro de hidrógeno. Por ende, el presente estudio realizado se asemeja con este último, ya que los 11 cultivos mixtos de BSR empleados estaban constituidos por los géneros resistentes al sulfuro de hidrógeno, permitiendo el desarrollo y su sobrevivencia ante este factor adverso; sin embargo, se tiene la presencia de una BSR menos resistente, *Desulfobulbus*, la cual podría estar inhibiéndose ante este factor pero sin afectar el desarrollo y la actividad de los demás géneros. Además, lo indicado previamente podría ser la justificación a la variación, aunque no significativa, de la disminución de iones de hierro obtenida entre los 11 cultivos mixtos de BSR libres, pues en unos cultivos se encontraría mayor cantidad de BSR resistentes al sulfuro de hidrógeno, mientras que en los demás sería todo lo opuesto.

La última prueba que se realizó en este estudio fue la evaluación de la capacidad de los 11 cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio de disminuir iones de hierro en solución, consistiendo está en 33 ensayos de los 69 elaborados en todo el estudio. Cabe resaltar, que el empleo de las BSR en este estudio como microorganismos a inmovilizar fue factible, pues cumple con los requisitos para ser inmovilizadas, como ser viables, mantener el metabolismo activo en periodos largos y no verse afectada por los procesos de inmovilización (24). En esta prueba, los resultados obtenidos fueron favorables, ya que se determinó el potente efecto que ejercen los cultivos mixtos de BSR inmovilizadas sobre los iones de hierro, siendo esto demostrado por la diferencia encontrada con los obtenidos en las otras pruebas. Además, es importante mencionar que el éxito de esta prueba se debió al soporte empleado: el alginato de calcio, ya que presenta óptimas características para tal fin, entre ellas el tamaño del poro de las perlas, las cuales son de 3.6 a 14 nm para la concentración de alginato de sodio empleada en este trabajo según bibliografía (78), permitiendo así 1) la inmovilización, por un mayor tamaño de las BSR: *Desulfovibrio* (10 μ m), *Desulfobacter* (10 μ m), *Desulfotomaculum* (1 μ m) y

Desulfobulbus (10 μ m) (53); y 2) la actividad y desarrollo de las BSR sin inconvenientes, por el paso de los nutrientes de menor tamaño molecular que los poros.

La disminución de los iones de hierro en solución por parte de los cultivos mixtos de BSR inmovilizadas en perlas de gel de alginato de calcio ocurre de dos maneras: por la actividad de las BSR (precipitación de hierro en forma de sulfuro ferroso) (21) y por la acción de las perlas de gel de alginato de calcio (intercambio iónico, quelación y adsorción física) (antes mencionado) (35). El trabajo en conjunto que ejercen las BSR y las perlas de gel de alginato de calcio, es decir, BSR inmovilizadas en perlas de gel de alginato de calcio, permite que la capacidad de remover y disminuir metales en solución sea mayor y eficaz que de manera independiente, indicando así que es la mejor alternativa aplicativa biorremediadora para diversos ambientes contaminados.

Por otra parte, se pudo observar que, entre cada cultivo mixto de BSR inmovilizado en perlas de gel de alginato de calcio, la disminución de iones de hierro en solución variaba ligeramente, aunque no significativa. Esta variación podría ser fundamentada, al igual que en el caso de las BSR libres, por la presencia en algunos cultivos mixtos de una gran cantidad de especies de BSR resistentes al sulfuro de hidrógeno y capaces de emplear dicho compuesto como fuente de carbono; mientras que en los otros sucedería todo lo contrario, siendo estas, razones antes mencionadas.

Los resultados obtenidos por las BSR inmovilizadas también se debieron a las ventajas que ofrece el emplear dicha inmovilización. Entre ellas, se encuentra, principalmente, la protección contra la toxicidad de los metales que le proporciona el alginato de calcio a las BSR, pues la concentración del metal en el medio disminuye al interior de la perla de gel de alginato de calcio cuando ocurre la difusión, resultando esta condición favorable para la bacteria; además, se ha demostrado que la protección también hace referencia a la remoción de los metales en la matriz del alginato, cumpliendo este último un papel importante en la reducción de la toxicidad sobre las BSR (79,26). Esta protección a las BSR por parte del alginato de calcio evita la desactivación enzimática, desnaturalización de proteínas y daño a la membrana celular de las BSR cuando se encuentran expuestas a los

metales (80), permitiendo de esta manera la producción de altas densidades celulares y por ende, el incremento de la tasa global de remoción en los procesos de biorremediación (9).

Los resultados referidos a la buena capacidad de los cultivos mixtos de BSR inmovilizados en alginato de calcio para disminuir iones de hierro representan un conocimiento novedoso y un gran aporte al área de biotecnología e industria ambiental, ya que los reportes relacionados con este tema son escasos en la literatura. No obstante, se pudo encontrar una similitud con una investigación realizada por Kiran et al. (2018) (79), quienes indicaron la remoción del 95% de hierro, zinc, cadmio, plomo y níquel cuando se encontraban a una concentración de 10 mg/L (10 ppm), mientras que para una concentración más elevada, 50 mg/L (50 ppm), obtuvieron la remoción de más del 85% con excepción del níquel, para el cual fue de 75%. Esta remoción se debió a la actividad realizada por las BSR inmovilizadas correspondientes al género de *Desulfovibrio*, quienes precipitaron los metales como sulfuro metálico; sin embargo, indicaron que también esto puede atribuirse a la protección que brinda el soporte de alginato de calcio a las BSR frente a la toxicidad de los metales. Además, en este estudio se realizaron experimentos de reutilización de las BSR inmovilizadas, obteniendo en los 3 ciclos de reutilización la remoción casi por completo de zinc, cadmio y plomo y una remoción menor de hierro y níquel, cuyos valores decrecieron levemente con su reutilización; no obstante, estos valores demostraron la óptima remoción de dichos metales pues se encontraban por encima del 50%. Estos resultados concuerdan con los reportados por Min et al. (2008) (81), quienes mencionaron que las BSR inmovilizadas contrarrestan a los metales por la precipitación de estos y, a la vez, determinaron la buena reutilización de las BSR frente al zinc, removiéndolo hasta el 99%, pero con un soporte inmovilizador compuesto por una mezcla de SiO₂, CaCO₃, carbón activado, alcohol polivinílico y alginato de sodio. Otro autor como Zhang H et al. (2018) (82), determinaron la remoción del cadmio en casi al 100% empleando BSR inmovilizadas en un material combinado de alcohol polivinílico, silica y alginato de sodio.

A partir de todos los resultados en este trabajo, se pudo determinar la buena capacidad que presentan las BSR y las perlas de gel de alginato de calcio para disminuir iones de hierro. Sin embargo, la capacidad de disminución del metal aumenta y mejora óptima y eficazmente

con el empleo de las BSR inmovilizadas en perlas de gel de alginato de calcio, ejerciendo doble efecto sobre el ion metálico, que ocurre a través de la actividad biológica de las BSR y la acción por parte del gel de alginato de calcio. Por ende, este estudio resulta siendo un aporte en el tema remediación de ambientes contaminados, debido a que el empleo de bacterias inmovilizadas para remover metales está ganando interés en diversos campos biotecnológicos e industriales a nivel mundial.

VI.- CONCLUSIONES

- Se determinó la capacidad de los 11 cultivos mixtos de BSR libres e inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio de disminuir iones de hierro en solución, lo cual fue evidenciado por una disminución máxima del 60.8% y 94%, respectivamente.
- Se determinó que los cultivos mixtos de BSR inmovilizados en perlas de gel de alginato de calcio ((C₁₂H₁₄O₁₂Ca)_n) presentan mejor efectividad sobre los iones de hierro (Fe) a diferencia de los cultivos mixtos de BSR libres, siendo esto demostrado por una mejora máxima en la disminución del 90.3%, lo que permite considerar a las BSR inmovilizadas como la mejor alternativa aplicativa entre todas.
- Se determinó la capacidad de las perlas de gel de alginato de calcio de disminuir iones de hierro en solución, lo cual fue evidenciado por una disminución del 55.2%.
- Se aisló 11 cultivos mixtos de BSR a partir de las 11 muestras de 3 lugares de relaves mineros y lodos, en donde se determinó, mediante características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas, la presencia de 8 especies de BSR en cada uno de los cultivos mixto: *Desulfobacter postgatei*, *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfotomaculum* spp., *Desulfovibrio sapovorans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Desulfovibrio gigas* y *Desulfovibrio baculatus*.

VII.- RECOMENDACIONES

- Realizar estudios con otros metales y a diferentes concentraciones para determinar la capacidad de resistencia y disminución de estos por parte de los cultivos mixtos de BSR libres, cultivos mixtos de BSR inmovilizados y perlas de gel de alginato de calcio.
- Realizar estudios moleculares que permitan una mejor, precisa y detallada identificación y clasificación de las BSR de los cultivos mixtos.
- Realizar la cuantificación de biomasa de BSR libre e inmovilizada.
- Determinar las concentraciones de las 8 especies de BSR identificadas en los 11 cultivos mixtos.
- Realizar estudios sobre la inmovilización de cultivos puros de BSR para evaluar comparativamente la capacidad de disminución de iones de hierro entre estos y los cultivos mixtos BSR inmovilizados.
- Realizar estudios sobre las BSR libres y perlas de gel de alginato de calcio en el mismo medio para evaluar comparativamente la disminución de hierro entre estos y los resultados obtenidos en el presente estudio.
- Estudiar con detalle los procesos de intercambio iónico, quelación y adsorción física que emplean las perlas de gel de alginato de calcio para disminuir iones metálicos.
- Realizar un estudio detallado sobre la caracterización de las perlas de gel de alginato de calcio para determinar el tamaño de sus poros.
- Realizar estudios con diferentes concentraciones de alginato de sodio y cloruro de calcio para determinar su capacidad de disminución de metales e inmovilización bacteriana.

VIII. - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Pacheco S. Determinación de la capacidad biofertilizante de actinomicetos en presencia de metales pesados [tesis de maestría]. Lima (LIM): Cayetano Heredia Univ.; 2016.
- 2) Hutton M, Symon C. The Quantities of Cadmium, Lead, Mercury and Arsenic Entering the U.K. Environment from Human Activities. *Sci Total Environ.* 1986; 57: 129-150.
- 3) Allan R, Salomons W. Heavy metal aspects of mining pollution and its remediation. *J Geochem Explor.* 1995; 52(1-2):1-284.
- 4) Castañé P, Topalián M, Cordero R, Salibián A. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Rev Toxicol.* 2003; 20:13-18.
- 5) Toxqui L, De Piero A, Courtois V, Bastida S, Sánchez F, Vaquero M. Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2010; 25(3): 350-365.
- 6) Zhang W, Jiang H, Dong C, Yan Q, Yu L, Yu Y. Magnetic and geochemical characterization of iron pollution in subway dusts in Shanghai, China. *Geochem Geophys Geosyst.* 2011; 12(6): 1-13.
- 7) Galán E, Romero A. Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla: Rev Soc Españ Miner.* 2008; 10: 48-60.
- 8) Gadd M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology.* 2010; 156(3): 609-643.
- 9) Martínez A, Cruz M, Veranes O, Carballo M, Salgado I, Olivares S, et al. Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Rev CENIC Ciencias Biol.* 2010; 41(4): 1-10.

- 10) Ruggiero M, Gordon D, Orrell T, Bailly N, Bourgoin T, Brusca R, et al. A higher level classification of all living organisms. PLoS ONE. 2015; 10(4): e0119248.
- 11) Hussain A, Hasan A, Javid A, Qazi J. Exploited application of sulfate-reducing bacteria for concomitant treatment of metallic and non-metallic wastes: a mini review. 3 Biotech. 2016; 6(2): 119.
- 12) Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J, Williams S. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Filadelfia: Williams y Wilkins; 1994.
- 13) Castro H, Williams N, Ogram A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol Ecol. 2000; 31(1): 1-9.
- 14) Daly K, Sharp R, McCarthy A. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. Microbiology. 2000; 146(7): 1693-1705.
- 15) Mormontoy J. Comparar la producción de sulfuro de hidrógeno y la sobrevivencia a diferentes pH en cultivos puros y cultivos mixtos de relaves mineros de Buenaventura y Pantanos de Villa [tesis de licenciatura]. Lima (LIM): Cayetano Heredia Univ.; 2011.
- 16) Barton L, Tomei F. Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. En: Baron L, editor. Sulfate-reducing bacteria. New York: Plenum Press; 1995. p. 1-32.
- 17) Okabe S, Characklis W. Effects of temperature and phosphorous concentration on Microbial Sulfate Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. Biotechnol Bioeng. 1992; 39(10): 1031-1042.
- 18) Dilling W, Cypionka H. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1990; 71(1-2): 123-127.

- 19) Postgate J. Versatile medium for the enumeration of sulfate-reducing bacteria. *Appl Microbiol.* 1963; 11(3): 265-267.
- 20) Gibson A. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J Appl Bacteriol.* 1990; 69(6): 769-797.
- 21) Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock, biology of microorganisms. 10 ed. Pearson; 2004.
- 22) Mormontoy J, Hurtado J. Hydrogen sulphide production at alkaline, neutral and acid pH by a bacterial consortium isolated from Peruvian mine tailing and wetland. *Adv Mater Res.* 2013; 825: 384-387.
- 23) Cabrera G, Pérez R, Gómez J, Abalos A, Cantero D. Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio* sp. strains. *J Hazard Mater.* 2006; 135(1-3): 40-6.
- 24) Garzón C, Barragán B. Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Rev Sist Ambient.* 2008; 2(1): 23-34.
- 25) Fukuda H. Immobilized microorganism bioreactors. En: Asenjo J, Merchuk J, editores. *Bioreactor system design.* New York: Marcel Dekker; 1995. p. 339-375.
- 26) Martínez M, García M. Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Rev Mex Ing Quim.* 2012; 11(1): 55-73.
- 27) Strand B, Mørch Y, Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Minerva Biotec.* 2000; 12: 223-233.
- 28) Davis T, Volesky B, Mucci A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.* 2003; 37(18): 4311-4330.

- 29) McHugh D. Production, properties and uses of alginates. En: McHugh D, editor. Production and utilization of products from commercial seaweeds. Roma: FAO Fisheries Technical Paper; 1987. p. 58-115.
- 30) Mørch Y. Novel alginate microcapsules for cell therapy [tesis doctoral]. Trondheim (NOR): Science and Technology Univ.; 2008.
- 31) Lopes da Silva T, Martins J, Carlos da Silva M, Gimenes M, Adeodato M. Alginate and sericin: Environmental and pharmaceutical applications. En: Shalaby E. Biological activities and application of marine polysaccharides. Croacia: InTech; 2017. p. 57-85.
- 32) Oliveira J. Estudio de la biosorción de cobre Cu(II) por perlas de alginato de calcio [tesis de licenciatura]. Lima (LIM): San Marcos Univ.; 2003.
- 33) Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat I, Marchant R, Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. Food Microbiol. 2004; 21(4): 377-397.
- 34) Nadeem U, Datta M. Adsorption studies on Zinc(II) ions on biopolymer composite beads of alginate-fly ash. Eur Chem Bull. 2014; 3(7): 682-691.
- 35) Zhuang S, Wang J. Modified alginate beads as biosensor and biosorbent for simultaneous detection and removal of cobalt ions from aqueous solution. Environ Prog Sustain Energy. 2018; 37(1): 260-266.
- 36) Rowbotham J, Dyer P, Greenwell H, Selby D, Theodorou M. Copper (II)-mediated thermolysis of alginates: a model kinetic study on the influence of metal ions in the thermochemical process of microalgae. Interface Focus. 2013; 3(1): 1-16.
- 37) Samuel J, Pulimi M, Paul M, Maurya A, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Batch and continuous flow studies of adsorptive removal of Cr(VI) by adapted bacterial consortia immobilized in alginate beads. Bioresour Technol. 2013; 128: 423-430.

- 38) Azabou S, Mechichi T, Sayadi S. Zinc precipitation by heavy-metal tolerant sulfate-reducing bacteria enriched on phosphogypsum as a sulfate source. *Miner Eng.* 2007; 20(2): 173-178.
- 39) Garrity G, Brenner D, Krieg N, Staley J. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2 ed. New York: Springer Sciences+Business; 2005.
- 40) Pfennig N, Widdel F, Trüper H. The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. En: Starr M, Stolp H, Trüper H, Balows A, Schlegel H, editores. *The prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. 1ed. New York: Springer; 1981. p. 926-940.
- 41) Funami T, Fang Y, Noda S, Ishihara S, Nakauma M, Draget K, et al. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca^{2+} binding. *Food Hydrocoll.* 2009; 23(7): 1746-1755.
- 42) Vázquez C, Martín A, Isabel de Sioniz M, Serrano S. Técnicas básicas de microbiología - observación de bacterias. *Reduca (Biología) Ser Microbiol.* 2010; 3(5): 15-38.
- 43) Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schrenckenberger P, et al. *Koneman: Diagnóstico bacteriológico, texto y atlas a color*. 6 ed. Argentina: Panamericana; 2006.
- 44) Centromin-Perú. *Manual de trabajo de laboratorio químico*. La Oroya; 1972.
- 45) Hameed M. Continuous removal and recovery of lead by alginate beads, free and alginate-immobilized *Chlorella vulgaris*. *Afr J Biotechnol.* 2006; 5(19): 1819-1823.
- 46) Helgerud T, Gåserød O, Fjæreide T, Andersen P, Larsen C. Alginates. En: Imeson A, editor. *Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. 1 ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010. p. 50-72.

- 47) Lin S-F, Chen Y-C, Chen R-N, Chen L-C, Ho H-O, Tsung Y-H, et al. Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads. *Plos One*. 2016; 11(4): 1-10.
- 48) Nastaj J, Przewłocka A, Rajkowska-Myśliwiec M. Biosorption of Ni(II), Pb(II) and Zn(II) on calcium alginate beads: equilibrium, kinetic and mechanism studies. *Pol J Chem Tech*. 2016; 18(3): 81-87.
- 49) Valderrama L, Zazzali B, Chamorro J, Santander S. Desulfuración de relave mediante la flotación de sulfuros de hierro. *Holos*, 2015; 31(7): 124-131.
- 50) Rittmann B, McCarty P. *Environmental biotechnology: Principles and applications*. Illustrated ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- 51) Fichtel K, Mathes F, Könneke M, Cypionka H, Engelen B. Isolation of sulfate-reducing bacteria from sediments above the deep-subseafloor aquifer. *Front Microbiol*. 2012; 3(65): 1-12.
- 52) Salazar K. Estructura poblacional de bacterias sulfato reductoras y arqueas metanógenas en perfiles sedimentarios de lagunas de aguas blancas y aguas negras de la cuenca amazónica del río Beni [tesis de maestría]. La Paz (LPB): San Andrés Univ.; 2008.
- 53) Sánchez S. Distribución de bacterias sulfato reductoras y metilmercurio en sedimentos de lagunas de inundación del río Beni, Amazonía Boliviana [tesis de maestría]. La Paz (LPB): San Andrés Univ.; 2005.
- 54) Cypionka H. Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annu Rev Microbiol*. 2000; 54: 827-848.
- 55) Brioukhanov A, Pieulle L, Dolla A. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms. En: Mendez A, editor. *Current research, technology and*

education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Badajoz: Formatex Research Center; 2010. p. 148-159.

- 56) Visser M, Parshina S, Alves J, Sousa D, Pereira I, Muyzer G, et al. Genome analyses of the carboxydophilic sulfate-reducers *Desulfotomaculum nigrificans* and *Desulfotomaculum carboxydivorans* and reclassification of *Desulfotomaculum carboxydivorans* as a later synonym of *Desulfotomaculum nigrificans*. Stand Genomic Sci. 2014; 9(3): 655-675.
- 57) Scheid D, Stubner S. Structure and diversity of Gram-negative sulfate-reducing bacteria on rice roots. FEMS Microbiol Ecol. 2001; 36(2-3): 175-183.
- 58) Nilsen R, Torsvik T, Lien T. *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot north sea oil reservoir. Int J Syst Bacteriol. 1996; 46(2): 397-402.
- 59) Pikuta E, Lysenko A, Suzina N, Osipov G, Kuznetsov B, Tourova T, et al. *Desulfotomaculum alkaliphilum* sp. nov., a new alkaliphilic, moderately thermophilic, sulfate-reducing bacterium. Int J Syst Evol Microbiol. 2000; 50(Pt 1): 25-33.
- 60) Widdel F, Pfennig N. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. Arch Microbiol. 1982; 131(4): 360-365.
- 61) Lovely D, Phillips E, Novel processes for anaerobic sulfate production from elemental sulfur by sulfate-reducing bacteria. Appl Environ Microbiol. 1994; 60(7): 2394-2399.
- 62) Brandis A, Gebhard N, Thauer R, Widdel F, Pfennig N. Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfobacter postgatei*. Arch Microbiol. 1983; 136(3): 222-229.
- 63) Hussain A, Qazi J. Application of sugarcane bagasse for passive anaerobic biotreatment of sulphate rich wastewaters. Appl Water Sci. 2016; 6: 205-211.

- 64) Baumgarten A, Redenius I, Kranczoch J, Cypionka H. Periplasmic oxygen reduction by *Desulfovibrio* species. Arch Microbiol. 2001; 176(4): 306-309.
- 65) Petrova O, Tarasova N, Davydova M. Biotechnological potential of sulfate-reducing bacteria for transformation of nitrocellulose. Anaerobe. 2002; 8(6): 315-317.
- 66) Ibáñez J, Umetsu Y. Potential of protonated alginate beads for heavy metals uptake. Hydrometallurgy. 2002; 64(2): 89-99.
- 67) Volesky B. Sorption and Biosorption. 1 ed. Montreal: McGill University; 2003.
- 68) Plaza J. Remoción de metales pesados empleando algas marinas [tesis doctoral]. La Plata (BUE): La Plata Univ.; 2012.
- 69) Fourest E, Volesky B. Contribution of sulphonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of *Sargassum fluitans*. Environ Sci Technol 1996; 30(1): 277-82.
- 70) Yang N, Wang R, Rao P, Yan L, Zhang W, Wang J, et al. The fabrication of calcium alginate beads as a green sorbent for selective recovery of Cu(II) from metal mixtures. Crystals. 2019; 9(5): 255.
- 71) Nită I, Iorgulescu M, Spiroiu M, Ghiurea M, Petcu C, Cintează O. The adsorption of heavy metal ions on porous calcium alginate microparticles. An Univ Bucureşti Chimie. 2007; 1: 59-67.
- 72) McIntire P, Edenborn H. The use of bacterial sulfate reduction in the treatment of drainage from coal mines. Proceeds Am Society Mining Reclamation. 1990: 409-416.
- 73) Martins M, Faleiro M, Barros R, Veríssimo A, Costa M. Biological sulphate reduction using food industry wastes as carbon sources. Biodegradation. 2009; 20(4): 559-567.

- 74) White C, Gadd G. Accumulation and effects of cadmium on sulphate-reducing bacterial biofilms. *Microbiology*. 1998; 144(5): 1407-1415.
- 75) Ayangbenro A, Olanrewaju O, Babalola O. Sulfate-reducing bacteria as an effective tool for sustainable acid mine bioremediation. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1986.
- 76) Hao O, Chen J, Huang L, Buglass R. Sulphate reducing bacteria. *Crit Rev Env Sci Tec*. 1996; 26(2): 155-187.
- 77) Rinzema A, Lettinga G. The effect of sulphide on the anaerobic degradation of propionate. *Environ Technol Lett*. 1988; 9(2): 83-88.
- 78) Simpliciano C, Clark L, Asi B, Chu N, Mercado M, Diaz S, et al. Cross-linked alginate film pore size determination using atomic force microscopy and validation using diffusivity determinations. *J Surf Eng Mater Adv Technol*. 2013; 3(4A): 1-12.
- 79) Kiran M, Pakshirajan K, Das G. Heavy metal removal from aqueous solution using sodium alginate immobilized sulfate reducing bacteria: Mechanism and process optimization. *J Environ Manage*. 2018; 218: 486-496
- 80) Kikot P, Viera M, Mignone C, Denoti E. Study of the effect of pH and dissolved heavy metals on the growth of sulfate-reducing bacteria by a fractional factorial design. *Hydrometallurgy*. 2010; 104(3): 494-500.
- 81) Min X, Chai L, Zhang C, Takasaki Y, Okura T. Control of metal toxicity, effluent COD and regeneration of gel beads by immobilized sulfate-reducing bacteria. *Chemosphere*. 2008; 72: 1086-1091.
- 82) Zhang H, Li H, Li M, Luo D, Chen Y, Chen D, et al. Immobilizing metal-resistant sulfate-reducing bacteria for cadmium removal from aqueous solutions. *Pol J Environ Stud*. 2018; 27(6): 2851-2859.

- 83) Martínez P. Análisis volumétrico de interés farmacéutico: Valoradores automáticos [tesis de licenciatura]. Sevilla (AND): Sevilla Univ.; 2017.
- 84) Vázquez M, Alzate C. Reacción analito [Internet]. Medellín: Programa Integración de Tecnologías de la Información y Comunicación a la Docencia, Universidad de Antioquia; [Actualizado 2010; Consultado 3 Sept 2019]. Disponible en <http://aprendeonline.udea.edu.co/boa/index.php?page=Pages.Objetos.VerObjeto&id=346>.
- 85) Jiménez M, Zarkovic G, Villena G, Gutiérrez M. Efecto de diámetro de esfera y densidad celular en la producción de etanol con levadura inmovilizada en alginato. Rev Colomb Biotecnol. 2011; 13(1): 8-15.
- 86) WikiHow [Internet]. n.d. Como Cultivar Bactéria em uma Placa de Petri. [15 de marzo del 2020]. Disponible en <https://pt.wikihow.com/Cultivar-Bact%C3%A9ria-em-uma-Placa-de-Petri>
- 87) Caballero E [Internet]. n.d. Bacteriología anaeróbica práctica. [15 de marzo del 2020]. Disponible en <https://www.monografias.com/trabajos73/bacteriologia-anaerobica-practica/bacteriologia-anaerobica-practica2.shtml>

ANEXO 1

Medios de Cultivo

1.- Medio Postgate B Caldo (14,15)

Solución A

Sulfato de Magnesio (MgSO_4)	2 g
Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	5 g
Sulfato de Calcio (CaSO_4)	1 g
Cloruro de Amonio (NH_4Cl)	1 g
Agua destilada	400 ml

Solución B

Fosfato di potásico (K_2HPO_4)	0.5 g
Agua Destilada	180 ml

Solución C

Lactato de Sodio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$)	3.5 g
Agua destilada	400 ml

Solución D

Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)	0.1 g
Ácido tioglicólico ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$)	0.1 g
Agua destilada	10 ml

Solución E

Sulfato de hierro (II) (FeSO_4)	0.5 g (500 ppm)
Agua destilada	10 ml

Preparación

- Las cinco soluciones se preparan por separado.
- Ajustar el pH a 7-7.5 de las soluciones A, B, C y D con H_2SO_4 y/o NaOH .
- Autoclavar las soluciones A, B, C y D.
- Mezclar las soluciones A, B, C y D autoclavadas.
- Esterilizar la solución E por filtración.
- Agregar la solución E a la mezcla total de las soluciones A, B, C y D.

2.- Medio Postgate B Agar (14,15)

Solución A

Sulfato de Magnesio (MgSO_4)	2 g
Citrato de Sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	5 g
Sulfato de Calcio (CaSO_4)	1 g
Cloruro de Amonio (NH_4Cl)	1 g
Agua destilada	200 ml

Solución B

Fosfato di potásico (K_2HPO_4)	0.5 g
Agua Destilada	80 ml

Solución C

Lactato de Sodio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NaO}_3$)	3.5 g
Agua destilada	200 ml

Solución D

Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)	0.1 g
Ácido tioglicólico ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$)	0.1 g
Agua destilada	10 ml

Solución E

Sulfato de hierro (II) (FeSO_4)	0.5 g (500 ppm)
Agua destilada	10 ml

Solución F

Agar	15g
Agua destilada	500 ml

Preparación

- Las seis soluciones se preparan por separado.
- Ajustar el pH a 7-7.5 de las soluciones A, B, C y D con H_2SO_4 y/o NaOH .
- Autoclavar las soluciones A, B, C, D y F.
- Mezclar las soluciones A, B, C, D y F autoclavadas.
- Esterilizar la solución E por filtración.
- Agregar la solución E a la mezcla total de las soluciones A, B, C, D y F.

*La preparación del medio Postgate Agar se basa en emplear la mitad de agua destilada en las soluciones pero disolviendo los componentes a una concentración normal para un litro (L). Es decir, se emplea una proporción de 50/50, mitad de agua destilada para el medio Postgate B líquido (Solución A, B, C, D y E) y mitad de agua destilada para el Agar (Solución F), pero agregando los componentes para el volumen total de un litro (L). De esta manera, no se altera las concentraciones finales de los componentes del medio Postgate al momento de mezclarlos.

3.- Medio Hierro-Triple Azúcar Agar (TSI) (1)

Extracto de carne	3.0 g
Pluripeptona	20.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Lactosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10.0 g
Sacarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10.0 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1.0 g
Sulfato de hierro y amonio ((NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂)	0.2 g
Tiosulfato de sodio (Na ₂ S ₂ O ₃)	0.2 g
Rojo de fenol	0.025 g
Agar	13.0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

4.- Medio Base Caldo con Glicerol (14)

Proteasa peptona	10 g
Extracto de carne	1 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Indicador de Andrade	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Como fuente de carbono se utilizó:

Glicerol ($C_3H_8O_3$)	3.5 g
--------------------------	-------

*El indicador de Andrade se agrega después de autoclavar el medio

5.- Medio Base Caldo con Ácido Fórmico (14)

Proteasa peptona	10 g
Extracto de carne	1 g
Cloruro de sodio ($NaCl$)	5 g
Indicador de Andrade	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Como fuente de carbono se utilizó:

Ácido fórmico (CH_2O_2)	2 ml
-----------------------------	------

*El indicador de Andrade se agrega después de autoclavar el medio

6.- Medio Postgate B Modificado Caldo (14)

Solución A

Sulfato de Magnesio ($MgSO_4$)	1.2 g
Citrato de Sodio ($Na_3C_6H_5O_7$)	5 g
Sulfato de Calcio ($CaSO_4$)	1 g
Cloruro de Amonio (NH_4Cl)	0.3 g
Agua destilada	400 ml

Solución B

Fosfato di potásico (K_2HPO_4)	0.5 g
Agua Destilada	180 ml

Solución C

Acetato de Sodio ($C_2H_3NaO_2$)	3.5 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	1g
Agua destilada	400 ml

Solución D

Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$)	0.1 g
Ácido tioglicólico ($C_2H_4O_2S$)	0.1 g
Agua destilada	10 ml

Solución E

Sulfato de hierro (II) ($FeSO_4$)	0.5 g (500 ppm)
Agua destilada	10 ml

Preparación

- Las cinco soluciones se preparan por separado.
- Ajustar el pH a 7-7.5 de las soluciones A, B, C y D con H_2SO_4 y/o NaOH.
- Autoclavar las soluciones A, B, C y D.
- Mezclar las soluciones A, B, C y D autoclavadas.
- Esterilizar la solución E por filtración.
- Agregar la solución E a la mezcla total de las soluciones A, B, C y D.

ANEXO 2

Coloraciones Bacterianas

1.- Coloración Gram (42)

Colorantes

- Cristal Violeta
- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina

Procedimiento:

- Colocar una asada del cultivo bacteriano en una lámina portaobjeto.
- Fijar la muestra de cultivo bacteriano pasando a través de la llama del mechero.
- Agregar cristal violeta, esperar 1 minuto y enjuagar con agua.
- Agregar lugol, esperar 1 minuto y enjuagar con agua.
- Decolorar la muestra fijada con alcohol-acetona y enjuagar con abundante agua.
- Agregar el colorante de contraste, safranina y esperar 40 segundos.
- Enjuagar con agua la muestra.
- Secar la muestra pasando a través de la llama del mechero.
- Observar en el microscopio.

2.- Coloración Shaeffer-Fulton (42)

Colorantes:

- Verde malaquita
- Safranina

Procedimiento:

- Colocar una asada del cultivo bacteriano en una lámina portaobjeto.
- Fijar la muestra de cultivo bacteriano pasando a través de la llama del mechero.
- Agregar verde malaquita y calentar pasando a través de la llama del mechero durante 10 minutos. Evitar que la muestra hierva y añadir más colorante si éste se evapora. Es importante que la muestra no se seque.
- Dejar enfriar la muestra por 1 o 2 minutos.
- Lavar la muestra con agua.
- Agregar el colorante de contraste, safranina y esperar 30 segundos
- Lavar con agua.
- Secar la muestra pasando a través de la llama del mechero.
- Observar en el microscopio.

ANEXO 3

Titulación

1.- Titulación con Dicromato de Potasio (43)

Reactivos:

- Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 0.1 N, disuelta al 75%.
- Ácido clorhídrico 1M (HCl)
- Cloruro estañoso 0.2 M ($SnCl_2$)
- Cloruro mercuríco 5% ($HgCl_2$)
- Solución fosfo-sulfúrica (ácido fosfórico concentrado y ácido sulfurico concentrado)
- Difenilamina 1%

Procedimiento:

- Medir y colocar 5 ml de la muestra en un vaso beacker.
- Añadir 5 ml de ácido clorhídrico 1M (HCl).
- Añadir gota a gota cloruro estañoso 0.2 M ($SnCl_2$) hasta que la solución se decolore.
- Añadir 10 ml de cloruro mercuríco 5% ($HgCl_2$).
- Añadir 10 de solución fosfo – sulfúrica
- Añadir 3 gotas de indicador difenilamina 1%
- Titular la solución hasta el primer cambio de color a azul-violeta.
- Hacer los cálculos empleando la fórmula y convertir el resultado de gFe/L a ppm.

Fórmula:

$$\text{ppm : g Fe/L} = \frac{\text{ml de Titulante Gastado} \times \text{Factor de la Solución de Dicromato de Potasio} \times 1000}{5}$$

ANEXO 4

Estandarización del Método de Determinación de Hierro (Fe) en Solución

Factor de Solución de Dicromato de Potasio

$\text{ppm: } \frac{\text{g Fe/L} = \text{ml de Titulante Gastado} \times \text{Factor de la Solución de Dicromato de Potasio} \times 1000}{5}$

1.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 0.14 g Fe/L (140 ppm)

Valor de Titulante de Dicromato de Potasio: 0.5 ml

$$0.14 \text{ g Fe/L} = \frac{0.5 \text{ ml Titulante Gastado} \times \text{Factor de la Solución de Dicromato de Potasio} \times 1000}{5}$$

Factor de la Solución de Dicromato de Potasio = 0.0014

2.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 0.25 g Fe/L (250 ppm) = 0.0014

3.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 0.5 g Fe/L (500 ppm) = 0.0014

4.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 1 g Fe/L (1000 ppm) = 0.0014

5.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 1.4 g Fe/L (1400 ppm) = 0.0014

6.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 2 g Fe/L (2000 ppm) = 0.0014

7.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 2.4 g Fe/L (2400 ppm) = 0.0014

8.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 2.8 g Fe/L (2800 ppm) = 0.0014

9.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 3 g Fe/L (3000 ppm) = 0.0014

10.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 3.2 g Fe/L (3200 ppm) = 0.0014

11.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 3.6 g Fe/L (3600 ppm) = 0.0014

12.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 4 g Fe/L (4000 ppm) = 0.0014

13.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 5 g Fe/L (5000 ppm) = 0.0014

14.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 6 g Fe/L (6000 ppm) = 0.0014

15.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 7 g Fe/L (7000 ppm) = 0.0014

16.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 8 g Fe/L (8000 ppm) = 0.0014

17.- Muestra Patrón de Hierro (Fe): 9 g Fe/L (9000 ppm) = 0.0014