

15

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**Algunos Aspectos Sobre el Aislamiento y Cultivo de
Thiobacillus Ferrooxidans.**



T E S I S

SILVIA DOMINGUEZ PARRA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

México, D.F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1978
CLAS.
ABG. ~~M. 120~~ 122 125
FECHA
REC.
S.



Jurado asignado originalmente según el tema.

PRESIDENTE, Prof. Alfredo Echegaray Alemán.

Vocal, Profa. Lilia Vierna García.

SECRETARIO, Prof. Sergio Palacios Mayorga.

1er. Suplente, Prof. Jorge Soto Soria

2do. Suplente, Profa. Beatriz Luna Millan.

Sitio donde se desarrollo el tema: Instituto de Geología .

sustentante. Silvia Domínguez Parra.

asesor de Tema. M. en C. Sergio Palacios Mayorga.

Agradesco:

**M. en C. Sergio Palacios Mayorga, por su atinada
asesoría, revisión y crítica.**

**Al Instituto de Geología y, especialmente al per
sonal de Edafología, Sección Biología de Suelos,
por las facilidades recibidas durante la realiza
ción de mi Servicio Social.**

Mecanografía: Ma. de los Angeles Flores Linares.

Dibujo: Hugo Domínguez Parra.

Dedico:

Con mi amor

A mi familia: Hugo, Dora y Hugo.

A: Marlene y Dietrich Rall.

Y, a todos aquellos amigos, maestros y personas
que de alguna u otra forma han participado en
el proceso de descubrir cada vez, algo para mi
todavía enigmático, ¡ La Vida !

Para que pueda ser he de ser otro,
salir de mí, buscarme entre los otros,
los otros que no son si yo no existo,
los otros que me dan plena existencia.

Octavio Paz

C o n t e n i d o .

	paginas
I. Introducción	1 - 2
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	3 - 49
1. Distribución de <u>T. ferrooxidans</u> en la naturaleza.	3 - 5
2. Antecedentes Taxónomicos y Características de las bacterias ferrooxidantes del género <u>Thiobacillus</u> .	5 - 28
2.1 Consideraciones Taxónomicas actuales.	13 - 14
2.2 Características Fisiológicas	
2.2.1 Autotrofismo	15 - 16
2.2.2 Mecanismo de oxidación del Fe	15
2.2.3 " " " " Azufre	16 - 19
2.2.4 " " " " Tiosulfato.	19 - 21
2.2.5 Heterotrofismo.	21 - 28
2.2.6 Efecto de los Compuestos Orgánicos.	
2.2.7 Energía Almacenada y fijación del CO ₂ .	
3. Aislamiento y cultivo de <u>T. ferrooxidans</u>	29 - 46
3.1 Técnicas de Aislamiento.	29 - 31
3.2 Medios de Cultivo	32 - 39
3.2.1 Líquidos	32 - 38
3.2.1.1 Fuente de energía Fe	
3.2.1.2 " " " Azufre.	
3.2.1.3 " " " Tiosulfato.	
3.2.2 Sólidos.	38 - 39
3.3 Efecto de Nutrimientos	39
3.3.1 Nitratos.	39
3.3.2 Urea.	40

3.3.3	Otras fuentes de nitrógeno	40
3.3.4	Sulfato de amonio	41
3.3.5	Fosfóro.	42
3.3.6	Magneseo	43
3.3.7	Cloruro	44
3.3.8	Potasio	44
3.3.9	Calcio	45
3.3.10	Trazas de cationes Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{3+} , B , Co^{2+} .	45
3.3.11	Otros nutrimentos	45 - 46
4.	Estimación del crecimiento bacteriano	46 - 49
4.1	Métodos directos.	46
4.1.1.	Cuenta Directa (Placa de Petroff y Hausser).	46
4.1.2	Microscopio Optico.	46
4.1.3	Microscopio electrónico.	46
4.2	Métodos Indirectos	46
4.2.1	Estimación de la oxidación del sustrato azufre.	47
4.2.1.1	Método volumétrico	47
4.2.1.2	" colorimétrico.	47
4.2.1.3	" de absorbancia ultravioleta.	48
4.2.2	Estimación de la oxidación del sustrato azufre.	48
4.2.3	Estimación de la oxidación del sustrato tiosulfato.	48
4.2.4	Método de las diluciones.	49
III.	MATERIALES Y METODOS.	50 - 55
1.	Cepas bacterianas.	50

2.	Medios de Cultivo	50
	A) Líquidos	52 - 53
	Modificaciones	
	a) Cambios de la fuente de nitrógeno.	53
	b) Sustitución y eliminación de nutrientes en el medio de cultivo.	53
	c) Cambios en la concentración original de los constituyentes.	
	d) Adiciones de glucosa	53
	B) Sólido	53 - 54
3.	Aislamiento y purificación de los cultivos.	54
4.	Mantenimiento de las cepas bacterianas	54
b 5.	Inóculo	54
6.	Condiciones de incubación	54
7.	Estimación del crecimiento en los medios de Cultivo.	54
	a) Cualitativa	
	b) Cuantitativa	
8.	Crecimiento bajo condiciones de microaerofilia.	55
9.	pH	55
10.	Tinciones	55
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	56 - 59
V.	CONCLUSIONES	70 - 72
VI.	BIBLIOGRAFIA	73 - 76

I. INTRODUCCION.

Las bacterias ferroxidantes fueron aisladas y caracterizadas por primera vez por Colmer et al. (1947), a partir de aguas ácidas de minas de carbón bituminoso. Otros investigadores, Bryner et al. (1954), (1959) y Beck (1960), las aislaron de aguas ácidas provenientes de minas de cobre encontrándolas, además, relacionadas con depósitos de otros sulfuros metálicos.

El habitat de éste grupo de bacterias se ha caracterizado por presentar concentraciones relativamente altas de sulfatos de fierro ferroso, aluminio y magnesio, así como una elevada acidez.

Colmer et al. (1951) clasifican taxonómicamente por primera vez estas bacterias, reportándolas bajo el nombre de Thiobacillus ferrooxidans. Estos thiobacilli oxidan el fierro ferroso vigorosamente a un pH sumamente ácido, en el cual resulta muy difícil la oxidación provocada por el oxígeno del aire.

Los estudios de Leathen (1956) originaron una división en la clasificación de estas bacterias, dando lugar a la creación del género Ferrobacillus con las especies ferrooxidans y sulfooxidans.

Esta división se basó en la distinta capacidad que tiene cada una de las especies para oxidar iones ferrosos, tiosulfato, o azufre elemental, quedando establecido que, Thiobacillus ferrooxidans capaz de crecer en medios de cultivo que contienen tiosulfato, fierro ferroso, o azufre como fuentes de energía Colmer et al. (1950), Temple et al. (1951).

Ferrobacillus ferrooxidans es incapaz de crecer en un medio que contenga azufre, o tiosulfato, Leathen et al. (1956). Sin embargo, crece en presencia de fierro ferroso, Leathen et al. (1954); y Ferrobacillus sulfooxidans que posee la capacidad de oxidar el azufre elemental y tio--

sulfato, además del ión ferroso, Kinsel (1960), Beck (1960).

Entre otros autores, Unz et al. (1960), plantearon la necesidad de una revisión taxonómica de estas tres especies y propusieron que el género *Ferrobacillus*, décima categoría genérica de la familia Siderocapsacea, con las especies ferrooxidans y sulfooxidans, se aboliera y colocara dentro del género Thiobacillus, quinto género de la familia Thiobacteriaceae, con una sola especie, ferrooxidans.

Actualmente ésta revisión ha sido realizada y aparece en Bergey - (1974). La importancia de la aplicación de las bacterias ferrooxidantes del género Thiobacillus ha sido enfocada, en los últimos años, principalmente hacia la biolixiviación microbiológica de minerales de baja ley, - destacando aquellos orientados hacia el beneficio de cobre, Bryner et al. (1958), Hiromichi et al. (1976); zinc, Duncan (1964); níquel, Duncan -- (1967); cobalto, Moshayata et al. (1976), molibdeno y uranio, Macgregor (1966), entre otros minerales.

En el presente trabajo se estudian algunas de las características fisiológicas y culturales de tres cepas de bacterias ferrooxidantes aisladas a partir de ambientes mexicanos, con el propósito de que el conocimiento de sus características más sobresalientes y las condiciones óptimas de cultivo, permitan utilizarlas en trabajos futuros sobre biolixiviación de minerales.

La falta de trabajos publicados en nuestro país relativos al aislamiento, caracterización y estudio fisiológico de bacterias de este género motivó, aún más, el interés por la realización de la presente investigación.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1. Distribución de Thiobacillus ferrooxidans en la Naturaleza.

Estas bacterias quimioautótroficas, capaces de oxidar fierro ferroso, se han aislado de numerosos lugares asociándoseles a menudo con habitats tales como: A) minas de carbón bituminoso, B) aguas ácidas de minas de cobre, C) depósitos de sulfuros metálicos, D) suelos.

A) Las aguas de minas de carbón se caracterizan por la relativa alta concentración de sulfato de fierro ferroso, manganeso, así como de aluminio entre otros compuestos importantes. La acidez de las agua de minas se debe al contenido, relativamente alto, de ácido sulfúrico; Hodges (1937) en Kuznetov et al. (1963), citó los siguientes valores de pH característicos de aguas de minas de Pensilvania (EEUU), 1.7, 2.0, 2.1, 2.9, 3.3 y - 5.5, los cuales indican la alta acidez que caracteriza a las aguas provenientes de estas minas.

Kuznetov et al. (1963), señalaron que las regiones que presentan un alto contenido en carbón bituminoso, constituyen el ambiente natural de las bacterias ferrooxidantes del género Thiobacillus y, en especial, de Thiobacillus ferrooxidans. Entre los autores que reportan la presencia de Thiobacillus ferrooxidans en este habitat están: Colmer et al. (1950), Temple et al. (1951), Ashmeed (1955), este último autor aisló esta bacteria de minas de carbón en Escocia; Leathen et al. (1956) Fjerdingsstad (1956) en Kuznetov et al. (1963) la aisló de minas de carbón localizadas en la parte oeste de Dinamarca; Lyalikova et al. (1959) en Kuzntov et al. (1963), aislaron este tipo de bacterias a partir de minas de carbón en Moscú y en el Valle de Kiselov (URRS). Las aguas de estas minas, de acuerdo a Lyalikova et al. (1959), tuvieron un contenido mayor de 100 mg/l de sulfatos y 320 mg/l de fierro, con un pH ácido, siendo estas con-

diciones muy favorables para el desarrollo de las bacterias ferrooxidantes.

Kinsel (1960) y Unz et al. (1960), reportaron la existencia de Ferrobacillus sulfooxidans, Ferrobacillus ferrooxidans y Thiobacillus ferrooxidans en aguas ácidas de una mina de carbón de Pensilvania (EEUU).

B) La presencia de bacterias ferrooxidantes pertenecientes al género Thiobacillus en minas de cobre, ha sido reportada por: Bryner et al. (1954); quien fué el primero que aisló Thiobacillus ferrooxidans a partir de aguas ácidas residuales, provenientes de minas de cobre localizadas en Bigham Canyon Utah (EEUU).

Bryner et al. (1958), las aislaron a partir de minas de cobre de Cananea, Sonora (México). Zimmerley (1959) en Kuznetov et al. (1963), mencionó este mismo tipo de bacterias aisladas también de aguas ácidas de minas de cobre mexicanas. Rhuasen (1958) en Kuznetov et al. (1963), las aisló de la mina Outokumbo al norte de Karelia (URRS). Lyalikova (1959), (1960), (1961), y (1962), en Kuznetov et al. (1963), las localizó en aguas de afluentes y en aguas estancadas en la región de Barok y Yoroslavi Oblast (URRS), detectandose en estas aguas, pequeñas concentraciones de sulfuro de hidrógeno y fierro, y un pH de 6.5; estos investigadores piensan que un pH más ácido provoca la existencia de microzonas en las cuales I. ferrooxidans se desarrolla y el fierro está como ión ferroso debido a la presencia de sulfuro de hidrógeno.

Beck (1960), es otro autor que reporto la existencia de este mismo tipo de bacterias en el mismo ambiente, Audesley et al. (1961), encontraron estas bacterias en una mina de cobre en Inglaterra. Kramenko (1962), las aisló de la mina Dzhezkazgan URRS y Lazarroff (1962) de una mina de Columbia Británica, Cánada.

C) En depósitos de minerales sulfurosos este tipo de bacterias han sido aisladas por Lyalikova (1959), (1960), (1961), en Kuznetov et al. (1963); este investigador describió la presencia de Thiobacillus ferrooxidans en depósitos de minerales de cobre y níquel en la URRS. Kramenko (1962), Moshnya et al. (1971), Brock (1974), la aislaron a partir de mezclas de materiales piríticos de plomo y zinc, localizados en Wisconsin, EEUU.

D) Gleen (1950), observó la oxidación de sulfato ferroso en el suelo debido a la acción de bacterias ferrooxidantes del género Thiobacillus, sin embargo, no mencionó el tipo de suelos con los que trabajó.

2. Antecedentes Taxónomicos y Características de las bacterias ferrooxidantes del género Thiobacillus.

Debido a la estrecha semejanza de caracteres, tanto morfológicos como fisiológicos, es difícil la diferenciación de las bacterias ferrooxidantes en especies, o aún, establecer la validez de ésta. De ahí que, en los últimos años, la taxonomía de los thiobacilli ferrooxidantes ha resultado de interés y ha sido estudiada, entre otros investigadores, por Hutchinson et al. (1965, 1966, 1967); Beer et al. utilizaron un análisis numérico multivariable, basado en cerca de 100 o más propiedades fenotípicas de una pequeña porción del genoma bacteriano. Este método no permite adecuadas interpretaciones, ya que no relaciona directamente todas las especies del género Thiobacillus, siendo algunas anaerobias, aerobias, acidófilas o bien basófilas.

Otra forma de estudiar las interrelaciones entre microorganismos de este género, es comparando la composición base de su complemento de DNA. Este método tiene una ventaja sobre el análisis multivariable, ya que la composición de los thiobacilli puede hacerse directamente sobre las

bases del genoma. Esto ha sido comprobado experimentalmente por Jackson et al. (1968), quienes extrajeron el DNA de varias especies de Thiobacillus, y examinarón la composición del DNA de catorce cepas auténticas del género Thiobacillus, entre las cuales están: I. ferrooxidans, I. thioparus, I. thiooxidans, I. concretivorus, I. neapolitanus, I. thioanooxidans, I. dinitrificans, I. novellus, y I. trautwenii. En el exámen de la composición del DNA de estas cepas se encontró una variación en la relación G + C (guanina + citosina) del 51 al 68 % mol. El porcentaje para distintas cepas es el siguiente: I. thiooxidans y I. concretivorus de 51 a 52; I. neapolitanus y I. ferrooxidans de 56 a 57; I. thioparus, I. thioanooxidans, I. denitrificans, I. novellus y I. traueinii de 62 a 68 % mol. De esta manera la introducción al estudio de la composición base Agate et al. (1973), publicaron una clasificación para los thiobacilli basada en el distinto contenido de lípidos que posee cada miembro del género. Estas diferencias se determinaron por la variación en el contenido de ácidos grasos metil esterés (perfil FAME).

Clasificación del género Thiobacillus basado en el contenido de nucleótidos y lípidos.

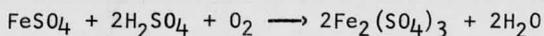
Fraciones G + C del DNA

Perfil FAME	50-52 moles %	56-57 moles %	62-68 moles %	No determinado.
tipo I		<u>I. neapolitanus</u> <u>I. ferrooxidans</u>		
tipo II			<u>I. thioparus</u> <u>I. novellus</u>	<u>I. denitrificans</u> <u>I. intermedius</u>
tipo III	<u>I. thiooxidans</u>			<u>T. perometabolis</u>

Los primeros estudios realizados acerca de bacterias ferrooxidantes pertenecientes al género Thiobacillus, fueron realizados por Colmer et al. (1947). Estos investigadores llegaron al descubrimiento de I. ferrooxidans, en forma accidental, durante el estudio de otra especie de este género I. thiooxidans, especie que normalmente habita las aguas ácidas provenientes de minas de carbón bituminoso.

En sus estudios, estos investigadores encontraron que las aguas de mina se caracterizaban por contener sulfato ferroso el cual, al ser oxidado a sales férricas, les confería un color rojizo característico. Básandose en pruebas con antisépticos como cloruro mercúrico, fenol y formaldehído, llegaron a la conclusión que la oxidación ocurrida en las aguas de minas era de origen biológico, excluyendo una posible oxidación química del ión ferroso en este ambiente. Ambos autores descartaron a Thiobacillus thiooxidans como el posible responsable de ésta oxidación, ya que esta bacteria actúa solo sobre el azufre, transformándolo en ácido sulfúrico; causante de la acidez de estas aguas de minas. En base a esto, presumieron la presencia de otro tipo de bacterias que podrían utilizar al sulfato ferroso de este habitat ácido.

Colmer et al. (1947) caracteriza a estas bacterias como: gran negativas, redondas, no esporuladas, con un tamaño de 0.4 x 0.8 a 1.0 micras; llegando a la conclusión que esta nueva especie del género Thiobacillus era capaz de realizar la oxidación del Fe^{2+} por la siguiente reacción:



Sin embargo, estos autores no lograron identificar y caracterizar completamente a esta nueva especie. Estos mismos autores (Colmer et al. (1951), sugirieron el nombre de Thiobacillus ferrooxidans para este tipo de bacterias, describiendo la morfología colonial de esta bacteria, en medio agar-hierro ferroso, la cual varió en su morfología de acuerdo a la

concentración del sulfato ferroso del medio sólido, resultando colonias de color ámbar, redondas cuando se usaron bajas concentraciones de Fe^{2+} . Mientras que a moderadas concentraciones las colonias presentaron una zona de color ambar que reveló la presencia de colonias lobuladas, microscópicas, con áreas coloridas, cubiertas con hidróxido férrico hidratado. - Estos mismos investigadores informaron que, a elevadas concentraciones de fierro ferroso, se observaron colonias abundantes que llegaron a presentar una costra dura de óxido férrico hidratado.

Leathen (1952), aisló una bacteria de aguas ácidas de minas la cual básicamente no mostró diferencias morfológicas a la aislada por Colmer et al. (1947), sin embargo, este autor encontró las siguientes nuevas características: tamaño de 0.6 a 1.0 micras, móvil, con posible flagelo polar. Este investigador reportó una activa movilidad en esta especie la cual, en estudios posteriores realizados por Silverman et al. (1959), no fue confirmada.

Leathen (1952), utilizando sílica gel con fierro ferroso, observó colonias semejantes a huevos, elevadas; de color que variaba desde el crema al pardo rojizo cuando jóvenes, mientras que las colonias viejas se convierten en granulares y de color pardo oscuro. Este investigador llegó a la conclusión que la nueva bacteria aislada por ellos, oxidaba fierro ferroso dentro de los mismos valores de pH (2.0 - 4.5), que los informados para Thiobacillus ferrooxidans. Sin embargo, la nueva especie aislada era capaz de crecer en hiposulfito. En base a ésta nueva característica fisiológica presente en esta especie ferrooxidante, Leathen et al. (1952), designó a esta bacteria con el nombre de Ferrobacillus ferrooxidans.

De acuerdo con estos investigadores, el género Ferrobacillus (perteneciente a la familia Siderocapsaceae) se creó para separar a los thio

bacilli, que oxidan fierro ferroso, de los oxidadores del azufre.

Temple et al. (1953) en sus estudios de caracterización de Thiobacillus ferrooxidans, indicaron nuevamente la habilidad de ésta especie para oxidar rápidamente iones ferrosos en soluciones ácidas y, además, indicaron la capacidad de ésta bacteria para crecer en medio de cultivo inorgánicos conteniendo tiosulfato, pero incapaces de crecer en azufre elemental.

Bryner et al. (1958), comprobaron los datos microscópicos obtenidos por Colmer et al. (1947, 1951) y Leathen et al. (1952, 1954).

Silverman et al. (1959), reportaron que, por lo regular, las células bacterianas de I. ferrooxidans fueron difíciles de teñir, tiñiéndose escasamente con carbol fuscina, safranina, verde malaquita, cristal violeta, azul violeta, café de bismarck o anilina azul. La presencia de flagelos fue comprobada por estos autores, sin embargo, detectaron una débil movilidad durante la cuenta celular, así como una débil pero significativa oxidación de azufre en medio de cultivos líquidos.

Beck (1960), reportó una bacteria análoga a I. ferrooxidans, de 0.5 a 0.7 micras de diámetro. Para sus tinciones utilizó células de cultivos líquidos, encontrando que las células se teñían debilmente con colorantes básicos y muy fuertemente con colorantes ácidos.

Unz et al. (1960), encontraron características análogas para ésta especie, ampliando la escala de tamaño de ésta especie a 1.5 micras y notando, también movilidad en las células, la cual fué observada en células de cultivos jóvenes con azufre o tiosulfato como fuente de energía. Estos autores señalaron que al tratarse las células bacterianas con nigrosina se tiñieron con dificultad y que la presencia de colonias microscópicas de I. ferrooxidans, obtenidas en el medio de cultivo sólido $9k\text{-Fe}^{2+}$ agar, indican el escaso éxito que obtuvieron en este medio de cultivo sólido.

Kinsel (1960) aisló una nueva especie bacteriana, Ferrobacillus sulfooxidans, describiéndola como una bacteria gram negativa, con un tamaño de 0.5 por 1.0 a 1.5 micras, no esporulada y móvil. La presencia de flagelos no pudo ser detectada por el uso de tinciones simples. Las colonias de Ferrobacillus sulfooxidans en el medio de hierro-agar se definieron de forma circular, con margen entero, observándose, en el centro de la colonia, un área roja y elevada o punto oscuro de hierro oxidado. Mientras que en medio tiosulfato-agar las colonias fueron claras, irregulares con margen ondulado, sin material precipitado en o alrededor de las colonias.

Lundgren et al. (1964), Remsen et al. (1966), Mohoney et al. (1964), indicaron que Thiobacillus ferrooxidans posee una estructura análoga a algunas bacterias heterótrofas gram negativas.

Shafia et al. (1969), utilizando modificaciones del medio 9k líquido Silverman et al. (1959), logró un medio a base de glucosa, al que denominaron FeG (medio líquido Fe^{2+} -glucosa suplementado con una solución de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ al 2 %).

Dichos autores reportaron el crecimiento de células de Ferrobacillus ferrooxidans adaptadas a glucosa, después de una incubación de cuatro días en medio sólido y en condiciones de humedad controlada, obtuvieron colonias circulares, de 1 a 2 mm de diámetro, húmedas, convexas, brillantes, con bordes enteros, siendo desde ligeramente rosadas a fuertemente rosadas, lo cual dependió de la edad del cultivo analizado. Las características microscópicas de éstas células crecidas en glucosa, difieren de las crecidas autotróficamente, las cuales tienden a ser células en forma de cocobacilos, de 0.8 a 1.2 por 1.2 a 2.0 micras de largo, frecuentemente en pares y, ocasionalmente, en cadenas cortas de 4 a 5 células, con una vacuola contráctil la cual se tiñe eventualmente.

El crecimiento heterotrófico de Ferrobacillus ferrooxidans indica, de acuerdo a las características tintoreales, que es un acidófilo obligado.

Lacey et al. (1970), empleando microscopía óptica con una resolución máxima de 2500 Å, reportaron que Thiobacillus ferrooxidans es realmente visible bajo un poder de resolución de 1000 Å. En sus observaciones con microscopio electrónico, estos investigadores encontraron que los thiobacilli ferrooxidantes son visibles bajo un poder de resolución de 200 a 4000 Å.

La microscopía electrónica ha permitido ratificar las observaciones de Leathen et al. (1951), en cuanto a que I. ferrooxidans posee un flagelo polar. Kuznetov et al. (1963) y Avaykyan et al. (1970), en sus estudios de microscopía electrónica utilizando poderes de resolución de 4500 Å, indicaron que las células de I. ferrooxidans presentan inclusiones de 2 a 3 cuerpos redondos cuyo tamaño puede ser de 160 a 190 Å las cuales, de acuerdo a su tamaño, pueden corresponder a ribosomas.

Estos mismos autores también reportaron la presencia de grandes inclusiones con dimensiones de 100 a 800 x 500 a 700 Å, que se asociaron, en su mayoría, con el aparato nuclear.

Existen también inclusiones de 700 a 1300 x 2600 Å, cubiertas por membranas cuya naturaleza y función se desconoce, sin embargo, estos autores han propuesto que se trata de inclusiones de 200 a 300 Å conteniendo, probablemente, polimetfosfatos.

Estos autores propusieron, además, que la estructura de I. ferrooxidans no es estrictamente igual a la que presentan otras bacterias gram negativas.

La pared celular de las bacterias gram negativas de diferentes gru

pos, poseen un número variable de capas osmofílicas y osmofóbicas. Debido a esto, se ha observado que I. ferrooxidans y I. thiooxidans, de acuerdo a la naturaleza de la estructura que presentan sus paredes celulares, se encuentran íntimamente relacionadas entre sí, así como con la pared celular de E. Coli, Nitrobacter y Nitrosomonas (Avakyan et al. (1970). Estos mismos investigadores observaron en células de I. ferrooxidans teñidas, una capa densa intermedia característica de las bacterias gram negativas, la cual confirma los resultados obtenidos años antes por Colmer et al. (1947), Leathen et al. (1951) y Beck (1960).

De acuerdo con Murray et al. (1965), (en Avakyan et al. (1970), indican que esta capa intermedia se comporta como si fuera el sitio principal de mucopéptidos de la pared celular (el mucopolímero), y representa los componentes que determinan la rigidez y forma de la célula. Además, estos investigadores indican que es posible que ésta capa tenga un importante papel en la permeabilidad celular. Sin embargo, la fina estructura y funciones de la pared celular de I. ferrooxidans, así como en otras bacterias, aún no se han resuelto. Sobre la membrana plasmática de este microorganismo, estos investigadores reportaron que es análoga a la de otras bacterias gram negativas, constituidas por tres capas; dos electródenensas de aproximadamente 15 a 20 Å, y una electrótransparente de 20 a 25 Å de espesor.

Avakyan et al. (1970), encontraron que las membranas intracelulares de I. ferrooxidans, son estructuras que rodean el protoplasma y que ellas, probablemente representan paquetes de membranas asociados con la membrana plasmática o con una prolongación de ella y que, posiblemente, estas membranas sean autónomas y correspondan al lugar donde se efectúa la síntesis de novo en cada célula.

Estos autores creen, además, que estas estructuras de la membrana

de I. ferrooxidans son similares a las estructuras que presentan las bacterias fotosintéticas o a las estructuras de la membrana presente en bacterias nitrificantes y en aquellas que llevan a cabo oxidaciones. Estos autores establecieron que, quizá, la presencia de éstas estructuras de la membrana, altamente desarrolladas en estas bacterias, puedan estar relacionadas con la forma de vida quimioautotrófica o a la fotoautotrófica, debido a que las enzimas responsables de la oxidación de sustancias inorgánicas como azufre y sales ferrosas, pueden localizarse en estas membranas.

El aparato nuclear de Thiobacillus ferrooxidans se caracteriza por un considerable polimorfismo celular, el cual puede explicarse por el paso de la bacteria a través de etapas en su desarrollo. Las células jóvenes crecen intensamente, se dividen por constricción, siendo el proceso principal por el cual se divide este tipo de bacterias. Kuznetov et al. (1963) indicó la división lateral como el tipo de reproducción que lleva a cabo I. ferrooxidans.

Avaykan et al. (1970) observaron, también cambios en el medio ambiente, los cuales provocaron cambios en la citología y morfología celular.

2.1 Consideraciones Taxonómicas actuales.

Por lo que se refiere específicamente a los thiobacilli ferrooxidantes, entre otros autores, Unz et al. (1960), consideraron necesaria una nueva revisión taxonómica, debido a que indicaron la capacidad que posee Thiobacillus ferrooxidans para utilizar azufre elemental, y a la habilidad de Ferrobacillus ferrooxidans para llevar a cabo la oxidación, tanto de azufre elemental como de tiosulfato.

Debido a que ambas bacterias son indistinguibles morfológicamente, su diferenciación se ha basado en sus necesidades nutricionales, sin embargo, Unz et al. (1960), indican que estos factores no son suficientes.

Ferrobacillus ferrooxidans parece diferir de Thiobacillus ferrooxidans, sólo en el grado en que cada una de las bacterias utiliza el tiosulfato. Thiobacillus ferrooxidans, de acuerdo a algunos autores, es capaz de oxidar tiosulfato de sodio.

Kinsel (1960), aisló e identificó otra especie ferrooxidante, a la cual denominó Ferrobacillus sulfooxidans, este nuevo tipo de bacterias difiere de Thiobacillus ferrooxidans y Ferrobacillus ferrooxidans, en su habilidad por oxidar, además Fe^{2+} , azufre elemental con lo cual se parece a Thiobacillus thiooxidans.

Estas analogías, tanto morfológicas como fisiológicas, confirmaron la necesidad de la revisión taxonómica de este tipo de bacterias ferrooxidantes las cuales, en un principio, se clasificaron en tres géneros distintos y pertenecientes a dos familias, Thiobacillus ferrooxidans (quinto género de la familia Thiobacteriaceae) y Ferrobacillus (décima categoría generica de la familia Siderocapsaceae) con las especies ferrooxidans y sulfooxidans.

Unz et al. (1960), indicaron la necesidad de la desaparición de este último género y su incorporación dentro del género Thiobacillus.

Esta nueva revisión aparece en Bergey (1974), indicandose que las especies Ferrobacillus ferrooxidans y Ferrobacillus sulfooxidans han quedado integradas al género Thiobacillus como dos variedades de Thiobacillus ferrooxidans.

2.2. Características Fisiológicas.

2.2.1. Autotrofismo.

Winogradsky (1949), fué el primero que definió el autotrofismo - obligado. Las definiciones pueden ser agrupadas bajo las tres siguientes posibilidades: 1) organismo que crece con una fuente de energía inorgánica; 2) crecimiento con dióxido de carbono, como única fuente de carbono; y 3) crecimiento con fuente de energía inorgánica y carbono inorgánico, - en un medio completamente mineral Rose et al. (1969).

2.2.2. Mecanismo de oxidación del Fe²⁺.

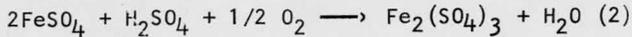
Colmer et al. (1951), Beck (1958) y Silverman et al. (1959), a través de estudios manométricos concluyeron que las bacterias oxidantes de - fierro ferroso, actúan como sustrato (sulfato ferroso), llevando a cabo la siguiente reacción: $4\text{FeSO}_4 + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow 2\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ (1).

De acuerdo con Silverman et al. (1959), el sulfato férrico formado reacciona para formar un precipitado de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Esto sucede si hay una - cantidad adecuada de agua y si el pH es adecuado (Zajic et al. (1969).

Beck (1958) y Silverman et al. (1959), encontraron que el intercambio de O_2 resultó entre 92.7 y 101.8 % durante el crecimiento de F. ferrooxidans, en el medio 9k.

Silverman et al. (1959), observó que la actividad de suspensiones celulares de bacterias ferrooxidantes no se inhibía al aumentar la concentración de Fe^{2+} , si no que, por lo contrario, se incrementaba la velocidad de oxidación del Fe^{2+} (residual), lo cual se interpreto como un aumento en el O_2 intercambiado. Estos autores encontraron que la concentración de 9000 ppm de Fe^{2+} resulto ser la que produjo mejor crecimiento de F. ferrooxidans, pero que a concentraciones mayores se provoco una disminución en el crecimiento bacteriano interpretado como una reducción en el intercambio de O_2 .

Beck (1960), a través de sus estudios manométricos, indicó que las bacterias ferrooxidantes, cuando se utilizan en suspensiones celulares, son capaces de oxidar hierro ferroso, la reacción (1) es modificada utilizando solamente 1/2 de la molécula de O_2 .



Se indica que la velocidad de oxidación del sustrato reducido (Fe^{2+}), es independiente de la concentración de dicho sustrato. Empleando radioisotopos el testigo indico un intercambio de O_2 , de igual manera se detectó una oxidación del ión ferroso en este mismo testigo; a diferencia de lo observado en cultivos marcados e inoculados en los cuales, después de un período de 3 horas, las suspensiones celulares indicaron una elevada velocidad de intercambio de O_2 .

Kinsel (1960), para probar la autotrofia de Ferrobacillus sulfooxidans, empleó cultivos cuya única fuente de carbono fué CO_2 y sulfato ferroso como fuente de energía; la autora observó que estas bacterias son capaces de oxidar al Fe^{2+} bajo estas condiciones, pero incapaces de hacerlo bajo una atmósfera libre de CO_2 .

2.2.3 Mecanismo de oxidación del Azufre.

Es necesario indicar que aún no existe un mecanismo conocido que explique el proceso por el cual, bacterias ferrooxidantes como Thiobacillus ferrooxidans oxidan el azufre elemental obteniendo, de ésta manera, la energía necesaria para el desempeño de sus actividades metabólicas. Sin embargo, existen algunos pasos metabólicos conocidos por los cuales, bacterias de este mismo género como T. thiooxidans (las cuales son incapaces de crecer en presencia de hierro ferroso), llevan a cabo la oxidación del azufre.

El mecanismo de ataque bacteriano al azufre elemental no se conoce

completamente. Vogler et al. (1941), investigaron el efecto de algunos - agentes tensoactivos en la oxidación del azufre por bacterias como I. thiooxidans, analizaron la relación entre el tamaño de la partícula del azufre y su paso a través de una membrana de diálisis observando además, el comportamiento microscópico de éstas bacterias en presencia de azufre, estos autores concluyeron que se requiere un contacto directo entre el - azufre y la bacteria para que selleve a cabo la oxidación microbiológica.

Umbreit et al. (1942), consideraron que después del contacto entre el azufre y la bacteria, el azufre se disuelve formando un glóbulo terminal volviéndose susceptible a la oxidación enzimática provocada por la -- bacteria. La necesidad de un contacto físico, implica que la oxidación del azufre es favorecida en los cultivos estacionarios o con una pequeña agitación. Sin embargo, Starkey et al. (1956) y Newburgh (1956) en Vis-- hniac et al. (1957), indicaron un aumento en la velocidad de oxidación - del azufre por I. thiooxidans con una agitación vigorosa.

Por otra parte, con el empleo de microfotografías electrónicas de I. thiooxidans no se apreció la presencia de glóbulos grasos bipolares, pensandose que la pared celular podría ser una barrera adicional Umbreit et al. (1942).

De acuerdo con Knaysi (1943) en Vishniac et al. (1957), los glóbulos grasos son vacuolas que contienen volutina, e inmediatamente después de la oxidación del azufre contienen, además de volutina, azufre. El azu fre coloidal almacenado puede reaccionar en forma similar a los lípidos, de manera que dentro de la bacteria dá la impresión de glóbulos grasos.

En levaduras la volutina ha sido identificada con la presencia de polifosfatos cíclicos y lineales, Baker et al. (1954) en Vishniac et al. (1957), observaron la acumulación de polifosfatos en I. thiooxidans, indi

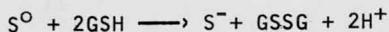
cando que estos son fácilmente hidrolizados.

Knaysi (1943) y Umbreit (1951) en Vishniac et al. (1957), observaron una cápsula, la cual, posiblemente, interfiere con el íntimo contacto entre el azufre y la bacteria, sin embargo, la frecuencia con que ésta cápsula ocurre aún no ha podido ser determinada.

Starkey (1937), sugirió un mecanismo de transporte activo para el azufre, el cual involucra la reducción de azufre a sulfuro y su difusión a través de la membrana celular; este investigador considera este mecanismo como una posibilidad, ya que no logró detectar una rápida producción de H₂S causada por I. thiooxidans, que apoyará su hipótesis; hecho que se atribuye a obstáculos termodinámicos.

Hopkins (1929), en Vishniac et al. (1957), indicaron que I. thiooxidans puede presentar un mecanismo de transporte especializado para el azufre.

Glenn et al. (1953) en Vishniac et al. (1957), indicaron que el grupo funcional para este mecanismo puede estar representado por glutatión (reducido, GSH; oxidado, GSSG) u otro compuesto sulfhidrilo, y proponen la siguiente reacción:



Indicando la formación de sulfuro, libre o unido, que puede entrar a la célula. Una transferencia de 8 electrones ocurre en la oxidación de sulfuro a sulfato, donde 2 de estos electrones pueden participar en la reducción de GSSG a 2GSH.

La oxidación de azufre permite la formación de un compuesto intermedio como es el tiosulfato o los politionatos.

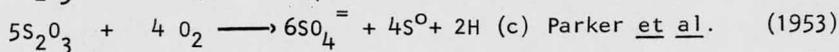
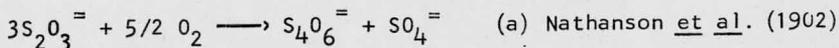
Guittonneau et al. (1952) en Vishniac et al. (1957), encontraron que el azufre elemental en suelos desaparece con la formación de tiosulfato, tetracionato y otros politionatos y, eventualmente, sulfatos.

2.2.4 Mecanismo de Oxidación del Tiosulfato

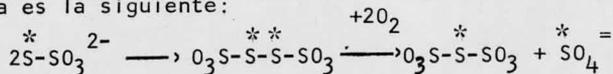
Al igual que lo que sucede con el azufre, el mecanismo por el cual los thiobacilli ferroxidantes oxidan tiosulfato no se conoce bien, sin embargo para tratar de explicar como sucede, podemos esperar que ésta oxidación ocurra de manera análoga a la que realizan otros thiobacilli.

Bajo condiciones favorables de crecimiento, los thiobacilli oxidan cuantitativamente el tiosulfato a sulfato, empleando ocho electrones, los cuales son transferidos por cada átomo de azufre oxidado, del sulfuro a sulfato (Vishniac et al. 1957, 1962). Se desconocen las etapas de transporte de electrones relacionadas con la reducción de píridin nucleótido.

El producto final del metabolismo del tiosulfato obtenido en cultivos de thiobacilli, indican una considerable variedad de productos. De acuerdo a los distintos autores, las reacciones que se llevan a cabo durante la oxidación del tiosulfato por bacterias del género Thiobacillus son:



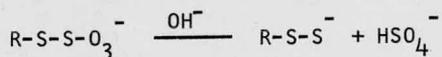
Sinha et al. (1966) en Roes et al. (1969), indicaron que en presencia de PCMB tanto el tiosulfato como el tetracionato fueron oxidados a sulfato o ditionato por acción de I. ferrooxidans, el sulfato se derivó a partir de grupos sulfano presentes en el sustrato. La reacción que se efectúa es la siguiente:



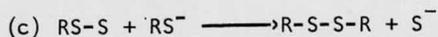
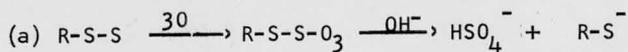
El rompimiento del tetracionato es difícil de llevarse a cabo de ahí que, de acuerdo con los estudios de otros thiobacilli, se ha llegado a la conclusión que se forma preferentemente de grupos sulfonilo presentes en el tiosulfato o politionatos. Trudinger (1967) en Rose et al. (1969),

indican que de acuerdo a esto, los resultados de Sihha et al. (1966), deben ser revisados y verificados. Las dos posibles etapas que pueden caracterizar el mecanismo hipotético por el cual se lleva a cabo la oxidación bacteriana del tiosulfato, sugieren que los dos electrones liberados provienen del tiosulfato, dando como resultado la formación de una enzima unida a un radical (RS-), el cual es aceptado por un unión apropiado. De acuerdo a Vishniac et al. (1962) la conversión eficiente de tiosulfato y tetracionato a sulfato depende de la presencia de radicales RS-. Cuando el potencial redox es elevado, este radical RS- disminuye decreciendo la oxidación del tetracionato y el tiosulfato es oxidado hasta tetracionato. Anaerobicamente el tiosulfato no puede entrar en ésta secuencia, ya que se requiere un aceptor de electrones el cual falta en estas condiciones.

El metabolismo del sulfenil tiosulfato sugiere la hidrólisis a sulfato y a un compuesto de polisulfuro orgánico, el sulfato formado es producto de la transformación anaerobia del tetracionato.



Por este proceso se formaría un polisulfuro orgánico, donde alguna etapa oxidativa provocaría la formación del sulfato. Tal oxidación podría ocurrir directamente después o antes de la formación del azufre elemental o sulfuro, por las reacciones (a), (b), o (c).

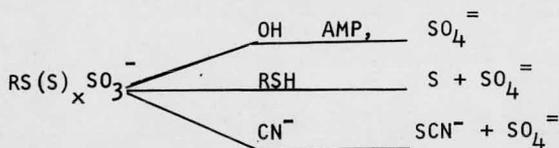


Existen evidencias que indican que el azufre exterior del tiosulfato es oxidado sin la formación de un intermediario del S⁰ ó S⁻. Bajo condiciones anaerobias o de escasez de oxígeno las reacciones finales (b) y (c), pueden intervenir en la formación de un polisulfuro y azufre.

Mecanismo de Oxidación del sulfito

Peck (1960), en Vishniac et al. (1962), describieron la oxidación de sulfito por thiobacilli. Vishniac et al. (1962), indicaron que dicha oxidación es fuertemente inhibida por el glutatión reducido. Tal inhibición involucra un mecanismo de reacción entre SO_3^- y R-S-S-R propuesto por Fridovich et al. (1950), en Vishniac et al. (1962).

La similitud en el modo de acción de todas las enzimas (rodanasa, sulfito oxidasa etc.), indica que el sustrato esencial es un derivado sulfenilo cuya fórmula general es la siguiente:



Vishniac et al. (1963). Las reacciones anteriores no han sido confirmadas experimentalmente.

Peck (1960) en Vishniac et al. (1960), indicó que gran parte de los requerimientos de ATP para la bacteria del azufre (T. thiooxidans) pueden ser satisfechos por la oxidación de sulfito a sulfato.

2.2.5 Heterotrofismo

Molish (1892), en Rose et al. (1969), indicaron que la bacteria que oxida el hierro ferroso, no difiere notablemente de los microorganismos heterotróficos tanto desde el punto de vista nutricional como por la fuente de energía que utiliza, sin embargo, estas bacterias enriquecen su habitat con una sustancia viscosa en la cual acumulan el hierro adsorbido del medio ambiente.

Entre los primeros investigadores que reportaron el crecimiento de F. ferrooxidans en cultivos conteniendo carbono orgánico están -----

Remsen et al. (1963), en Tabita et al. (1971 a), y Lundgren et al. (1964), en Shafia et al. (1969), quienes emplearon un medio de cultivo con glucosa al 0.5%, observando una densidad aumentada diez veces cuando la cuenta se realizó después de la oxidación de todo el fierro reducido presente en el medio de cultivo. Además, indicaron que las células crecidas en glucosa al ser transferidas a un medio de cultivo normal (con sulfato ferroso) no pudieron desarrollarse. La validez de este reporte, sobre cultivos heterotróficos de thiobacilli oxidadores de Fe^{2+} , esta sujeta a eliminar -- las posibles fuentes de contaminación presentes en los cultivos.

Shafia et al. (1969), indican que para que F. ferrooxidans exhiba un comportamiento y crecimiento heterotrófico, debe primero cultivarse en un medio de cultivo combinado conteniendo Fe^{2+} y glucosa, debido a que las células inicialmente prefieren el Fe^{2+} a la glucosa.

Rittenberg (1969), en Tabita et al. (1971), sugirieron que tal comportamiento indicaba que el sustrato inorgánico provee la energía necesaria para el transporte inicial de la glucosa a través de la membrana celular. El período anterior a la oxidación de la glucosa, puede representar el período en el cual la célula está sintetizando la enzima, "Transporte específico", tal como la Enzima II del sistema fosfato transferasa de Kunding et al. (1964), sin embargo, no existen evidencias experimentales que apoyen ésta hipótesis de la transferasa.

Alternativamente, la célula bacteriana puede sintetizar enzimas inducidas necesarias para la desasimilación de la glucosa, tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y enzimas relacionadas.

Tabita et al. (1971 a), indicaron que T. ferrooxidans presenta la enzima RuDP-carboxilasa, además, indicaron que existe una relación entre la oxidación del fierro ferroso y la actividad de la RuDP-carboxilasa durante el crecimiento bacteriano. Lo cual era de esperarse, ya que la oxi

dación del hierro brinda la energía necesaria (adenosin-trifosfato) que utiliza la célula para reducir el CO_2 vía ciclo de Calvin. Este ciclo - fué originalmente descrito, en T. ferrooxidans, por Maciag et al. en --- Tabita et al. (1971 a), y por Gale et al. (1969).

Bassham et al. (1957), en Tabita et al. (1971 a, b, c), indicaron que la RuDP-carboxilasa es la enzima clave en este ciclo, corroborado -- más tarde por Gale et al. (1969), en Tabita et al. (1971 a, b, c,). El - crecimiento heterotrófico, de acuerdo con Tabita et al. (1971 a, b, c,), implica una alternancia de un mecanismo que permite la obtención de energía. Estos investigadores indican, de acuerdo a estudios enzimáticos con C^{14} , que las etapas del ciclo de Embden Meyerhof(ED) no parecen ser la mejor ruta para la desasimilación de la glucosa de T. ferrooxidans.

La desasimilación de la glucosa a través de este ciclo involucra - la presencia de enzimas como 6-fosfogluconato deshidrogenasa, 2-ceto-3-deoxi-6fosfogluconato aldolasa. Otra posible ruta de desasimilación para la glucosa parece ser la vía de pentosa fosfato.

Butter et al. (1967), Smith et al., Trudinger et al. (1968), Martin et al. (1970), de sus estudios enzimáticos concluyeron que los thiobacilli cuando crecen heterotróficamente (en glucosa) funciona el ciclo de ácidos tricarbóxicos, mientras que cuando crecen autotróficamente presentan este ciclo sólo en forma incompleta, lo cual lo relacionaron con la presencia o ausencia de la enzima NADH oxidasa.

2.2.6 Efecto de los Compuestos Orgánicos

Kinsel (1960), Silverman (1967), Tuttle et al. (1969), en Touvinen (1970), reportaron que el material orgánico inhibe la oxidación del hierro ferroso provocada por bacterias ferrooxidans del género Thiobacillus.

Algunos de los estudios en los que se han empleado compuestos orgá

nicos marcados con isótopos revelan que dichos compuestos son capaces de penetrar a la bacteria, tomando parte en el metabolismo de estos autótrofos obligados tales como I. thiooxidans y I. neapolitanus, Rose et al. (1969). Experimentos análogos con I. ferrooxidans hasta ahora no han sido reportados.

Existen algunas teorías que han tratado de explicar la relación entre autótrofos obligados y la penetración de compuestos orgánicos en la célula bacteriana.

Dungan et al. (1965), en Rose et al. (1969), propusieron que los compuestos orgánicos metabolizables, no pueden penetrar en la superficie activa de la célula (membrana plasmática). De hecho se cree que existe una capa alrededor de la envoltura celular, la cual actúa como obstáculo para transferir el ión ferroso a la superficie activa de la célula. Ferrobacillus ferrooxidans, que oxida sulfato ferroso, se ha expuesto a la acción de la energía sónica, provocando que las células bacterianas se liberen del material que las envuelve; las células libres de estas capas son capaces de crecer en un cultivo que contenga glucosa, sin embargo, pierden su habilidad para crecer en cultivos que contengan hierro ferroso. De ahí que, probablemente en los próximos años, ya no se acepte la hipótesis de que el material orgánico penetre a través de la superficie de este tipo de células bacterianas por mecanismos inespecíficos, lo cual ha quedado patente por el empleo de técnica isotópicas (Rose et al. (1969)).

Borichenwski et al. (1966), en Rose et al. (1969), proponen una segunda hipótesis aceptada para autótrofos estrictos. La hipótesis indica que los materiales orgánicos son utilizados, ya que muchos de los cuales no sólo no son tóxicos sino que estimulan el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en ausencia de material inorgánico como fuente de energía, la materia orgánica puede ser utilizada, descomponiéndose en materiales tóxicos

que impiden el crecimiento celular.

Esta hipótesis se basa en la observación de que el piruvato y el oxalacetato se acumulan en cultivo de T. thiooxidans cuando crece autotróficamente en azufre elemental.

El piruvato se acumula también en cultivos de F. ferrooxidans, -- Schnaitman et al. (1965) en Rose et al. (1969).

Recientes investigaciones han contribuido a apoyar nuevas hipótesis sobre la inhibición del crecimiento de varios autótrofos obligados en medios que contienen compuestos orgánicos específicos, Rose et al. (1969).

Lundgren et al. (1964), indicaron que existen cinco aminoácidos - que inhiben el crecimiento de T. ferrooxidans, los cuales causan la inhibición, tanto de autótrofos obligados como de otros microorganismos (Bacillus antracis), cuando se utilizan concentraciones de 10^{-3} o aún a una - concentración menor. Gladstone (1939).

En los últimos años se ha podido comprobar de acuerdo a investigaciones realizadas por Lundgren et al. (1965), Wang et al. (1969), en -- Touvinen et al. (1971) y Shafia et al. (1969), lograron obtener crecimiento de T. ferrooxidans en glucosa manitol, y en varios aminoácidos en ausencia de hierro ferroso, de ahí que concluyen que el organismo se comportó como un heterótrofo.

Durante la adaptación a la glucosa, la bacteria ferrooxidante retiene sus propiedades acidófilas, además, la adición del ácido p-aminobenzoico fué necesario para obtener un crecimiento abundante en medios de cultivo conteniendo glucosa Shafia et al. (1969).

Touvinen et al. (1971), realizaron experimentos con cultivos bacterianos de este tipo, empleando compuestos orgánicos (sacarosa, maltosa, almidón, glucosa galactosa, extracto de levadura, extracto de carne, peptona, triptona, fructosa y lactosa), estos compuestos se adicionaron al

medio líquido 9k (con sulfato ferroso) para observar su efecto en la velocidad de oxidación de fierro ferroso.

La fructosa y la lactosa, así como compuestos orgánicos más complejos (peptona extracto de levadura etc.), causan una completa inhibición en el crecimiento de este tipo de bacterias. La lactosa no inhibe el desarrollo bacteriano, sin embargo, cuando las concentraciones de aquellos compuestos que no causan una completa inhibición de la oxidación del ión ferroso se ven aumentadas, se observa que los resultados difieren, provocando una reducción en la velocidad de oxidación del ión ferroso.

Una vez que los cultivos de I. ferrooxidans se adaptan a la utilización de glucosa como fuente de energía, la inhibición disminuye gradualmente hasta que, después de varias transferencias, no se observa diferencia en su período de oxidación del fierro. El máximo crecimiento de estas bacterias, en presencia de glucosa, varía entre 3 a 9 días, Shafia et al. (1969), Touvinen et al. (1971).

2.2.7 Energía almacenada y fijación de Bióxido de Carbono.

Colmer et al. (1951), emplearon técnicas manométricas en el estudio fisiológico de I. ferrooxidans introduciéndolas como un medio para estimar cuantitativamente la oxidación del sustrato ferroso provocada por esta bacteria, así como para determinar la fijación del carbono que esa misma bacteria realiza.

De acuerdo a sus estudios, la oxidación de 120 g de sulfato ferroso dió como resultado la fijación de 16.06 mg de carbono. Con ésta metodología, los autores calcularon que se obtienen 11.3 kcal/átomo gramo de Fe^{2+} , y que para fijar un átomogramo de carbono se requieren 115 kcal, por lo que la eficacia en la utilización de la energía es de 3.2%. Estos bajos porcentajes obtenidos por Colmer et al. (1951), de acuerdo con -----

Kuznetov (1963), pudieron deberse a que los cultivos empleados fuerón de 17 días.

Lyalikova (1958), en Kuznetov et al. (1963), empleó cultivos juvenes de 2 días de edad encontrando un promedio de eficacia en la utilización de la energía de cerca de 30 %. Estos resultados fueron confirmados por Silverman et al. (1959), quienes, encontraron, también, un alta eficacia en la utilización de energía en cultivos de I. ferrooxidans. Empleando aparatos e instrumental de manometría como matraces Warburg, determinaron el uso efectivo de la energía libre en la fijación del carbono la cual fué de 20.5 a 24.3 %. Estos valores concuerdan con los reportados para otros organismos quimioautotróficos.

Beck (1960), estudió la fijación de CO₂ empleando suspensiones bacterianas, los resultados que obtuvo este investigador, indicaron que la fijación de 1 mol de CO₂ ocurre como resultado de la oxidación de aproximadamente cerca de 100 moles del ión ferroso. El tiempo de generación encontrado fué de 10 a 15 horas. La actividad específica del carbono celular fué de 760 calorías por mol/micromolar, en constrate con 900 calorías por mol/micromolar que era el valor esperado por estos investigadores. Casi un 85% de carbono celular, concluye este mismo autor, proviene del CO₂ atmosférico, de ahí que las células son verdaderamente quimioautotróficas. Este mismo autor reporto que apartir de 120 g de sulfato ferroso, I. ferrooxidans es capaz de sintetizar 16 g de carbono. De acuerdo a los cálculos de eficacia en la utilización de energía desponible para este microorganismo, se requiere un pH de 2.0 a 3.5 para la oxidación del fierro.

Beck (1960) empleo también para medir la fijación de CO₂ soluciones de NaHC¹⁴O₃ ó Na₂C¹⁴O₃ en mezclas de reacción, las cuales contenian ión ferroso, azufre o ambos como fuente de energía. La escala de efica--

cia de la fijación de CO_2 estuvo entre 0.05 a 0.03 micromoles de CO_2 fijado por mol de O_2 absorbido. La elevada fijación de CO_2 está autor la relación con la proporción del azufre, ya que siempre que aumento la utilización de este sustrato se observo un aumento en la fijación de CO_2 , sin embargo el autor no estuvo seguro de que esta sea la única explicación ya que indica que se debe de considerar la porción de fierro ferroso.

Beck (1960), además, utilizando KOH para eliminar el CO_2 atmosférico, demostro que la oxidación de Fe^{2+} era realizada por thiobacilli ferroxidantes sin sufrir ninguna disminución en su velocidad de crecimiento, de ahí concluyo que la fijación del CO_2 atmosférico no esta asociada en forma obligada con la oxidación del fierro ferroso.

Kinsel (1960), probó que Ferrobacillus sulfooxidans tiene la habilidad de oxidar el fierro ferroso o el azufre cuando CO_2 es la única fuente de carbono, indicando que tal vez se comporta de forma análoga a la descrita por Beck (1960), para I. ferrooxidans.

Beck et al. (1968), a través de estudios enzimáticos llegó a la conclusión que el ciclo de Calvin así como el ciclo de hexosa monofosfato opera en este tipo de thiobacilli, indicando que la cantidad de CO_2 fijado dependió de la cantidad de sustrato presente (Fe^{2+}), indicaron que la incapacidad de estas células bacterianas por regenerar pentosa fosfato y perpetuar la fijación de CO_2 se debió a la baja actividad de la enzima triosa-fosfato-dehidrogenasa.

3. Aislamiento y Cultivo de Thiobacillus ferrooxidans

3.1 Técnicas de aislamiento.

Colmer et al. (1947), aislaron originalmente a Thiobacillus ferrooxidans de aguas ácidas de minas de carbón, utilizando estas mismas aguas previamente esterilizadas como medio de cultivo; 10 ml de agua de mina - ácida estéril, fué inoculada con 1 ml de agua ácida no estéril que contenía a las bacterias ferrooxidantes. Estos autores llevaron a cabo una serie de reinoculaciones en el mismo medio natural en el que se localizan - estas bacterias; para aislarlas, estos autores reportaron un medio sólido que basicamente consistió de agua de mina estéril, adicionada de agar como agente solidificante.

Leathen (1956), aisló una bacteria ferrooxidante a la que denominó Ferrobacillus ferrooxidans empleando, para este objeto, el agua lixiviada obtenida de una mina de carbón bituminoso, con la cual inoculó un medio - líquido estéril, que él elaboró, tomando en cuenta para su formulación la composición original del agua de mina de donde se aislaron éstas bacterias. Para aislar este microorganismo, el investigador requirió de 23 inoculaciones seriadas inoculando, más tarde, un medio sólido a base de silica gel (como agente solidificante) con bacterias crecidas en medio de cultivo líquido. La cepa bacteriana, la mantuvo por transferencias mensuales en medio de cultivo líquido (medio de Leathen).

Beck (1960), aisló a T. ferrooxidans a partir de cultivos enriquecidos, obtenidos por inoculación de medios de cultivos líquidos que fueron una modificación del medio de Leathen. El inóculo consistió de 1 ml de agua ácida de mina, adicionando a matraces elermeyer con 125 ml del medio, estos matraces se incubaron por 30 días. El resultado de las reinoculaciones sucesivas, según indica el autor, dió células activas, las cuales constituyeron el inóculo para el medio de cultivo sólido. A partir -

de este medio sólido, se hizo el aislamiento y caracterización por dilución y enriquecimiento.

El aislamiento de las colonias se obtuvo al inocular el medio sólido a partir de un cultivo crecido en medio líquido 9k (medio de Leathen modificado), en fase de crecimiento logarítmico. Las colonias desarrolladas en el medio de cultivo sólido, se separaron con una micropipeta y se reinocularon a medio líquido de Starkey, conteniendo azufre o tiosulfato como fuente de energía, o bien con sulfato ferroso (medio 9k).

Kinsel (1960), reportó el aislamiento de una bacteria ferrooxidante (Ferrobacillus sulfooxidans), la cual aisló con la siguiente técnica: 10 ml de aguas de minas conteniendo células bacterianas, constituyeron el inóculo para matraces con medio líquido de un cultivo modificado de Leathen. Una vez obtenido el crecimiento en este medio, el cual se manifestó por la aparición de un precipitado de color ocre-rojizo, la investigadora continuó con las reinoculaciones con el objeto de obtener una cepa bacteriana activa.

Después de 66 reinoculaciones sucesivas en este mismo medio de cultivo líquido, realizó el aislamiento empleando un medio modificado con agar. El cultivo que se empleó en la inoculación del medio sólido se filtró para eliminar partículas que interfieren con la determinación. El medio sólido inoculado, con 0.1 ml de cultivo líquido, después de incubar por un período de 3 a 4 semanas se examinó microscópicamente. Las observaciones indicaron que se trataba de células con características correspondientes a bacterias ferrooxidantes del género Thiobacillus. Las colonias crecidas en este medio de cultivo sólido fueron aisladas removiendo las del medio por disección del agar; estas colonias se transfirieron a tubos con medio líquido de Leathen modificado, incubandolos por un período análogo el empleado durante la activación de la bacteria. Este aislamiento

se caracterizó por presentar una progenie de 5 aislamientos a partir de células simples. Lazarroff (1962), indicó que, en los medios a base de Fe^{2+} inoculados con células procedentes de cultivos puros sometidos a filtración, sedimentación y lavado con ácido sulfúrico, la oxidación del hierro era menor que cuando se empleaban inóculos normales. El autor consideró que los inóculos acarrean algunos materiales que favorecen la oxidación del sulfato ferroso en el medio de cultivo.

Touvinen et al. (1970), aislaron T. ferrooxidans a partir de aguas ácidas de minas, utilizando diluciones de agua de mina - agua destilada, como inóculo del medio líquido 9k (Silverman et al. (1959), y medio sólido Bacto-agar Thiobacillus Difco). El medio sólido se inoculó durante 10 días a 28°C. El número de thiobacilli ferrooxidans, se estimó por la técnica del número más probable (NMP).

Esta técnica permite discriminar los thiobacilli ferrooxidantes de los demás tipos de thiobacilli que pudieran estar presentes en el cultivo bacteriano.

Brock (1975), empleó también el método del NMP, obteniendo análogos resultados a los expuestos por el autor anterior.

Steiner et al. (1974), reportaron un método de inoculación para obtener cultivos de T. ferrooxidans a gran escala, para este propósito, inocularon inicialmente matraces elermeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio 9k con 1 ml de cultivo bacteriano de thiobacilli ferrooxidantes crecidos en aguas ácidas de minas como inóculo. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano en estos matraces, se hicieron transferencias a recipientes de 10 l y más tarde a recipientes de 20 l.

La incubación se hizo durante una semana después de la cual, el cultivo bacteriano se filtro, separando el precipitado de compuestos de hierro, y el líquido filtrado se centrifugo a 20,000 g. Las células sedi

mentadas se lavarón por suspensión y sedimentación con ácido sulfúrico a un pH de 2.5, hasta obtener una suspensión relativamente libre de contaminantes sólidos. El contenido fué aproximadamente de 3.0×10^{10} células/ml.

3.2 Medios de Cultivo

3.2.1 Medios líquidos

3.2.1.1 Fe²⁺ como fuente de energía.

Uno de los primeros medios de cultivo desarrollados para aislar y mantener ésta bacteria, fué el descrito por Colmer et al. (1947), quienes utilizarón las mismas aguas ácidas de mina de carbón bituminoso estériles como medio de cultivo.

Sus resultados indicaron que fué necesario incubar este medio a una temperatura de 22 a 28°C durante 6 a 10 días; período que les permitió observar el crecimiento bacteriano por el cambio de color del medio líquido, de incoloro a pardo.

Temple et al. (1951). en Kuznetov et al. (1963), llegaron a sugerir un medio líquido de origen mineral cuya formulación es la siguiente: una solución 0.1 % de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.05 % de $(NH_4)_2SO_4$ disuelto en 2.0 litros de agua destilada, con un pH final entre 2.0 a 2.5, ajustando con ácido sulfúrico diluído. Este medio de cultivo tiene tres posibles fuentes de energía: 1) oxidación de sulfato de amonio, 2) la oxidación de sulfato ferroso del medio y 3) la contaminación por materia orgánica; eliminando las fuentes 1 y 3 por el uso de reactivos químicamente puros, agua bidestilada y material lavado cuidadosamente así como el uso de hidróxido de amonio, el cual proviene de un medio ácido, los autores dedujeron que la única fuente de energía efectiva para el medio era el sulfato ferroso.

Leathen et al. (1951), emplearon un medio de cultivo líquido mine-

ral sintético más complicado, cuya composición es la siguiente: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$...0.15 g/l; KCl... 0.15 g/l; K_2HPO_4 ...0.05 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$...0.5 g/l; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$...0.01 g/l; con un pH final de 3.5. A este medio se le agregó 10 ml de una solución al 10 % de sulfato ferroso, previamente esterilizado por filtración a través de un filtro de asbesto.

Leathen et al. (1956), creyeron que el hiposulfito de sodio empleado en el medio antes descrito durante las investigaciones de Colmer et al. (1947), podía ser oxidado gracias a una reacción puramente química, de ahí que la bacteria se desarrollaría exclusivamente por la oxidación del hierro ferroso.

Leathen et al. (1956), reportaron además, que el hierro ferroso -- contenido en las aguas ácidas de minas estaba presente hasta una propor-- ción de 200 mg/l, y podía ser oxidado completamente en tres días por un cultivo joven de T. ferrooxidans, mientras que la oxidación química de la solución estéril, a la misma concentración, ocurría en 2 años.

Bryner et al. (1958), utilizaron un medio cultivo líquido, modificación del de Leathen; a este nuevo cultivo líquido le agregaron sulfato de aluminio, manganeso y sulfato de sodio, detectándose un buen crecimiento bacteriano en este medio de cultivo.

Silverman et al. (1959), desarrollaron un nuevo medio de cultivo que denominaron 9k, modificación del medio de Leathen, en el que se varió la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$...3.0g; KCl...0.1 g; K_2HPO_4 ...0.5 g y la solución de sulfato ferroso al 14.74% P/V, en 1000 ml; los otros dos componentes (sulfato de magnesio y nitrato de calcio) permanecieron en la misma concentración empleada por Leathen et al. (1956). Los resultados obtenidos con este medio de cultivo fueron excelentes, la cuenta celular se estimó en 7×10^6 células/ml para el medio de Leathen, mientras que

para el medio 9k se reportó un crecimiento casi de 3×10^7 células/ml en cultivo estacionario. Los estudios de Silverman et al. (1959), permitirán saber que un crecimiento rápido se obtiene si existe suficiente aereación que permita un adecuado intercambio de oxígeno y bióxido de carbono.

El crecimiento de F. ferrooxidans de acuerdo a los autores mencionados, depende de la presencia de fierro ferroso como una fuente energética, ya que el crecimiento cesa cuando el fierro ferroso se ha oxidado por completo.

Los tiempos de generación para un cultivo aereado fueron de 5.3 a 9.6 horas, con un promedio de 7 horas. El fierro ferroso a una concentración de 9000 ppm, parece ser la concentración óptima para la producción más rápida y abundante del crecimiento de F. ferrooxidans.

Unz et al. (1960), publicaron una modificación para el medio 9k -- utilizando, en lugar de sulfatos, cloruros para los demás componentes del medio, ajustando las concentraciones adecuadas en base a las equivalencias molares de cada compuesto.

Kinsel (1960), desarrolló el aislamiento y caracterización de F. sulfooxidans empleando el medio de Leathen, el cual modificó empleando una solución de sulfato ferroso a una concentración de 1g/100 ml de solución de sales basales, usó, además, una menor concentración de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, igual a 0.001 g/100 ml de agua destilada, y un pH final de 3.5 a 4.0. La autora utilizó, además, otras fuentes energéticas sustituyendo el sulfato ferroso por: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.81 g); $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.9 g); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.44 g), o azufre (10.0 g) por 100 ml de agua estéril.

Para requerimientos de nitrógeno, el medio de Leathen fue modificado por Kinsel sustituyendo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ por CaCl_2 (0.0047 g), y utilizando como fuente de nitrógeno $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.156 g); KNO_3 (0.238 g); urea (0.071) y

peptonal (1 g/1000 ml), ajustando el pH de 3.5 a 4.0, con ácido sulfúrico 0.1 N.

Lazarroff (1962), Gutiérrez et al. (1968), emplearon el medio 9k, solo que los últimos investigadores utilizaron una solución 13.4 % de sulfato ferroso.

Shafia et al. (1968), realizaron otra modificación al medio líquido 9k, adicionando glucosa al 1 % y 0.01 g de extracto de levadura a la solución de sulfato ferroso al 2 %; ésta modificación la realizaron con el objeto de observar el efecto que presenta la materia orgánica en el crecimiento de cultivos inoculados con F. ferrooxidans en cultivos que contenían azufre elemental.

Touvien et al. (1971), emplearon medio 9k a una concentración de 2.0 g/1000 ml de sulfato ferroso en el estudio de I. ferrooxidans.

3.2.1.2. Azufre como sustrato energético.

Colmer et al. (1949), consideraron que este tipo de bacterias podían oxidar, además de hierro ferroso, azufre elemental a partir del cual obtenían energía necesaria para sus procesos metabólicos.

Leathen et al. (1956), reportó la falta de crecimiento de F. ferrooxidans en cultivos que contenían azufre elemental.

Silverman et al. (1959), al utilizar la cepa de Leathen et al. (1956), encontraron que ésta bacteria también actuaba sobre el azufre molecular convirtiéndolo en ácido sulfúrico.

Unz et al. (1960), desarrollaron un cultivo conteniendo azufre, el cual inocularon con I. ferrooxidans y F. ferrooxidans, a partir de cultivos de 7 días crecidos en medio líquido con hierro ferroso como fuente de energía. Después de 10 días de incubación, estos autores reportaron que ambas cepas fueron capaces de crecer en un medio de cultivo conteniendo azufre sin pérdida en la actividad celular, además indicaron que las cepas

crecidas en este medio, no perdieron su capacidad de oxidar Fe^{2+} .

Unz et al. (1960), al comparar los resultados obtenidos en el medio de Starkey con los obtenidos en el medio 9k con azufre, encontraron que con el primer medio solo se obtuvo un mínimo crecimiento bacteriano. Estos autores consideraron que el producto final de la oxidación del azufre por acción de bacterias ferrooxidantes era el sulfato, el cual provocaba la acidificación del medio. Estos resultados además indicaron que no existen diferencias muy grandes entre el crecimiento de F. y I. ferrooxidans cuando en el medio se empleo azufre o bien cuando se usó la mezcla de azufre y fierro ferroso. La cuenta bacteriana hecha a partir de estos cultivos indicaron un aumento logarítmico del crecimiento, el cual estuvo en estrecha relación con la disminución del fierro ferroso del medio. Al emplear ésta mezcla de sustratos, el crecimiento bacteriano fue lento lo cual se atribuyo, posiblemente, a la acción inhibitoria del azufre sobre la oxidación del fierro ferroso provocada por la bacteria.

Beck (1960), empleando técnicas manométricas encontro que el O_2 - utilizado fué mayor en cultivos con mezcla de sustratos, que en aquellos que solo contenían azufre como única fuente energética.

Kinsel (1960), reporto al emplear el método de dilución seriada y transferencias que F. sulfooxidans era capaz de oxidar azufre en el medio de Waksman (1922), y al inocular estas bacterias así crecidas a un medio conteniendo Fe^{2+} , estas eran capaces de oxidar este sustrato a fierro férrico, y que esto ocurría aún después de varias transferencias a medios líquidos conteniendo azufre. Los estudios de ésta investigadora indican que en las inoculaciones de medios de cultivo, conteniendo azufre o fierro ferroso, con diluciones arriba de 10^{10} , las bacterias perdieron tanto la capacidad para oxidar azufre como fierro.

Gutiérrez et al. (1968), indicaron que T. ferrooxidans crece en medio de Waksman (1922) alcanzando un óptimo crecimiento a los 5 días de haber sido inoculados.

3.2.1.3 Tiosulfato como sustrato energético

El medio de tiosulfato en condiciones ácidas fué desarrollado por Colmer et al. (1951). Estos autores al inocular medios de cultivos líquidos conteniendo tiosulfato con bacterias aisladas de aguas de una mina de carbón bituminoso, observaron que la presencia de turbidez en el cultivo indicaba crecimiento bacteriano, con relación a los controles estériles - donde no se observó turbidez; y que el pH del medio descendió hasta un valor menor de 1. Los inóculos utilizados crecieron originalmente en cultivos que contenían una concentración de 26,000 ppm de fierro ferroso.

Vishniac (1952) y Beck (1960), realizaron estudios manométricos, en los cuales observaron que el intercambio de O_2 , en relación con la utilización del tiosulfato del medio de cultivo, fue alto cuando se utilizaron medios inoculados con T. ferrooxidans y T. thiooxidans. Además observaron que cuando el tiosulfato está presente en el cultivo a elevadas concentraciones, provoca la inhibición del crecimiento bacteriano, lo cual se determina la reducirse o anularse el intercambio de O_2 . Estos autores indicaron que a una concentración de 0.025 M de tiosulfato, el intercambio fué de 5 microlitros.

Leathen et al. (1954), en sus estudios con bacterias ferrooxidantes inoculadas a medios de cultivo ácidos y líquidos conteniendo tiosulfato, nunca llegaron a definir si la oxidación ocurrida en el medio era ocasionada realmente por la acción de este tipo de azufre coloidal, el cual constituía un sustrato fácilmente atacable por las bacterias de este tipo, las cuales producían ácido sulfúrico como producto de su acción sobre el azufre.

Unz et al. (1960), con el propósito de observar la oxidación de este sustrato, emplearon el medio de Starkey utilizando tiosulfato como fuente energética, y lo inocularon con thiobacilli ferroxidantes. Estos autores obtuvieron un crecimiento logarítmico entre 6-7 días después de haber inoculado. El pH del cultivo varió después de este tiempo, hasta que casi todo el tiosulfato fue utilizado.

Las bacterias crecidas en este medio con tiosulfato, según los autores, al ser nuevamente inoculadas en medios de cultivo conteniendo ión ferroso son incapaces de crecer en ellos.

3.2.2 Medios Sólidos

Colmer et al. (1947), emplearon como medio sólido para aislar bacterias de este género, aguas ácidas de minas, esterilizadas, y solidificadas con 1.5 g de agar por 100 ml de agua estéril. Más tarde estos mismos autores sugirieron un medio líquido nutritivo sintético conteniendo sales de magnesio, amonio y fierro ferroso el cual solidificaron con agar.

Leathen (1956), modificó el medio de Colmer et al. (1947), empleando también agar para constituir el medio sólido.

Silverman et al. (1959), con el propósito de obtener cultivos puros de este género de bacterias, utilizarón un medio sólido al que denominaron 9k, y que consiste en el medio 9k antes descrito, al cual se le agregó 3.0 % de agar.

Kinsel (1960), también obtuvo cultivos de colonias individuales crecidas en medio de Leathen sólido, preparado a partir del medio líquido solidificado con agar o sílica gel; este último agente solidificante se usa como Ludox (Dupont), reactivo introducido a los medios de cultivo por Kinsbury et al. (1953).

Beck (1960), utilizó Ludox empleando medio líquido de Leathen modi

ficado, obteniendo un buen desarrollo de colonias microscópicas para la caracterización de F. sulfooxidans.

La sílica gel (Ludox) como material solidificante, presenta varios inconvenientes como son: su rápida gelación, la cual provoca un resquebrajamiento del medio de cultivo sólido, de ahí que deban seguirse las recomendaciones propuestas por Kinsbury et al. (1953).

Unz et al. (1960), reportaron el uso del medio 9k empleando como fuente de energía sulfato ferroso, azufre elemental y tiosulfato, solidificandolo con agar. estos autores reportaron un buen desarrollo colonial de F. y I. ferrooxidans, sin embargo, las bacterias procedentes de colonias crecidas y aisladas a partir de los medios sólidos 9k tiosulfato, no pudieron conservar su capacidad para oxidar fierro ferroso.

Shafia et al. (1968), en su estudio sobre el crecimiento de F. ferrooxidans en presencia de materia orgánica, desarrollaron un nuevo medio sólido que basicamente fué el mismo medio FeG (Solución de sulfato ferroso al 2 %, glucosa 1 %, y 0.01 g de extracto de levadura), pero solidificado con agar. Difco al 2 % y el cual denominaron GYE.

3.3 Efecto de Nutrimientos.

3.3.1 Nitratos.

Zimmerley et al. (1959), indicaron que la presencia de nitratos a una concentración mayor de 200 ppm, aumentaba la actividad de I. ferrooxidans.

Silverman et al. (1959), observaron que al aumentar la concentración del nitrato de potasio, no existía ningún efecto inhibitorio en el crecimiento de los thiobacilli ferrooxidantes en medio líquido 9k. La cepa bacteriana que emplearon estos investigadores fué aislada por Leathen et al. (1956). Estos autores, además, consideraron que el nitra-

to de potasio si se omite del medio líquido 9k, no se produce una disminución en la velocidad de crecimiento de F. ferrooxidans.

Temple et al. (1951), Ranzell et al. (1964), Gutiérrez et al. (1968), Ludgren et al. (1969) y Touvinen et al. (1971), reportaron un efecto inhibitorio en el crecimiento de este tipo de bacterias ferrooxidantes, cuando se emplean concentraciones altas de nitratos en medios de cultivos líquidos.

Touvinen et al. (1971), indicaron que a concentraciones de 0.1 y 0.01 g/1000 ml de nitrato de sodio, no provocaron la disminución en la velocidad de oxidación del ión ferroso, de acuerdo a los autores, se debe a que el medio ácido resulto muy adecuado para la absorción de amonio atmosférico, el cual suple las necesidades de nitrógeno que requiere este tipo de bacterias.

3.3.2 Urea

Bryner et al. (1958), reportaron que la urea resulto tan buena fuente de nitrógeno como el sulfato de amonio. La concentración óptima reportada por estos autores fue de 0.06 g/1000 ml, empleando una modificación del medio de Leathen et al. (1956).

Kinsel (1960), utilizó a la urea como fuente de nitrógeno en lugar de sulfato de amonio. Sus resultados con F. sulfooxidans, indicaron una oxidación del fierro ferroso de 42.40% con respecto a 4.42% de la observada en el testigo.

3.3.3. Otras fuentes de Nitrógeno

Bryner et al. (1958), en sus experimentos con bacterias ferrooxidantes, encontraron otros nutrimentos nitrógenados como son algunos aminoácidos, los cuales pueden tener diversos efectos en el desarrollo de los thiobacilli ferrooxidantes. La l-cisteína por ejemplo, de acuerdo a sus

resultados, es una buena fuente de nitrógeno, para estas bacterias, en tanto que la alanina y el nitrato de sodio inhiben su crecimiento.

Beck (1960), indicó que el sulfito de amonio ferroso inhibe el crecimiento de este tipo de bacterias.

Gutiérrez et al. (1968), indicaron que la aspargina, antímicina y amitol, son una mala fuente de nitrógeno para el crecimiento y desarrollo de estas bacterias de acuerdo a estos mismos autores, no pueden oxidar sulfato ferroso cuando existen KCN en el medio de cultivo a una concentración de 0.01 M, debido a que el CN^- bloquea la oxidación del hierro ferroso.

3.3.4 Sulfato de Amonio.

Zimmerley et al. (1959), encontro, sin embargo, que al aumentar la concentración de sulfato de amonio, los medios inoculados con bacterias ferrooxidantes no presentaron ningún efecto apreciable en su crecimiento.

Kinsel (1960), reportó que en cultivos líquidos de bacterias ferrooxidantes, el 80.85% de hierro fue oxidado cuando se empleó sulfato de amonio, en contraste con 4.66% de hierro oxidado observado en el testigo.

Lundgren et al. (1962), indicaron que la bacteria ferrooxidante -- del género Thiobacillus, al contener aminoácidos azufrados en su estructura celular, debía ser capaz de reducir los sulfatos del medio de cultivo y por síntesis metabólica, producir los aminoácidos que requiere para su metabolismo.

Dungan et al. (1965), encontraron que los sulfatos, además de su papel como nutrimento, poseen cierta importancia como un metabolito fuera de la pared celular durante las etapas iniciales de la oxidación de hierro ferroso.

Schnaitan et al. (1971), consideran que algunos aniones tales como

HAsO_4^{2-} , HPO_4^{2-} pudieron ser reemplazados parcialmente por el ión sulfato sin que se afectara sensiblemente el desarrollo de este tipo de bacterias.

Touvinen et al. (1971), indicaron que los requerimientos de sulfato por los thiobacilli ferroxidantes fueron altos, los autores indican que esto se puede deber al importante papel que tiene este compuesto en la unión del hierro ferroso a la envoltura celular y, más generalmente, a su importancia como un factor que determina la distribución ecológica de I. ferroxidans.

3.3.5. Fósforo

Silverman et al. (1958), observaron que al aumentar la concentración de fosfato de potasio dibásico a 2.75 g/1000 ml o más, se provoca la completa inhibición del crecimiento bacteriano.

Silverman et al. (1959), encontraron que el fosfato, a una concentración de 0.002M provoca una inhibición en el crecimiento bacteriano, debido a que el ión ferroso es poco soluble cuando está como fosfato ferroso, siendo en esta forma menos aprovechable por las células bacterianas.

Unz et al. (1960), consideran que al sustituir K_2HPO_4 en la solución del medio de Starkey (a un pH de 3.8) conteniendo sulfato ferroso a una concentración de 9000 ppm, el crecimiento de los thiobacilli fue comparable al obtenido en el medio 9k.

Renzell et al. (1963), observaron que, en suspensiones bacterianas, la oxidación de sulfato ferroso es más rápida en medio con fosfato de potasio a una concentración de 0.017 M.

Dungan et al. (1965), indicaron en sus experimentos con cultivos líquidos de I. ferroxidans, que el fósforo es un nutrimento necesario no tan solo como una fuente de energía para ésta bacteria, sino además como un factor necesario en las primeras etapas de la oxidación de sulfato fe-

roso, la cual ocurre fuera de la pared celular.

Gutiérrez et al. (1968), observaron que la oxidación del sulfato ferroso se estimuló cuando se adicionó K_2HPO_4 al medio de cultivo líquido a una concentración de 3.5 mM. Sin embargo, Beck (1960), había informado lo contrario, además señaló un aumento en el consumo de oxígeno por la adición de fosfato inorgánico a las células de bacterias ferrooxidantes; estos resultados, aparentemente contradictorios, se pueden explicar según Gutiérrez et al. (1968), debido a que las células bacterianas pueden tener una cierta cantidad de fosfato acumulado en su poza metabólica.

Beck et al. (1968), indicó además, que al emplear una concentración de 0.25 M de KH_2PO_4 se produce una inhibición del crecimiento bacteriano de los thiobacilli ferrooxidantes.

Touvien et al. (1971), observaron que cuando el fosfato no se adiciona al medio líquido 9k, la velocidad de la oxidación del sulfato ferroso, después de 13 inoculaciones en medios de cultivo libres de fósforo, se redujó en un 20% durante el crecimiento logarítmico, lo cual estuvo de acuerdo con los estudios reportados antes por Lazaroff (1962), además, estos investigadores piensan que esto se puede deber a que en el material del laboratorio existen normalmente residuos de fosfato, así como en los reactivos utilizados, con los cuales se suplen las demandas del microorganismo por fosfato en el medio de cultivo, ocurriendo la oxidación del sulfato ferroso por el microorganismo aún a muy bajas concentraciones de fosfato.

3.3.6 Magnesio

Silverman et al. (1959), indicaron que cuando el magnesio estuvo ausente del medio 9k, no se observó ningún cambio aparente en la velocidad de oxidación del sulfato ferroso por bacterias ferrooxidantes. Sin embargo, de acuerdo con Andersen et al. (1962) en Touvinen et al. (1971),

y Lazaroff (1962), cuando el magnesio no está en el medio de cultivo líquido 9k, la oxidación del sulfato ferroso se afecta sólo ligeramente, lo cual puede deberse a que el magnesio es acarreado al medio de cultivo con el inóculo.

Gale et al. (1974), han demostrado que el magnesio parece ser una función esencial en la fijación del bióxido de carbono y para la oxidación del sulfato ferroso por I. ferrooxidans.

El magnesio forma parte del habitat natural de I. ferrooxidans, tanto en las aguas ácidas de minas como en los sulfuros y producto de lixiviación de minerales Touvinen et al. (1974), encontraron que para el crecimiento de las bacterias ferrooxidantes el magnesio es absolutamente necesario. Sin embargo, aún a concentraciones muy bajas de este elemento se pueden desarrollar estas bacterias.

3.3.7. Cloruro

Se ha detectado que, en suspensiones de bacterias ferrooxidantes, la presencia de cloruro a elevadas concentraciones, inhibe la oxidación del sulfato ferroso, Trusell et al. (1962).

De acuerdo a Mayling (1966) en Touvinen et al. (1971), I. ferrooxidans puede ser adaptados para resistir elevadas concentraciones de cloruro. No obstante, esta adaptación y resistencia a los cloruros no ha sido explicada para otros thiobacilli aislados de aguas de mar. Lazaroff et al. (1962), encontro análogos resultados.

3.3.8 Posatio.

Silverman et al. (1959) y Touvienen et al. (1971), observaron en sus experimentos que al eliminar el potasio como KCL y K_2HPO_4 del medio líquido 9k, las bacterias ferrooxidantes crecian en la misma forma que lo hacian aquellas bacterias inoculadas en un medio completo. De ahí se con

cluyó que las necesidades que presentan estas células hacia el potasio -- son pequeñas, ya que este catión, como posiblemente otros, pueden estar -- presentes como residuos o impurezas en los otros reactivos y en el mate-- rial de laboratorio.

3.3.9 Calcio

La presencia o ausencia de calcio en el medio de cultivo líquido - (9k), de acuerdo a Touvien et al. (1974), no tiene influencia en la oxi-- dación realizada por bacterias ferroxidantes y, por lo tanto, en su cre-- cimiento. Estos autores concluyeron que los inóculos son una posible -- fuente de calcio, cuando el medio de cultivo esta carente de este elemen-- to.

3.3.10 Trazas de cationes Mn^{2+} , Cu^{2+} , B^{3+} , Co^{2+} .

Silverman et al. (1959), no encontraron ninguna disminución en el crecimiento bacteriano de F. ferroxidans, al colocar trazas de Mn^{2+} , -- Cu^{2+} , B^{3+} , Zn^{2+} , Mo^{6+} y Co^{2+} .

Kinsel (1960), utilizó Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} como requerimiento energé-- tico para el desarrollo de F. sulfooxidans, sin embargo, estos cationes - no resultarán ser buenas fuentes de energía para este tipo de bacterias.

3.3.11 Otros nutrimentos

Beck et al. (1968), indicó que la adición de $FeCl_2$ y nitrato ferro-- so al medio que contenian sulfato ferroso como fuente de energía provoco una inhibición en el crecimiento bacteriano.

Bajo condicones de laboratorio, Lazaroff et al. (1963), obtuvieron mutantes de thiobacilli ferroxidantes, las cuales pudieron crecer en un medio que contenía cloruro ferroso en presencia de pequeñas concetracio-- nes de sulfato ferroso. Este mismo investigador encontro que el ferrosul-- fato de potasio, así como el ferrosulfato de amonio, cuando fueron emplea

dos en lugar de sulfato ferroso en una solución al 1%, fueron oxidados -- por acción de este tipo de bacterias.

4. Estimación del Crecimiento Bacteriano.

4.1 Métodos Directos.

4.1.1 Cuenta Directa (Cámara de Petroff y Hausser).

Beck (1960), Unz et al. (1960), Lazarroff et al. (1963), y Lacey et al. (1970) determinaron el número celular de cultivos inoculados con T. ferroxidans por el uso de la cámara contadora de Petroff y Hausser.

Beck (1960) y Lacey et al. (1970), indicaron que este método era inexacto, debido a que presentaba interferencias provocadas por el fierro férrico precipitado en el medio.

4.1.2 Microscopía óptica.

Lacey et al. (1970), utilizaron ésta técnica, con la cual pudieron identificar este tipo de bacterias, identificándolas a una resolución de 100 diámetros, la cuenta celular no la consideraron cuantitativa, debido a que la presencia de otras partículas del mismo tamaño que las células bacterianas, lo cual constituye una seria limitación para ésta técnica.

4.1.3 Microscopía electrónica

Lacey et al. (1970), emplearon ésta técnica logrando identificar thio**ba**cilli ferrooxidantes, la resolución a la cual los identificaron fue de 200 a 400 diámetros. Sin embargo, la exactitud de la cuenta directa - estuvo limitada por el pequeño campo de visión que se presenta a ésta resolución, por lo cual este método se considero inexacto. Además, se reportaron interferencias debidas a la formación de costras en las preparaciones.

4.2 Métodos Indirectos.

4.2.1 Estimación de la oxidación del sustrato fierro ferroso.

4.2.1.1 Métodos Volumétricos.

Leathen et al. (1956), Silverman et al. (1959), Unz et al. (1960), determinaron el crecimiento de thiobacilli ferrooxidantes, en función de la oxidación que estas bacterias realizan sobre el sulfato ferroso, observando que una vez que este sustrato es completamente oxidado, el crecimiento celular cesa. La velocidad de crecimiento está íntimamente relacionada con la velocidad de utilización del sustrato Fe^{2+} a Fe^{3+} , fue el método volumétrico desarrollado por Pierce et al. (1950).

Kinsel (1960), estimó el crecimiento bacteriano utilizando el método volumétrico descrito por Treadwell y Hall, Scott (1939). Los dos métodos para estimar el crecimiento bacteriano son básicamente iguales, sólo que el desarrollado por Pierce emplea una solución 0.1 N de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), en tanto que Treadwell y Hall utilizan una solución 0.1 N de permanganato de potasio ($KMnO_4$).

4.2.1.1 Métodos Colorimétricos.

Lazaroff et al. (1963) y Ranzell et al. (1963), desarrollaron un método colorimétrico para la determinación del crecimiento de este tipo de bacterias; este método se basa en detectar la formación del complejo tiocianato férrico y fué originalmente reportado por Kolthoff y Sandell (1952).

Silverman et al. (1969), determinaron el fierro total soluble empleando fenantrolina. El Fe^{3+} , lo determinaron selectivamente, por la diferencia entre el fierro total y el fierro ferroso presente en las muestras.

Tabita et al. (1971), reportaron un método colorimétrico para la estimación del hierro oxidado, utilizando la reacción de dipirídilo, -- Suzuki et al. (1966), todos los análisis colorimétricos mencionados tienen como desventaja, el que se requiere de la introducción de reactivos coloridos a las muestras problemas, por lo que es necesario evitar interferencias.

De acuerdo con Steiner et al. (1974), es esencial que en todos los estudios fisiológicos, para evitar las posibles variaciones experimentales, se deban introducir controles adecuados para obtener una determinación del hierro oxidado más exacta.

4.2.1.3 Método de absorbancia Ultravioleta.

Steiner et al. (1974), introdujeron el método de absorbancia ultravioleta al estudio de la oxidación microbiológica del hierro ferroso provocada por I. ferrooxidans. Este método había sido originalmente descrito por Whiteker et al. (1953) y Bastian et al. (1953), en Steiner et al. (1974), para la oxidación de hierro ferroso en sistemas no biológicos.

4.2.2. Estimación de la oxidación del Azufre como sustrato.

Este método utiliza la determinación del crecimiento bacteriano de este tipo de bacterias por la presencia de sulfatos en el medio. Unz et al. (1960), estimaron el crecimiento de Ferrobacillus ferrooxidans, -- utilizando el método volumétrico descrito por Scott (1939), el cual utiliza dos soluciones $1/4$ N $BaCl_2$ y $KCrO_4$.

4.2.3 Estimación de la oxidación del tiosulfato como sustrato

Unz et al. (1960), reportaron la oxidación del tiosulfato en medios inoculados con thiobacilli ferrooxidantes, estos autores emplearon el

método volumétrico de Haenish, Scott (1937), para determinar el crecimiento bacteriano en función de tiosulfato remanente en los medios de cultivo, para lo cual emplearon una solución de 0.1 N de iodo.

Ranzell et al. (1963), determinaron tiosulfato en función de sulfatos presentes en el medio de cultivo inoculado, determinándolos gravimétricamente por su precipitación como sulfato de bario.

4.2.4 Cuantificación por el Método de las diluciones.

De acuerdo con Beck (1960), Lacey et al. (1972), Niemela et al. (1972) y Beck et al. (1974), la técnica de la determinación del número más probable (NMP), en base al método de diluciones, resulto ser eficaz para obtener una cuenta bastante exacta de este tipo de bacterias ferroxidantes.

III MATERIALES Y METODOS.

1) Cepas Bacterianas.

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio fueron aisladas tanto de aguas ácidas como de lodos o sedimentos, provenientes de minas de cobre.

Las fuentes de origen se resumen en la siguiente tabla.

Clave del Cultivo	Fuente de origen del Cultivo Bacteriano.	Localidad
3	aguas de minas de cobre (Palacios, 1970).	Cananea, Sonora, México.
4	lodos de minas de cobre (Domínguez, 1977).	Cananea, Sonora, México.
5	aguas de minas de cobre (Palacios, 1970).	La Paz Matehuala, San Luis Potosi, México.

2) Medios de Cultivo

A) Líquidos.

Silverman et al. (1959), formularon el medio de cultivo 9k, empleándolo como cultivo básico para el aislamiento y conservación de thiobacilli oxidadores de Fe^{2+} .

Este medio consta de dos partes: 1) Solución de sales basales con la siguiente composición: $(NH_4)_2SO_4$...3.0g; KCL...0.1g; K_2HPO_4 ...0.5g; $MgSO_4$...0.5g; $Ca(NO_3)_2$...0.1g; agua destilada 700 ml. 2) Fuente de energía: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$...14.74% P/V en 300 ml de agua destilada; H_2SO_4 10 N... 1.0 ml. El pH se ajusto de 2.7 a 2.8.

Las dos soluciones se esterilizaron por separado; la solución de sales basales se esterilizó en autoclave a una temperatura de 120°C ---- (15 lbs. de presión) durante 15 minutos. La solución de sulfato ferroso

se esterilizó a través de un filtro Millipore.

Este mismo medio 9k se empleó con distintas fuentes de energía tales como: azufre elemental y tiosulfato de sodio, a una concentración de 1g/100 ml de medio; de acuerdo al medio de cultivo descrito por Unz et al. (1960), esterilizándolo en autoclave a 10 lbs. de presión durante 3 días.

Modificaciones al medio de Cultivo

El medio de cultivo básico 9k se preparó ajustando por separado el pH de las dos soluciones que lo constituyen, para lo cual se empleó H_2SO_4 10 N, adicionando 0.7 ml de este a la solución de sales basales, y 0.3 ml a la solución de sulfato ferroso, para tener un pH de 2.8.

a) Cambios en la fuente de nitrógeno.

Con el propósito de observar el efecto de tres fuentes distintas de nitrógeno (peptona, KNO_3 y Urea) en el crecimiento de las bacterias, los medios de cultivo se prepararon sustituyendo 3.0 g/l de $(NH_4)_2SO_4$ del medio 9k original, por 10 g/l de peptona, 5.04 g/l de KNO_3 y 4.49 g/l de urea.

b) Eliminación de algunos nutrimentos del medio de Cultivo.

Para observar el efecto del medio 9k incompleto en el crecimiento de las cepas sujetas a estudio, se prepararon medios de cultivos exentos en cada uno de los cinco nutrimentos $(NH_4)_2SO_4$, $Ca(NO_3)_2$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4 , KCl.

c) Cambios en la concentración de los constituyentes del medio de cultivo.

Para determinar las concentraciones más adecuadas para el desarrollo de las cepas (3,4, y 5), se prepararon cultivos modificados en la concentración de: a) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en concentraciones de: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0,

Para los medios sólidos 9k-tiosulfato y azufre, se empleó la concentración original de azufre y tiosulfato reportada por Unz et al. (1960).

Se utilizó, además, el medio sólido tiosulfato-agar descrito por Waksman (1922).

3) Aislamiento y purificación de los Cultivos.

Las cepas bacterianas se aislaron de dos fuentes de origen: aguas de minas de cobre y lodos o sedimentos. 1 ml de agua de mina o de una suspensión de los sedimentos, constituyeron el inóculo inicial para el medio 9k líquido (con sulfato ferroso como fuente energética). Después de, -- aproximadamente, 20 resiembras sucesivas en este mismo medio, se sembró - en el medio 9k-agar, antes descrito, siguiendo el método de las diluciones. De las colonias desarrolladas en este medio se resembró nuevamente al medio 9k líquido. Entre 5 y 10 resiembras de medio líquido a sólido y viceversa, nos permiten considerar puras cada una de las cepas utilizadas verificando, en cada caso, las curvas de crecimiento, Palacios (1970).

4) Mantenimiento de las cepas bacterianas.

Las cepas se resembraron por períodos que variaron de acuerdo a la fuente energética empleada para su desarrollo. Las cepas sembradas en medio 9k con sulfato ferroso se resembraron semanalmente, en tanto que - las crecidas en cultivos conteniendo azufre elemental y tiosulfato de sodio se resembraron cada 25 y 15 días, respectivamente.

5) Inóculo.

El inóculo, para cualquiera de los medios líquidos utilizados, consistió de 1 ml de cultivos de 4 días en medio 9k líquido original. Para inocular las placas de medio sólido se utilizó este mismo tipo de cultivo, empleando diluciones entre 10^4 y 10^6 .

4.422 y 44.22 g/litro; b) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a concentraciones de: 1.5, 3.3 y 6.6 g/l; c) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5, 1.0 y 2.0 g/l; d) K_2HPO_4 : 0.5, 1.0 y 2.7 --- g/litro. Al variar la concentración de un nutrimento, la concentración - de los cuatro restantes fueron, igual a la utilizada en el medio 9k origi - nal.

d) Adiciones de glucosa.

Para observar el efecto inhibitorio de azúcares en el crecimiento de las cepas en estudio, se utilizaron dos medios: a) el medio líquido 9k glucosa, con glucosa al 1%, preparada en 100 ml de agua destilada; ésta - solución de glucosa previamente esterilizada en autoclave a 5 lbs. de - presión durante 90 minutos, Meynell (1965). Se adiciona a las sales basa - les previamente esterilizadas.

b) El medio de cultivo FeG (Fierro glucosa), propuesto por Shafia et al. (1969), que entre otros constituyentes, contiene glucosa al 1%, extracto de levadura 0.01% y solución de sulfato ferroso al 2%.

Para observar la asimilación de glucosa en cultivo pobre en CO_2 , se utilizó el medio 9k glucosa, antes descrito, en matraces erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo, sellados asépticamente con un tapón de hule provisto de dos tubos de vidrio; uno de ellos con un filtro (a - base de papel filtro, carbón activado y algodón). A cada matraz se le - extrajo el aire contenido por medio de una bomba de vacío, y se les inyec - to oxígeno a través del filtro.

B) SÓLIDOS.

Para propósitos de aislamiento, se utilizó el mismo medio 9k, adi - cionado de 3.0 g de bacto-agar/100 ml, y modificando la concentración de sulfato ferroso original a 1.474% P/V. El pH de la solución de sales ba - sales se ajustó a 6.0 y de la solución de FeSO_4 a 2.7 - 3.0, antes de la esterilización.

6) Condiciones de Incubación.

Todos los cultivos líquidos se incubaron en agitación (100 rpm), con excepción de los utilizados para el crecimiento en condiciones de microaerofilia, a una temperatura de 28° a 30°C.

Los cultivos en medios sólidos se incubaron en cámara húmeda a la misma temperatura antes indicada .

7) Estimación del Crecimiento en medio líquido.

a) Cualitativa.

Se hizo por la estimación visual del óxido férrico; la presencia de dicho precipitado es directamente proporcional al crecimiento bacteriano.

b) Cuantitativa.

En el medio 9k-Fe²⁺.

La determinación del crecimiento bacteriano, se detectó indirectamente, por la cuantificación del ión ferroso remanente en los cultivos, siguiendo el método oxidimétrico descrito por Scott (1939), y Orozco (1970).

En medio 9k azufre.

En medios de cultivo, con ésta fuente energética, el crecimiento bacteriano se estimó por el contenido de sulfatos en el medio de cultivo, para lo cual se empleó el método volumétrico modificado por Windestein y descrito por Scott (1939); este método emplea dos titulantes BaCl₂ 1/4 N y K₂CrO₄ 1/4 N. El medio de cultivo se filtró previamente a la determinación volumétrica, utilizando papel Whatman No. 42.

En medio 9k-tiosulfato.

Se determino cuantificando el tiosulfato remanente u oxidado en

el medio de cultivo, según el método de Pierce y Haemish descrito por -- Scott (1930) y Orozco (1970).

Todas las estimaciones se realizaron considerando 2 curvas por cada cepa. Los resultados se encuentran referidos a un valor promedio.

8) Crecimiento bajo condiciones de Microaerofilia.

Para esta prueba se empleó el método de la vela descrito por -- Burdon y Williams (1971). La estimación del crecimiento se llevo a cabo por los métodos antes descritos.

9) pH

Tinción Gram por el método modificado de Huncker (Burdon y ---- Williams (1970). Tinción de rojo congo, nigrosina, Meynell (1965).

Para determinar la movilidad se empleó la tinción de tinta china y la técnica de gota pendiente. La tinción de de giemsa fue utilizada en la diferenciación de células bacterianas básofilas de acidófilas, de acuerdo a las técnicas descritas por Burdon y Williams (1971).

Todas las preparaciones se hicieron a partir de cultivos líqui-- dos inoculados con colonias aisladas en medios sólidos, con distintas fuentes de energía (sulfato ferroso, azufre elemental y tiosulfato).

IV RESULTADOS Y DISCUSION.

1) Características Morfológicas y Culturales.

Las tres cepas bacterianas (3, 4 y 5), sujetas a estudio, resultaron ser bacilos cortos, gram negativos con un tamaño que varió entre 0.5 a 0.8 x 1.0 micras.

En las tres cepas las células aparecen en pares y, ocasionalmente, formando grupos de tres o más células.

En todas las cepas se apreció motilidad, siendo las cepas 3 y 4 las más móviles.

En base a la tinción de Giemsa, las tres cepas resultaron acidófilas.

En el cuadro 1 se presenta una comparación entre estos datos y los reportados en la literatura para I. ferrooxidans.

La descripción de las características de cultivo obtenidos para las cepas sujetas a estudio, así como los citados en la literatura para I. ferrooxidans, se describen en el cuadro 2.

De acuerdo a nuestros resultados en el medio de cultivo sólido- Fe^{2+} , todas las colonias de las cepas bacterianas (3, 4 y 5) fueron poco más o menos ovaladas y de bordes irregulares, presentando un color desde amarillo mostaza cuando jóvenes (2-3 semanas), a ocre cuando viejas (5-6 semanas), con centro oscuro, y algunas bien delimitadas. El tamaño de las colonias varió de 0.5 a 0.8 mm.

En el medio sólido 9k-azufre solo crecieron colonias de las cepas 3 y 4.

Las colonias de la cepa 3 fueron blancas redondas granulares, análogas a las reportadas por Unz et al. (1960). En tanto que las colonias de la cepa 4 presentaron características no reportadas en la literatura.

tura para I. ferrooxidans, siendo colonias mucoides, transparentes, no -
bién delimitadas, que tardaron en desarrollarse del 1/2 a 3 meses.

Las colonias de las cepas 3 y 4, en medio sólido 9k-tiosulfato, -
presentaron características análogas a las descritas por Kinsel (1960), -
cuadro 2. Algunas colonias de la cepa 4 mostraron características no re-
portadas en la literatura, siendo colonias semimicroscópicas de color ro-
sa pálido, redondas, planas de bordes regulares y con un tamaño de 0.5 x
1.0 mm.

Con el medio GYE(Fe²⁺ agar, glucosa 1%, extracto de levadura --
0.01%) Shafia et al. (1969), empleado para obtener el desarrollo colonial
de las tres cepas, no se obtuvo crecimiento, probablemente debido a que -
las cepas requieren de una previa adaptación en el medio líquido con glu-
cosa, antes de ser inoculadas a un medio sólido.

El medio de cultivo sólido 9k-peptona permitió, únicamente, el -
desarrollo colonial de la cepa 4. Las colonias desarrolladas en este ca-
so crecieron a las 3 semanas de su inoculación y fueron blancas, granula-
res, no bien delimitadas, alcanzando un tamaño de 0.1 - 0.5 x 0.1 mm.

2) Características fisiológicas.

.1 pH

.1.1 Fe²⁺ (como fuente de energía)

Las curvas de crecimiento en el medio de cultivo 9k original, -
coinciden con el intervalo de pH óptimo (2.75 - 3.00), reportado por ---
Silverman et al. (1959) para el crecimiento de F. ferrooxidans, así como
con los descritos por Unz et al. (1960), Kinsel (1960) para F. ferroxi--
dans, I. ferrooxidans y F. sulfooxidans, respectivamente, y los encontra-
dos en el Manual de Bergey para I. ferrooxidans. figs. 3, 4, 5, cuadro 5.

En el medio 9k original no siempre se encontró una relación directa entre la producción de acidez del medio de cultivo y la oxidación de Fe^{2+} .

Los resultados indican que con el medio 9k- Fe^{2+} a un pH de 1.95, el incremento de acidez fue poco, al igual que el aumento en la oxidación del sustrato (Fe^{2+}).

El máximo de acidez lo dió la cepa 4, siendo el pH de 1.70 a las 96 horas con 24.60% Fe^{3+} ; en tanto que las cepas 3 y 5 durante este mismo tiempo de incubación presentaron un pH de 1.80 con 27.90 y 36.80% de Fe^{3+} . fig. 1, cuadro 3.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Kinsel (1960), quien en sus estudios con cultivos inoculados con F. sulfooxidans, encontró que un pH de 1.9 no resultó ser el adecuado para el desarrollo de thiobacilli ferrooxidantes, los cuales provocan una escasa acidez en el medio de cultivo.

Con este mismo medio, 9k original a un pH de 2.3, las cepas 3 y 4 fueron las únicas que presentaron en sus cultivos un aumento en la acidez, a medida que la oxidación del Fe^{2+} progresó, de tal forma que a las 96 horas las cepas realizan la completa oxidación del sustrato energético provocando un pH de 1.70.

Los resultados con la cepa 5 bajo, estas mismas condiciones y tiempo de incubación, fueron un pH de 1.85 y 100% de Fe^{3+} , fig. 2, cuadro 3.

Cuando se ajustó a un pH de 2.75, las tres cepas produjeron una escasa disminución del pH conforme el crecimiento bacteriano transcurría, de manera que, a las 96 horas, las tres cepas alcanzan una completa oxidación de Fe^{2+} con un pH de 2.45, en los cultivos de las cepas 3 y 4, y un pH de 2.50 en los de la cepa 5. Estos resultados indican una relación di

recta entre el aumento en la oxidación de Fe^{2+} y la acidez en el cultivo, que es análogo a lo reportado por Unz et al. (1960), quienes al trabajar con las cepas F. ferrooxidans y I. ferrooxidans, las cuales provocaron - una completa oxidación del medio, a las 72 horas y un pH de 2.2 - 2.0 en el cultivo, fig. 3, cuadro 3.

Las cepas 3 y 5, en medio 9k preparado a un pH de 2.85, dieron una relación directa entre el aumento de acidez en el medio y el incremento de oxidación del sustrato Fe^{2+} . A las 96 horas, las cepas 3, 4 y 5 - provocaron la mayor acidez (pH de 2.6), fig. 4 cuadro 3. Este mismo comportamiento se observó en el medio de cultivo 9k a un pH de 3.0, obteniéndose sólo la oxidación total del sustrato energético (Fe^{2+}) en las tres - cepas, a las 72 horas, con un pH de 2.75, fig. 5, cuadro 3.

Los resultados de Kinsel (1960), obtenidos en sus estudios con F. sulfooxidans, concuerdan con los resultados de la presente investigación, ya que esta autora encontró que el pH, al que ésta bacteria obtuvo el mejor desarrollo, fué el de 2.85.

Silverman et al. (1959), también obtuvieron resultados similares para F. ferrooxidans, cuando utilizaron un medio de cultivo a pH de 3.0, reportando, a las 72 horas, una máxima oxidación de Fe^{2+} y una máxima acidez (pH de 2.2).

No se utilizó un pH mayor de 4 debido a que, en esas condiciones la oxidación química de Fe^{2+} es más intensa y no permite observar la oxidación biológica claramente.

1.2 Azufre (como fuente de energía).

En el medio 9k-azufre inoculado con cada una de las cepas, a un pH inicial de 3.0, se observó que la oxidación del azufre fué directamente proporcional al incremento de acidez en el medio de cultivo. A los

25 días la cepa 5 fue la que provocó la mayor acidez en el medio dando un pH de 1.15, Siguiendo en orden decreciente la cepa 3, que provocó un pH de 1.25 y la cepa 4 con un pH de 1.27. Estos datos están de acuerdo con los de Unz et al. (1960) para I. ferrooxidans y F. ferrooxidans. Ambas cepas oxidaron completamente el azufre elemental al cabo de 7 días, y dieron un pH de 1.8 fig. 6, cuadro 4.

El crecimiento y acidez más rápido, reportado por estos autores, se puede explicar debido a que el medio de cultivo que ellos utilizaron fué preparado a un pH de 4.0 , pH en el que se favorece la oxidación química del azufre.

1.3 Tiosulfato de sodio (como fuente de energía)

Las tres cepas lograron desarrollarse en este medio, siendo la cepa 5 la que logró el mejor desarrollo y produjo, a los 14 días, un pH de 3.4, y las cepas 3 y 4 un pH de 3.90 y 3.97, respectivamente. No se observó una relación directa entre la oxidación del sustrato energético (tiosulfato de sodio) y la producción de acidez. Este efecto no coincide completamente con lo observado en los estudios de Unz et al. (1960), estos autores encontraron un decremento del pH a medida que la oxidación del sustrato transcurre; esto puede deberse a que el pH del medio empleado fue de 5.0, el cual favorece a la oxidación química de ese sustrato. Fig. 7, cuadro 5.

1.4 Medios de Cultivo Modificados.

1.4.1 Cultivos con distintas fuentes de Nitrógeno.

Amnio.

En presencia de esta fuente de nitrógeno, las tres cepas presentaron una relación directa entre la acidez del medio y la oxidación del

Fe^{2+} . fig. 4, cuadro 3. Este hecho coincide con los resultados reportados por Silverman et al. (1959), Unz et al. (1960); Kinsel (1960).

Nitratos.

La única cepa que presentó una clara relación entre el aumento de acidez del cultivo y el incremento en la oxidación del Fe^{2+} , fue la cepa 3, a las 96 horas; provocando un pH de 2.75, en tanto que para las cepas 4 y 5 el pH fue de 2.90. fig. 8, cuadro 6.

Urea.

Las tres cepas, en el medio de cultivo 9k con urea, no presentaron una relación directa entre el % Fe^{3+} obtenido y la producción de acidez en el medio. La cepa 3 produjo el mayor descenso del pH a las 96 horas, siendo éste de 3.1. a 3.0 fig. 9, cuadro 6.

Peptona.

En el medio 9k con peptona, la cepa 4 presentó un claro aumento de acidez en el medio, a medida que la oxidación de Fe^{2+} transcurrió. A las 96 horas esta cepa logro un pH de 2.80. Las cepas 3 y 5 provocaron un pH en el medio de 2.95 y 3.1, respectivamente, fig. 10., cuadro 6.

1.4.2 Substitución y eliminación de nutrimentos en el medio de Cultivo.

En los medios exentos de fuente de nitrógeno $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ así como el medio exento en sulfato de magnesio $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$, las tres cepas no indicaron una clara relación entre la oxidación del sustrato -- energético y la disminución del pH del medio, figs. 11, 12 cuadro 7.

La cepa 3 en el medio exento en K_2HPO_4 , y las cepas 3 y 5 en el medio exento en KCl, fueron las únicas que indicaron una relación directa entre el aumento de acidez en el medio y el incremento de oxidación de -

Fe²⁺. La cepa 3 en el primer medio (exento de K₂HPO₄) obtuvo a las 96 horas un pH de 2.6. En tanto que las cepas 3 y 5 en el segundo medio (sin KCL) provocaron un pH de 2.90, figs. 13 y 14 cuadro 7.

1.5 Medio 9k-glucosa.

Las cepas 3 y 4 fueron las únicas que indicaron un aumento en la acidez a medida que la velocidad de oxidación del Fe²⁺ aumento, detectándose a las 96 horas un pH de 2.3 y 2.25, respectivamente, fig. 15, cuadro 8.

2. Respuesta a diferentes fuentes de energía.

2.1. Sulfato ferroso.

En cuanto a la velocidad de crecimiento de las tres cepas en este sustrato, se observó que las cepas 3 y 4 logran oxidar completamente el Fe²⁺ a las 72 horas. fig. 5 cuadro 3. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kinsel (1960) para F. sulfooxidans. La cepa 5 consiguió la completa oxidación de este sustrato a las 96 horas. Análogos resultados fueron reportados por Silverman et al. (1959); Unz et al. (1960) y Gutiérrez et al. (1968) para I. ferrooxidans.

2.2 Azufre elemental.

Al utilizar medio 9k-azufre, se apreció que las tres cepas logran una buena oxidación del sustrato a los 25 días. La cepa 3 produjo la mayor cantidad de sulfatos, 93.50%, y 88.50 y 77.50% las cepas 5 y 4 respectivamente fig. 6, cuadro 4. Los resultados obtenidos son análogos a los encontrados por Unz et al. para I. ferrooxidans y F. ferrooxidans.

2.3 Tiosulfato de sodio.

Las tres cepas crecieron en el medio 9k-tiosulfato, particularmente la cepa 5 la cual obtuvo un mejor crecimiento logrando, a los 14 días, un 40.45% de tiosulfato oxidado, las cepas 3 y 4 oxidaron en el mismo tiempo de incubación 18.18 y 12.34% de tiosulfato fig. 7, cuadro 5. Estos resultados son análogos a los de Unz et al. (1960), para F. ferrooxidans obteniendo el crecimiento logarítmico de esta cepa se puede explicar por el pH del medio de cultivo, que fue cercano a 5.

Medios de Cultivo Modificados.

Respuesta a diferentes fuentes de Nitrógeno.

Aminio.

Las cepas 3 y 4 oxidaron completamente el Fe^{2+} a las 72 horas. En tanto que la cepa 5 lo realizó a las 96 horas. fig. 5, cuadro 3. Los resultados obtenidos con las cepas 3 y 4, coinciden con los obtenidos por Unz et al. (1960), Kinsel (1960). Mientras que los resultados con la cepa 5 están de acuerdo con lo reportados por Silverman et al. (1959 b), y Gutiérrez et al. (1968).

Nitratos.

Las tres cepas problema, con esta fuente de nitrógeno oxidaron bien el sustrato energético (Fe^{2+}) apreciándose una ligera disminución en la capacidad oxidativa, si se compara con el medio 9k original. La cepa 3 alcanzó la máxima oxidación a las 96 horas ($90.96\% \text{Fe}^{3+}$), fig. 8, cuadro 6.

Colmer et al. (1947) encontraron que los nitratos no resultan ser la mejor fuente de nitrógeno en el desarrollo de los thiobacilli ferrooxidantes.

Kinsel (1960), y Gutiérrez et al. (1968) reportaron análogos resultados a los obtenidos por Colmer et al. (1947), obteniendo con F. sulfooxidans y I. ferrooxidans, 11.92% y 10% de Fe^{3+} , respectivamente, a las 72 horas de incubación.

Urea.

Los resultados de la oxidación de Fe^{2+} con esta fuente de nitrógeno, indicaron que la cepa 4 logró el mejor desarrollo a las 96 horas, - 91.82% y 78.62 y 25.81% de Fe^{3+} con las cepas 3, 4 y 5 respectivamente, - fig. 9, cuadro 6. Los resultados con la cepa 4 a las 72 horas, (47.14% - Fe^{3+}) son comparables a los obtenidos por Kinsel (1960), ya que esta autora obtuvo 42.49% Fe^{3+} en el mismo tiempo de incubación.

Peptona.

Con esta fuente de nitrógeno las tres cepas presentaron una disminución en su habilidad para oxidar el Fe^{2+} , comparando con el medio 9k original. Las cepas 3 y 5 lograron el mejor crecimiento en este medio, - los resultados obtenidos con la cepa 4 a las 72 horas (33.85% Fe^{3+}), resultaron similares a lo reportado por Kinsel (1960) con F. sulfooxidans el cual fue de 30.30% Fe^3 . fig. 10, cuadro 6.

Medio de cultivo exento de nitrógeno.

Las tres cepas crecieron en este medio incompleto. Los resultados indican que la cepa que mejor creció bajo estas condiciones fue la cepa 4 logrando, a las 96 horas de incubación, 75.84% de Fe^3 , y 70.73 y -- 64.41% de Fe^{3+} las cepas 3 y 5, respectivamente. fig. 11, cuadro 7.

Starkey, en Colmer et al. (1947), atribuyó estos resultados para este tipo de bacterias, al hecho de que estas bacterias pueden obtener el nitrógeno que requieren absorbiendolo del aire en un medio ácido, o

bién, utilizando el nitrógeno que pudiera llegar al medio de cultivo como impureza de los otros constituyentes no nitrógenados; este investigador - obtuvo estos resultados con cultivos de I. thiooxidans.

Con los cultivos exentos en sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) y cloruro de potasio (KCL), no se detectó una alteración en la velocidad de oxidación, en comparación con el medio 9k original. Silverman et al. (1959) obtuvieron resultados similares con F. ferrooxidans. Beck (1960) - confirmó este comportamiento, utilizando I. ferrooxidans, fig. 12, 14, - cuadro 7.

Con el medio exento de K_2HPO_4 , únicamente la cepa 4 se comportó en igual forma que en el medio 9k original, ya que con las cepas 3 y 5 se detectó un ligero decremento en la velocidad de crecimiento, con respecto al medio de cultivo original. fig. 13, cuadro 7.

Respuesta de las cepas problema a distintas concentraciones de - cada Constituyente del medio de Cultivo 9k.

Sulfato Ferroso

De los experimentos realizados, empleando distintas concentraciones de sulfato ferroso (0.5, 1.0, 2.0, 4.4, 44.22 g/l), se desprende que el crecimiento de estas tres cepas bacterianas bajo distintas concentraciones varió de tal modo, que a una concentración de 0.5, 1.0 y 1.5 g/l - se observó un descenso en el crecimiento bacteriano estimado por la formación de Fe^{3+} . Estos resultados están de acuerdo con los encontrados por Gutiérrez et al. (1968), quienes a concentraciones de 0.5, 1.0 g/l, reportan 68 y 95% de Fe^{3+} con I. ferrooxidans a las 96 horas.

Las cepas 3, 4 y 5 produjeron a una concentración de 0.5 g/l 66.97, 54.60, 57.90% de Fe^{3+} , respectivamente, y a la concentración de 1.0 g/l, 72.27, 86.18 y 72.27% de Fe^{3+} , con las cepas 3, 4 y 5, respectivamente, - figs. 16, 17 y 18, cuadro 9.

A una concentración de 2.0 g/l, la única cepa que logro oxidar completamente el Fe^{2+} , a las 96 horas fue la cepa 3, esto está de acuerdo con lo reportado por Gutiérrez et al. (1968), fig. 19, cuadro 9.

Con las concentraciones de 4.4 y 44.22 g/l, esta última concentración del medio 9k original, las cepas 3 y 4 oxidaron el sustrato Fe^{2+} completamente, a las 72 horas, y la cepa 5 lo realizó a las 96 horas figs. 20, 21 cuadro 9. Estos resultados coinciden con lo reportado por Silverman et al. (1959), Unz et al. (1960), Gutiérrez et al. (1968) y Touvinen et al. (1971).

Sulfato de Amonio.

A la concentración de 3.5 g/l de sulfato de amonio se obtuvo, con las tres cepas, la máxima oxidación (100% de Fe^{2+} oxidado a las 96 horas). En orden decreciente, con la concentración de 1.5 g/l (de 72 a 82%) y, por último, a la concentración de 6.6 g/l, se apreció un efecto inhibitorio sobre las tres cepas, llegando unicamente a ser oxidado de un 50 a 54% de Fe^{2+} a las 96 horas de incubación. figs. 22, 23 y 24, cuadro 10. Según nuestros resultados la concentración de 3.5 g/l de ésta sal, resulto ser la más adecuada, permitiendo la completa oxidación de Fe^{2+} a las 72 horas, por las cepas 3 y 4, y a las 96 horas por la cepa 5. fig. 23, cuadro 10.

Los resultados obtenidos con las cepas 3 y 4 coinciden con los reportados por Unz et al. (1960), y Kinsel (1960), mientras que los resultados con la cepa 5 son similares a los de Gutiérrez et al. (1968).

Sulfato de Magnesio

A una concentración de 0.5 g/l de sulfato de magnesio, las tres cepas realizaron a las 96 horas la completa oxidación del sustrato Fe^{2+} , fig. 25, cuadro 11.

A concentraciones de 1.0 y 2.5 g/l de esta sal, la velocidad de oxidación del Fe^{2+} disminuyó sensiblemente, fig. 26, cuadro 11. Con la concentración de 1.0 g/l de sulfato de magnesio, las tres cepas, a las 96 horas oxidaron de 60.35 a 64.75% de Fe^{2+} . Mientras que con la tercera concentración las cepas 3 y 5 produjeron la mayor oxidación (67.88% de Fe^{3+}). fig. 26 y 27, cuadro 11. Silverman et al. (1959 a, b,) obtuvieron con F. ferrooxidans y a una concentración de 0.5 g/l, resultados similares.

Fosfato dipotásico.

Los cultivos desarrollados a una concentración de 0.5 g/l de K_2HPO_4 , produjeron 87.99% de Fe^{3+} con las cepas 3 y 5 y 50.27% de Fe^{3+} con la cepa 4 a las 96 horas de incubación, fig. 28, cuadro 12. A una concentración de 1.0 y 2.7 g/l, de esta misma sal, las cepas 3 y 5 disminuyeron su velocidad de oxidación del Fe^{2+} , a la vez que la cepa 4 mostró un aumento en su velocidad de oxidación a la concentración de 2.7 g/l de K_2HPO_4 en el mismo período de incubación. figs. 29 y 30, cuadro 12. Estos resultados son análogos a los de Silverman et al. (1959) y Beck (1960).

Efecto de la glucosa en el medio de cultivo completo.

El crecimiento de las tres cepas bacterianas, en este medio de cultivo, fué similar al encontrado en el medio 9k original. Las cepas 3 y 4 casi no resultaron afectadas por la glucosa, oxidando de 95.76 y 93.29% de Fe^{2+} , respectivamente, a las 96 horas. Un efecto contrario se apreció con la cepa 5, en la cual se logró una baja oxidación de Fe^{2+} igual a 32.82% de Fe^{3+} , fig. 15, cuadro 8. Estos resultados no están de acuerdo con los primeros estudios realizados por Colmer et al. (1951) con I. ferrooxidans, y los hechos por Lundgren et al. (1956) con F. ferrooxidans.

Estos investigadores indicaron una inhibición del crecimiento de estas bacterias cuando el medio contenía materia orgánica (glucosa). Sin embargo, Shafia et al. (1969) y Remsen et al. en Tabita et al. (1971 a, b, c), indicaron que estas bacterias crecen en este medio utilizando como primer sustrato energético al Fe^{2+} el cual, una vez agotado, provoca la utilización de la glucosa, este comportamiento Tabita et al. (1971 a, b, c), lo han relacionado con la aparición, en las bacterias, de una capacidad enzimática que les permite disparar un mecanismo heterotrófico, del cual se tienen pocas evidencias experimentales.

Asimilabilidad de la glucosa en el medio de cultivo con atmósfera pobre en CO_2 .

Esta prueba permitió observar la capacidad para utilizar efectivamente el carbono orgánico (glucosa) por las tres cepas. Las cepas 3 y 5 crecieron ligeramente en este medio de cultivo, como lo indica la escasa oxidación del Fe^{2+} .

La cepa 4 fue incapaz de crecer en este medio de cultivo, cuadro 13. Los resultados obtenidos con las cepas 3 y 5 coinciden con los reportados por Shafia et al. (1969) y Tabita et al. (1971 a,b,c), Estos autores encontraron que estos thiobacilli pueden adaptarse a cultivos que contienen glucosa como única fuente de carbono, perdiendo su capacidad oxidar Fe^{2+} cuando se inoculan a medio $9k-Fe^{2+}$ nuevamente, demostrando así un carácter heterotrófico.

Medio de Cultivo con baja tensión de Oxígeno.

Las cepas 3 y 4 no crecieron bajo estas condiciones, en tanto que la cepa 5 fué la única que realizó una escasa oxidación de Fe^{2+} , después de un período de incubación de 5 días, cuadro 14.

En el cuadro 15 se indica la comparación entre nuestros resultados para las pruebas fisiológicas de las tres cepas enunciadas anteriormente, y las reportadas en la literatura.

Cuadro 1 Comparación entre las características morfológicas de T. ferrooxidans reportadas en la literatura y las de las cepas (3,4 y 5) sujetas a estudio.

Especie	Forma	Tamaño micras	Motilidad	Gram	Giemsa
<u>T. ferrooxidans</u> , Colmer et al. (1951) y Unz et al. (1960).	Célula redonda, cor- ta y aisla- da.	0.5 x 1.0	+	+	?
<u>F. ferrooxidans</u> , Leathen et al (1954). y Unz et al (1960).	Célula redonda y -- aislada.	0.6 x 1.0 - 1.5	+	+	?
<u>F. sulfooxidans</u> , Kinsel (1960).	Célula redonda, ais- lada, raramente en - pares.	0.5 x 1.0 -	+	+	?
<u>T. ferrooxidans</u> , Bergey (1974).	Células redondas, sim- ples o en - pares, oca- sionalmente en cadenas.	0.5 x 1.0	+	+	acidofila (Jacson et al. (1968) y Niemi et al (1972).
Clave de la cepa bacte- riana.					
3	Cocobacilos pequeños, - aislados o pares.	0.6 - 0.8 x 1.0	+	+	acidofila
4	Cocobacilos aislados, o- casionalmente en cadenas.	0.5 - 0.8 x 1.0	+	+	acidofila
5	Cocobacilos aislados en cadenas.	0.6 - 0.8 x 1.0	+	+	acidofila

Cuadro 2 Comparación entre características culturales de I. ferrooxi-
dans reportadas en la literatura y las (cepas 3, 4 y 5) --
objeto a estudio.

Especie	Agar-Fe ²⁺	Agar-azufre	Agar -tiosulfato
<u>I. ferrooxi-</u> <u>dans</u> . Colmer et al.(1951), Bryner <u>et al</u> (1959).	Colonias elevadas, rígidas de color ocre rojizas, gra- nulares, lustrosas, y redon- das.		Colonias pequeñas de margenes irregulares blancas en el centro.
<u>F. ferrooxi-</u> <u>dans</u> . Leathen <u>et al</u> (1954).	Colonias pequeñas con mar- genes irregulares, húmedas, de color pardo.		
<u>F. sulfooxi-</u> <u>dans</u> . Kinsel (1960).	Colonias circulares, con margenes regulares, obs- curas en el centro.		Colonias con áreas cla- ras, irregulares y de margenes ondulados.
<u>I. ferrooxi-</u> <u>dans</u> . Bergey (1974).	La apariencia colonial varía de acuerdo con la concentra- ción de Fe ²⁺ . A baja concen- tración las colonias son mi- croscópicas de color ámbar, - lobuladas y con óxido ferrico hidratado. A elevada concentra- ción de Fe ²⁺ , el crecimiento de las colonias fué abundante y, las colonias fueron costro- sas.	Medio turbio, colonias -- irregulares y blancas.	Colonias planas con mar- genes irregulares, lle- gando a ser blancas en el centro.
Clave de la cepa bacte- riana.			
3	Colonias en pares o aisladas, ovaladas, con bordes bien de- limitados, de color ocre y -- oscuros en el centro.	Colonias mucoides aisladas transparentes.	
4	Colonias pares ovaladas, ele- vadas, de color ocre o amari-	Colonias mucoides, aisladas, y transparentes.	Colonias microscópicas, circulares de color ro- sado a blanco, planas y duras.
5	Colonias elevadas, de forma irregular o redonda, con bor- des delimitados, color amari- llo (pardo) a ocre.	Colonias mucoides, transpa- rentes, que sobresalen del agar.	Colonias blancas, granu- lares, con margenes irre- gulares, microscópicas.

Cuadro 3 Efecto del pH en la utilización del sustrato Fe²⁺ por las cepas (3,4 y 5). Medio 9k original.

Clave del cultivo bacteriano.	Tiempo de incubación en horas.									
	0		24		48		72		96	
	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %
Testigo	1.95	0.0	1.90	0.0	1.90	0.0	1.85	0.0	1.85	0.0
3	1.95	0.0	1.95	31.15	1.90	31.60	1.80	35.65	1.80	27.90
4	1.95	0.0	1.75	9.20	1.75	10.02	1.75	10.02	1.70	24.60
5	1.95	0.0	1.75	25.87	1.70	25.87	1.80	36.75	1.80	36.80
Testigo	2.30	0.0	1.90	0.0	1.85	0.0	1.75	0.0	1.80	0.0
3	2.30	0.0	1.85	10.0	1.75	75.38	1.70	100.0	1.70	100.0
4	2.30	0.0	1.85	10.0	1.75	49.64	1.70	100.0	1.70	100.0
5	2.30	0.0	2.00	28.0	1.90	87.42	1.85	100.0	1.85	100.0
Testigo	2.75	0.0	2.60	0.0	2.55	0.0	2.50	0.0	2.55	0.0
3	2.75	0.0	2.55	26.55	2.50	81.10	2.50	100.0	2.45	100.0
4	2.75	0.0	2.60	14.28	2.40	52.63	2.45	100.0	2.45	100.0
5	2.75	0.0	2.65	28.52	2.40	88.03	2.40	90.53	2.50	100.0
Testigo	2.85	0.0	2.97	0.0	2.70	0.0	2.85	0.0	2.80	0.0
3	2.85	22.04	2.80	22.04	2.65	51.29	2.65	84.91	2.60	100.0
4	2.85	22.04	2.95	25.81	2.65	81.76	2.70	93.71	2.65	100.0
5	2.85	19.53	2.95	19.53	2.70	63.53	2.67	83.02	2.60	93.71
Testigo	3.00	0.0	3.05	0.0	3.05	0.0	2.85	0.0	2.80	0.0
3	3.00	0.0	2.75	68.56	3.05	90.56	2.75	100.0	2.75	100.0
4	3.00	0.0	3.05	81.13	3.10	93.71	2.75	100.0	2.75	100.0

Cuadro 4 Oxidación del azufre en medio 9k.

Clave del cultivo bacteriano.

Tiempo de incubación en días

	0		5		10		15		20		25	
	pH	SO ₄ ⁼ % 4										
Testigo	3.10	1.5	2.90	5.0	2.90	7.0	2.75	14.0	2.45	14.0	2.45	14.0
3	3.10	2.0	1.90	33.25	1.55	52.50	1.25	60.50	1.20	84.0	1.25	93.50
4	3.10	1.5	1.85	34.00	1.40	77.50	1.20	77.50	1.27	77.50	1.27	77.50
5	3.10	1.5	1.95	19.50	1.45	55.55	1.30	65.00	1.10	88.50	1.15	88.50

Cuadro 5 Oxidación del tiosulfato en medio 9k modificado.

Clase del cultivo bacteria- no.	Tiempo de incubación en días															
	0		2		4		6		8		10		12		14	
	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %	pH	Na S O 2 2 3 oxidado %
Testigo	2.95	0.0	2.65	0.0	3.60	0.0	3.9	0.0	4.0	0.00	3.60	0.0	4.05	0.0	4.0	0.0
3	2.85	0.0	2.51	0.0	3.42	5.6	3.9	15.36	4.1	18.10	3.60	18.18	3.95	18.18	3.90	18.18
4	2.90	0.0	2.55	0.0	3.42	0.0	3.75	12.34	3.97	12.30	3.65	12.34	4.00	12.34	3.97	12.34
5	2.95	0.0	2.70	0.0	3.55	0.0	3.90	10.80	3.85	18.10	3.10	30.60	3.55	40.75	3.40	40.75

Cuadro 6 Efecto de tres diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento de las cepas(3,4 y 5).

Clave del cultivo bacteriano.	Fuente de nitrógeno.	Tiempo de incubación en horas.									
		0		24		48		72		96	
		pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %
Testigo	KNO ₃	3.10	0.0	2.90	0.0	3.00	0.0	3.05	0.0	3.05	0.0
3		3.10	0.0	2.70	15.02	2.75	16.66	2.70	84.21	2.75	90.60
4		3.10	0.0	3.00	13.23	3.05	16.66	2.90	60.52	2.90	84.79
5		3.10	0.0	3.20	50.27	3.10	50.55	3.10	77.36	3.10	78.62
Testigo		Urea	3.10	0.0	3.00	0.0	3.05	0.0	3.00	0.0	3.10
3	3.10		0.0	3.10	0.55	3.05	0.55	3.00	20.15	3.00	25.81
4	3.10		0.0	3.15	30.33	3.10	30.33	3.10	47.14	3.05	91.82
5	3.10		0.0	3.20	50.27	3.10	50.55	3.10	77.36	3.10	78.62
Testigo	Peptona		3.10	0.0	3.10	0.0	3.10	0.0	3.10	0.0	3.10
3		3.10	0.0	2.60	8.92	2.60	23.41	2.80	39.60	3.10	42.05
4		3.10	0.0	3.00	13.14	2.80	14.16	2.85	33.85	2.80	33.85
5		3.10	0.0	3.10	0.80	3.05	25.82	2.90	74.5	3.10	74.60

Cuadro 7 Efecto del medio 9k original incompleto en algún nutrimento, en el crecimiento de las cepas (3,4 y 5).

Clave del cultivo bacteriano.	Medio de Cult'vo exento de:	Tiempo de incubación en horas.									
		0		24		48		72			
		pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %
Testigo		2.95	0.0	3.00	0.0	2.90	0.0	2.75	0.0	2.70	0.0
3		2.95	0.0	2.65	27.03	2.75	44.86	2.75	70.17	2.75	70.73
4	(NH ₄) ₂ SO ₄	2.95	0.0	3.00	31.63	2.85	44.86	2.80	70.73	2.75	75.18
5	Ca(NO ₃) ₂	2.95	0.0	3.05	16.10	2.95	44.86	2.90	54.07	2.85	64.41
Testigo		2.95	0.0	3.00	0.0	3.00	0.0	2.95	0.0	2.65	0.0
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.95	0.0	2.95	36.95	2.95	43.38	3.95	80.07	3.00	86.20
4		2.95	0.0	2.95	43.24	2.95	47.78	3.05	76.07	3.00	76.70
5		2.95	0.0	2.85	20.11	2.80	25.15	2.95	58.47	2.85	70.41
Testigo		2.90	0.0	2.90	0.0	3.00	0.0	3.00	0.0	3.00	0.0
3		2.90	0.0	2.90	9.0	2.90	27.96	2.75	91.47	2.60	100.0
4	K ₂ HPO ₄	2.90	0.0	2.90	0.0	2.90	24.14	2.90	37.49	3.00	91.66
5		2.90	0.0	2.95	31.81	2.85	39.84	2.85	93.55	2.95	100.00
Testigo		3.00	0.0	2.98	0.0	3.05	0.0	3.05	0.0	3.05	0.0
3		3.00	0.0	3.00	8.84	3.00	40.0	3.00	81.33	2.90	100.0
4	KCl	3.00	0.0	3.05	4.76	3.10	68.56	3.10	94.13	3.10	100.0
5		3.00	0.0	3.05	31.02	3.10	44.00	3.10	94.13	2.90	100.0

Cuadro 8 Efecto de la glucosa en la utilización del fierro ferroso, medio 9k original.

Clave del cultivo bacteriano.	Tiempo de incubación en horas.									
	0		24		48		72		96	
	pH	Fe ³⁺	pH	Fe ³⁺	pH	Fe ³⁺	pH	Fe ³⁺	pH	Fe ³⁺
Testigo	2.75	0.0	2.50	0.0	2.80	0.0	2.80	0.0	2.80	0.0
3	2.75	0.0	2.55	47.13	2.97	59.54	2.80	8.78	2.30	95.78
4	2.75	0.0	2.50	39.23	3.00	51.14	2.70	87.64	2.25	93.29
5	2.75	0.0	2.55	29.59	2.85	32.43	2.90	34.82	2.95	32.82

Cuadro 9 Efecto de distintas concentraciones de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en el crecimiento de las cepas. 4 2

Clave del cultivo bacteria	Concentración g/l FeSO_4	Tiempo de incubación en horas									
		0		24		48		72		96	
		pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %	pH	Fe ³⁺ %
Testigo	0.5	2.70	0.0	2.95	0.0	3.05	0.0	3.00	0.0	3.00	0.0
3		2.70	0.0	2.85	22.77	2.90	44.40	2.85	54.06	2.80	66.97
4		2.70	0.0	2.65	18.97	2.75	44.40	2.75	44.40	2.75	54.60
5		2.70	0.0	2.90	21.20	2.85	44.40	2.95	44.40	2.90	57.90
Testigo		1.0	2.70	0.0	2.70	0.0	2.75	0.0	3.05	0.0	3.00
3	2.70		0.0	3.00	44.40	2.95	44.40	3.10	72.20	2.85	72.27
4	2.70		0.0	2.85	16.55	2.85	53.85	2.95	72.20	2.90	86.10
5	2.70		0.0	2.70	22.21	2.75	53.85	2.75	72.27	2.70	72.27
Testigo	1.5		3.20	0.0	3.25	0.0	3.10	0.0	3.4	0.0	3.40
3		3.20	0.0	3.10	53.98	3.10	57.98	3.0	81.46	2.85	98.74
4		3.20	0.0	2.97	53.66	3.15	81.46	2.7	98.74	2.70	98.70
5		3.20	0.0	3.15	10.79	3.10	23.45	3.20	44.40	2.65	44.40

Cuadro 10 Efecto de las distintas concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre el crecimiento de las cepas (3,4 y 5). 4 2 4

Clave del cultivo bacteria-no.	Concentración g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Tiempo de incubación en horas									
		0		24		48		72		96	
		pH	Fe ³⁺ %								
Testigo	1.5		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"		0.0	29.53	37.13	68.56	77.36				
4	"		0.0	30.86	40.90	68.56	83.90				
5	"		0.0	30.86	43.14	62.27	72.33				
Testigo	3.3		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"		0.0	71.08	81.14	100.0	100.0				
4	"		0.0	62.29	77.36	100.0	100.0				
5	"		0.0	68.57	74.23	78.63	100.0				
Testigo	6.6		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"		0.0	30.79	39.60	42.33	54.27				
4	"		0.0	38.96	40.23	47.93	51.96				
5	"		0.0	25.76	35.83	42.33	50.24				
Testigo		3.35	0.0	3.40	0.0	3.20	0.0	3.25	0.0	3.15	0.0
3	2.0	3.35	0.0	3.15	9.12	3.20	13.29	2.90	68.39	2.60	95.83
4		3.35	0.0	3.15	9.12	3.15	14.68	3.10	54.76	2.60	89.07
5		3.35	0.0	3.10	11.04	3.10	20.84	2.25	91.66	2.75	94.80
Testigo		2.75	0.0	2.60	0.0	2.55	0.0	2.50	0.0	2.55	0.0
3	4.422	2.75	0.0	2.55	57.0	2.20	71.9	2.35	71.90	2.60	100.0
4		2.75	0.0	2.55	60.60	2.40	74.10	2.45	94.60	2.50	100.0
5		2.75	0.0	2.65	18.61	2.40	78.10	2.40	94.80	2.50	100.0
Testigo		2.95	0.0	2.65	0.0	2.70	0.0	2.90	0.0	2.90	0.0
3		2.95	0.0	2.65	68.56	2.65	90.56	2.95	100.0	2.95	100.0
4	44.2	2.95	0.0	2.95	81.13	2.80	93.71	2.85	100.0	2.90	100.0
5		2.95	0.0	2.93	38.46	2.85	86.66	2.87	91.66	2.85	100.0

Cuadro 11 Efecto de las distintas concentraciones de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en el crecimiento de las cepas bacterianas (3,4 y 5).

Clave del Cultivo bacteriano.	Concentración $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ g/l	Tiempo de incubación en horas.				
		0	24	48	72	96
		3 ⁺ Fe %	3 ⁺ Fe %	3 ⁺ Fe %	3 ⁺ Fe %	3 ⁺ Fe %
Testigo	0,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"	0.0	26.32	56.29	100.0	100.0
4	"	0.0	9.06	49.64	100.0	100.0
5	"	0.0	34.65	88.03	95.83	100.0
Testigo	1,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"	0.0	14.50	14.50	48.88	62.89
4	"	0.0	20.11	48.88	50.93	60.35
5	"	0.0	5.02	28.73	47.78	64.75
Testigo	2,5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"	0.0	10.89	31.69	32.69	67.88
4	"	0.0	18.86	19.11	22.67	55.32
5	"	0.0	11.97	28.92	47.78	67.88

Cuadro 12 Efecto de distintas concentraciones de K_2HPO_4 en el crecimiento de las cepas (3,4 y 5).

Clave del cultivo bacteriano.	Concentración K_2HPO_4 g/l	Tiempo de incubación en horas.				
		0	24	48	72	96
		Fe^{3+} %	Fe^{3+} %	Fe^{3+} %	Fe^{3+} %	Fe^{3+} %
Testigo	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"	0.0	25.16	57.19	57.19	87.99
4	"	0.0	12.69	32.71	41.50	50.27
5	"	0.0	25.17	25.17	30.18	62.87
Testigo	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"	0.0	25.17	44.02	50.20	60.18
4	"	0.0	25.17	37.02	44.02	50.22
5	"	0.0	25.17	25.17	30.18	62.87
Testigo	2.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	"	0.0	12.28	25.15	32.72	88.02
4	"	0.0	12.28	25.15	37.70	69.18
5	"	0.0	12.28	12.58	32.72	32.72

Cuadro 13 Utilización del hierro ferroso en medio 9k con glucosa y atmósfera pobre en CO₂.

Clave del cultivo bacteria- no.	Tiempo de incubación en días.	
	0	5
	3 ⁺ Fe %	3 ⁺ Fe %
Testigo	0.0	0.0
3	0.0	19.49
4	0.0	0.0
5	0.0	26.75

Cuadro 14 Crecimiento en medio 9k original y atmósfera pobre en O_2 , estimación en base a fierro oxidado hecho en cultivos incubados en condiciones de agitación.

Clave del cultivo bacteriano.	Tiempo de incubación en días	
	0	5
	Fe^{3+} %	Fe^{3+} %
	Testigo	0.0
3	0.0	0.0
4	0.0	0.0
5	0.0	8.2

Cuadro 15 Comparación entre las características fisiológicas reportadas en la literatura y las observadas en las cepas (3, 4 y 5).

Especie	pH óptimo	temperatura óptima	Fuentes de Energía			Fuentes de Nitrógeno				Crecimiento en presencia de glucosa.	Asimilación de C orgánico (glucosa) en atmósfera pobre en CO ₂ .	Crecimiento en atmósfera pobre en O ₂ .
			Fe ²⁺	Azufre	Tiosulfato	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	Urea	Peptona			
<i>I. ferrooxidans</i> Colmer <i>et al.</i> (1951).	2.5 - 5.8	28 - 30 °C	+	+	?	-	-	?	?	+	?	?
<i>F. ferrooxidans</i> Leathen <i>et al.</i> (1954).	3.5	15 - 20 °C	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?
<i>F. sulfuroxidans</i> Kinzel (1960).	2.85	32 °C	+	+	+	+	+	+	+	?	?	?
<i>I. ferrooxidans</i>	2.5 - 5.8	15 - 20 °C	+	+	±	+	+	?	?	?	-	-
Clave de la cepa bacteriana.												
3	2.75 - 3.0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
4	2.75 - 3.0	-	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
5	2.75 - 3.0		+	-	+	+	+	+	-	±	+	±

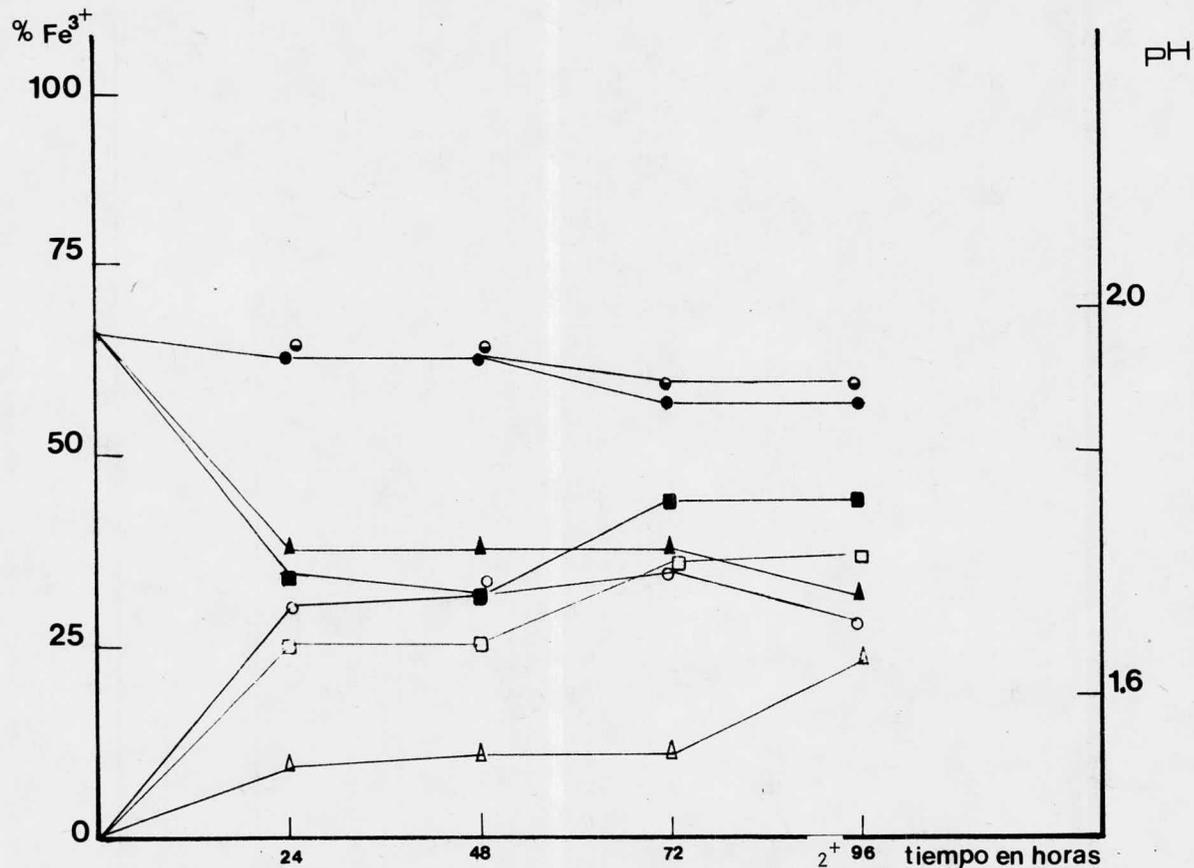


fig. 1 Estimación del crecimiento en medio 9k-Fe, a pH = 1.95, en base al porcentaje de fierro oxidado. ● = testigo de pH; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ de Fe³⁺ de la cepa 3; ▲ de Fe³⁺ de la cepa 4; □ de la cepa 5.

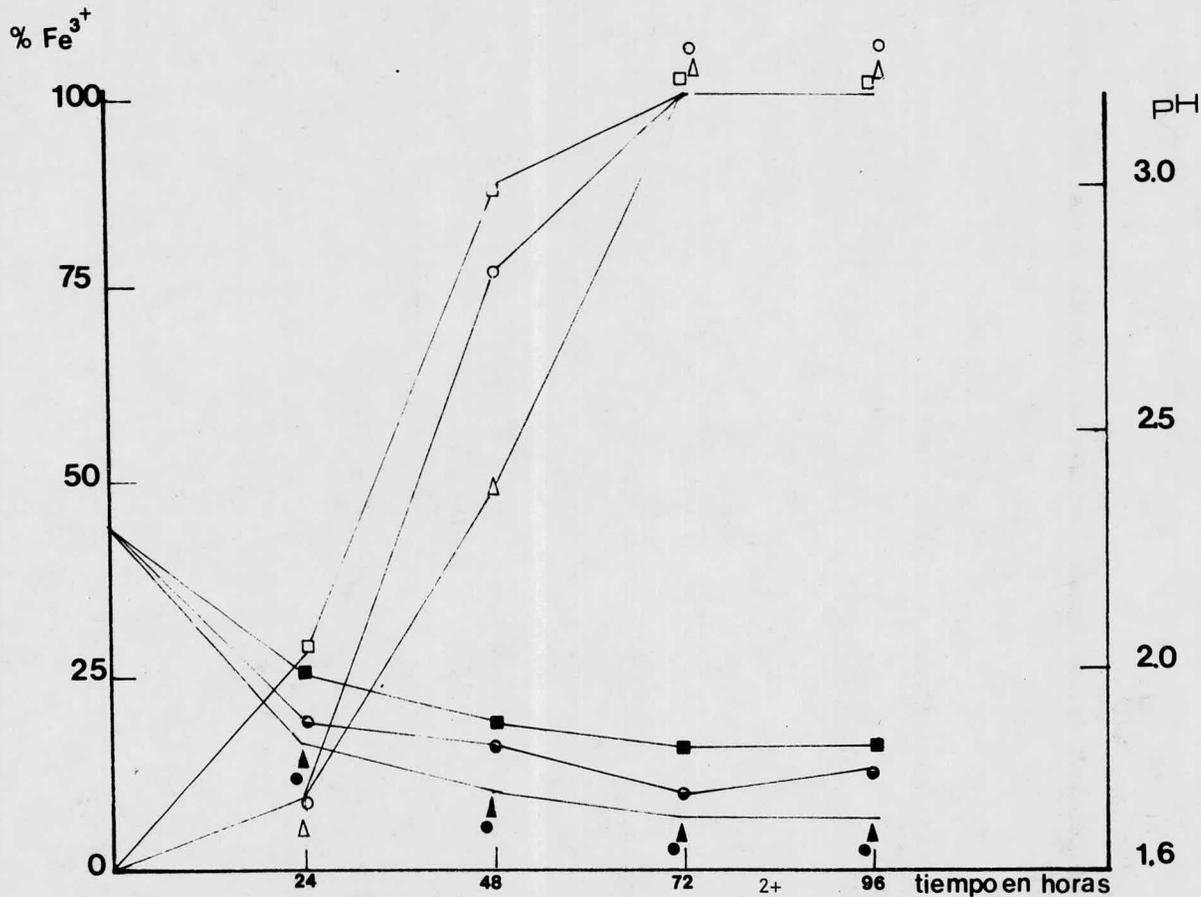


fig. 2

Estimación del crecimiento medio 9k-Fe a pH 2.3, en base al porcentaje de hierro oxidado ● testigo de pH; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe³⁺ de la cepa 3; △ Fe³⁺ de la cepa 4; □ Fe³⁺ de la cepa 5.

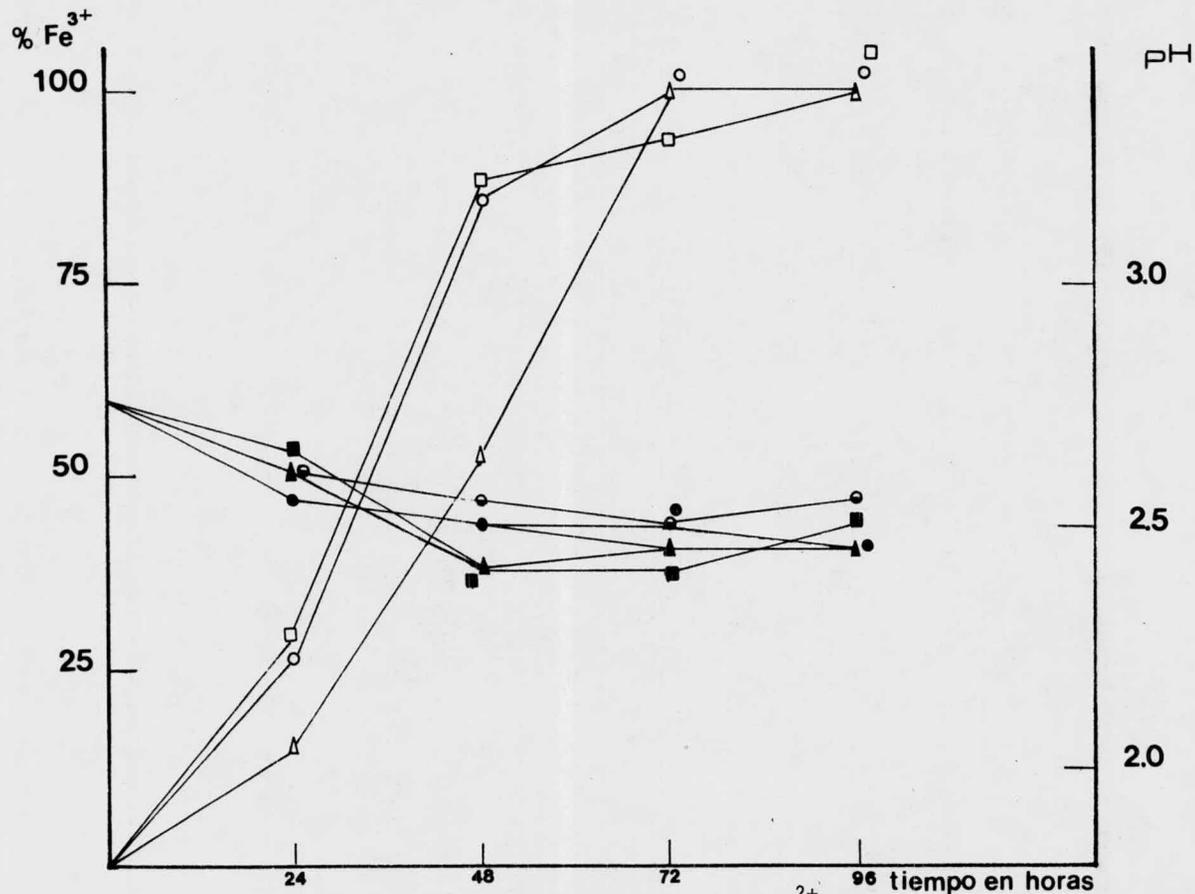


fig. 3 Estimación del crecimiento en medio 9k-Fe²⁺ pH = 2.75, en base al porcentaje de hierro oxidado, ● testigo de pH; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe³⁺ de la cepa 3; ▲ Fe³⁺ de la cepa 4; □ Fe³⁺ de la cepa 5.

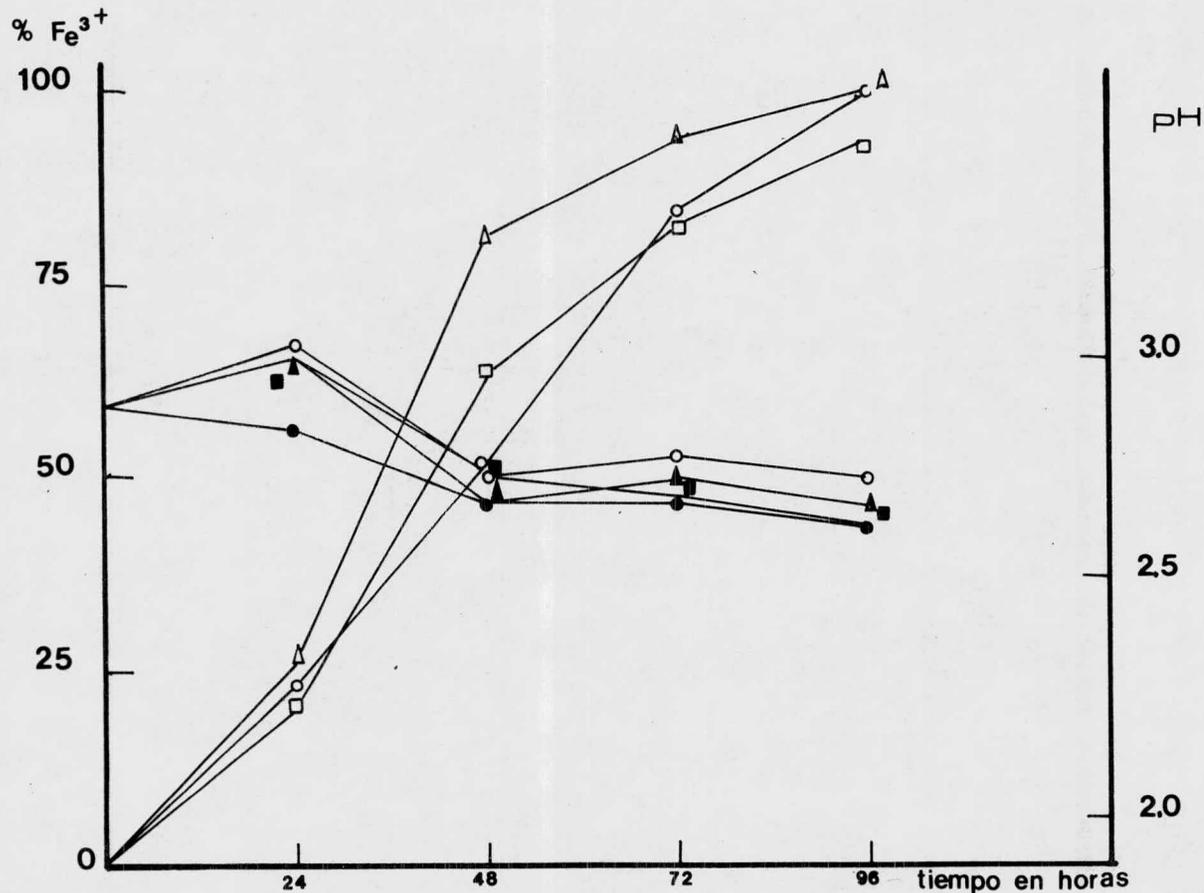


fig. 4. Estimación del crecimiento en medio 9k- Fe^{2+} pH = 2,85, en base al porcentaje de fierro oxidado. ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ○ Fe^{3+} de la cepa 4; ▲ Fe^{3+} de la cepa 3; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

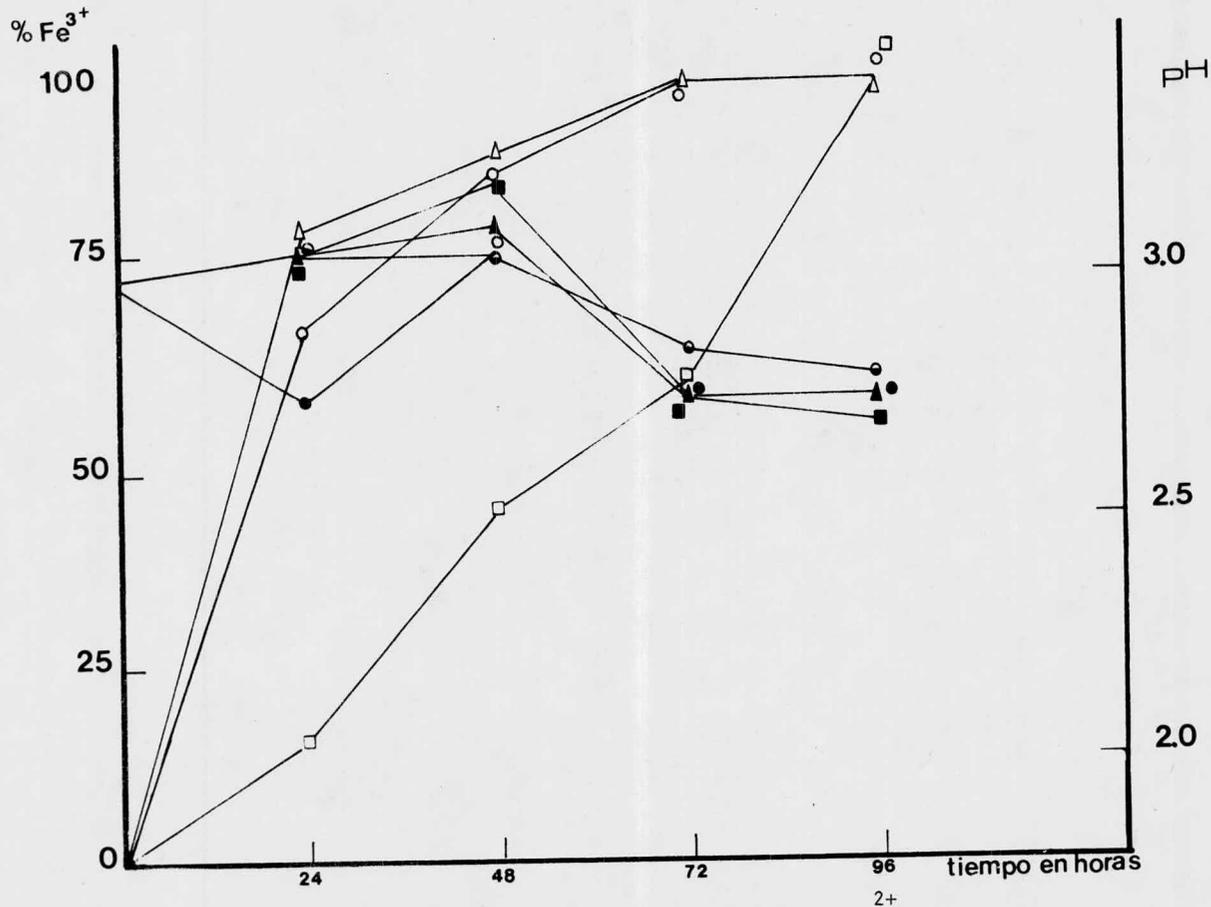


fig.5

Estimación del crecimiento en medio 9k-Fe³⁺ pH = 3.00, en base al porcentaje de hierro oxidado. ● testigo del pH, ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe³⁺ de la cepa 3; △ Fe³⁺ de la cepa 4; □ Fe³⁺ de la cepa 5.

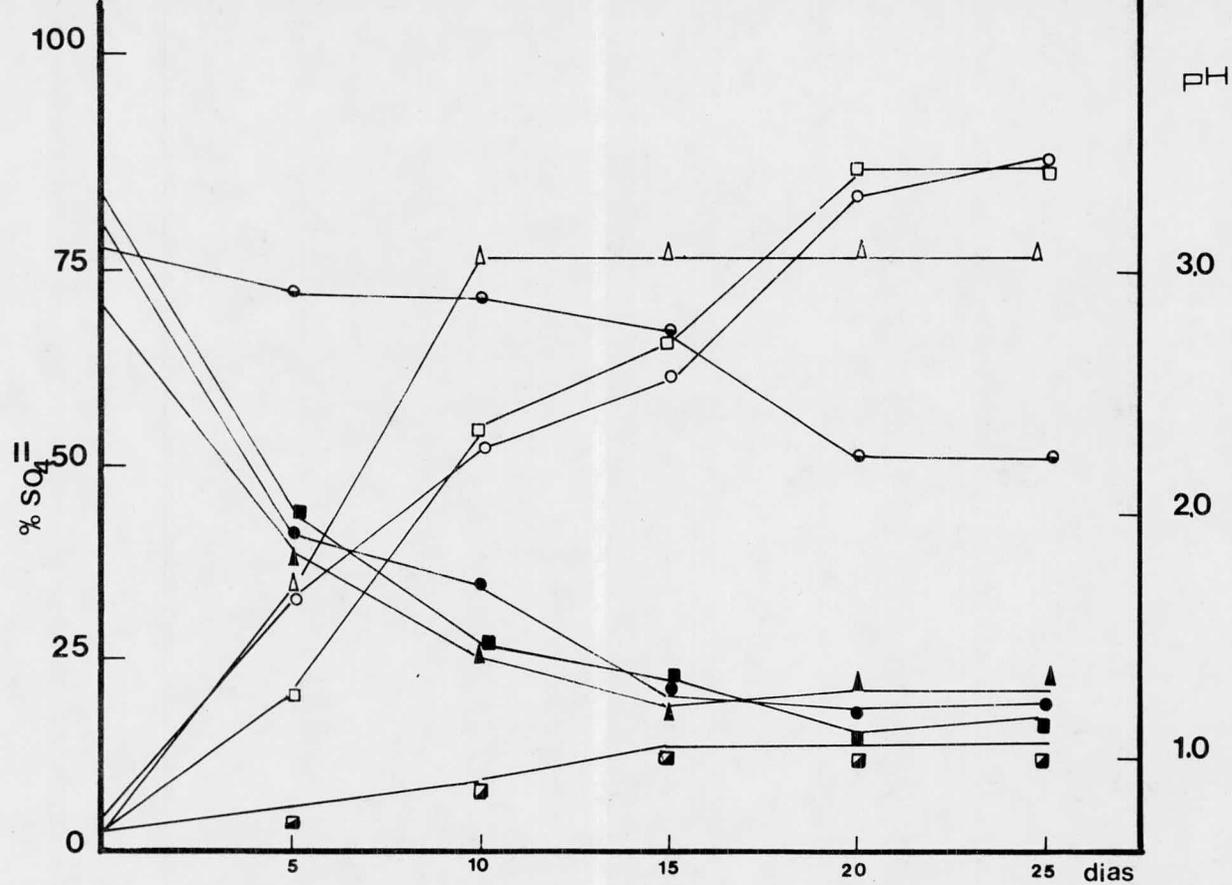


fig. 6 Estimación del crecimiento en medio 9k= azufre, en base al porcentaje de sulfatos formados. ● testigo de pH; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ■ %SO₄ del testigo; ○ %SO₄ de la cepa 3; ▲ %SO₄ de la cepa 4; □ %SO₄ de la cepa 5.

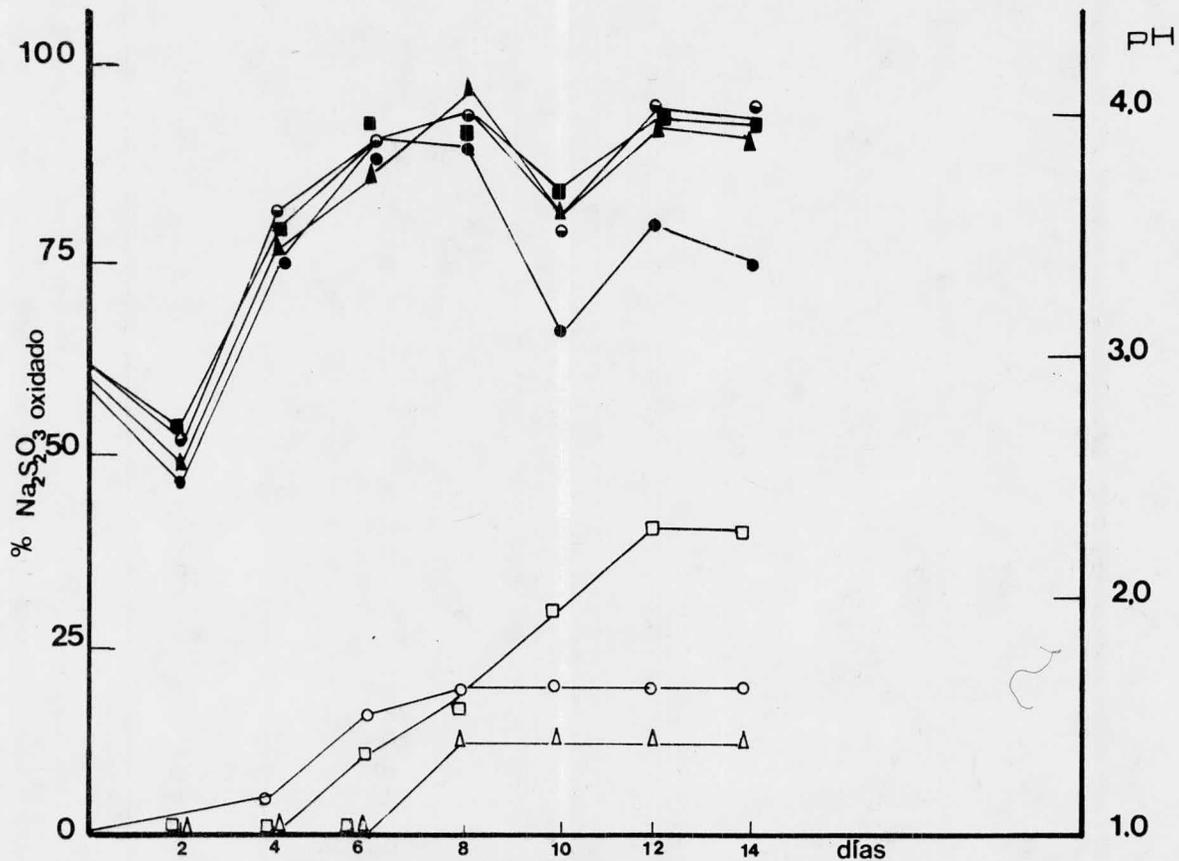


fig. 7 Estimación del crecimiento en medio 9k-tiosulfato, en base al porcentaje de tiosulfato oxidado. ● testigo del pH; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ tiosulfato oxidado cepa 3; ▲ tiosulfato oxidado cepa 4; □ tiosulfato oxidado cepa 5.

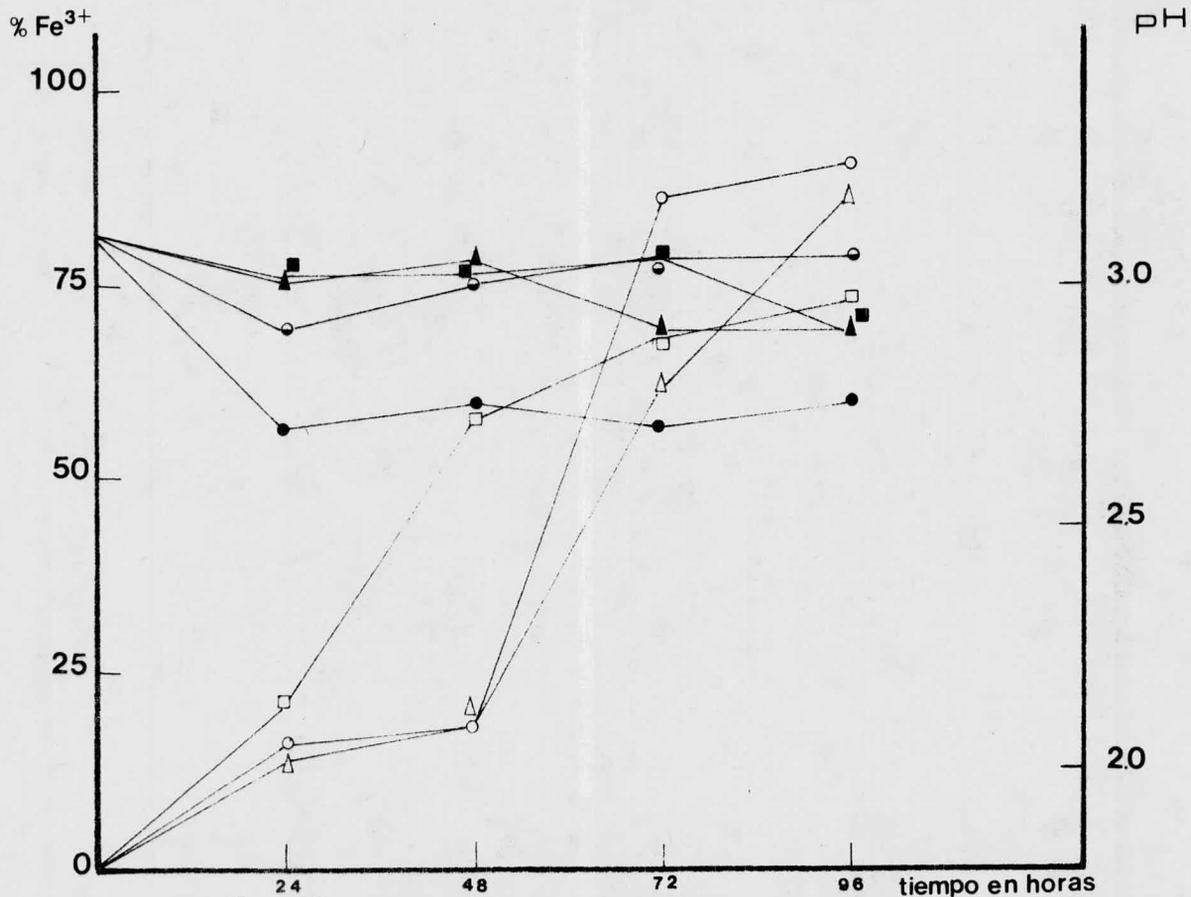


fig. 8

Efecto de KNO_3 (fuente de nitrógeno) en el crecimiento, estimado en base al porcentaje de Fe oxidado. ● testigo del pH; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

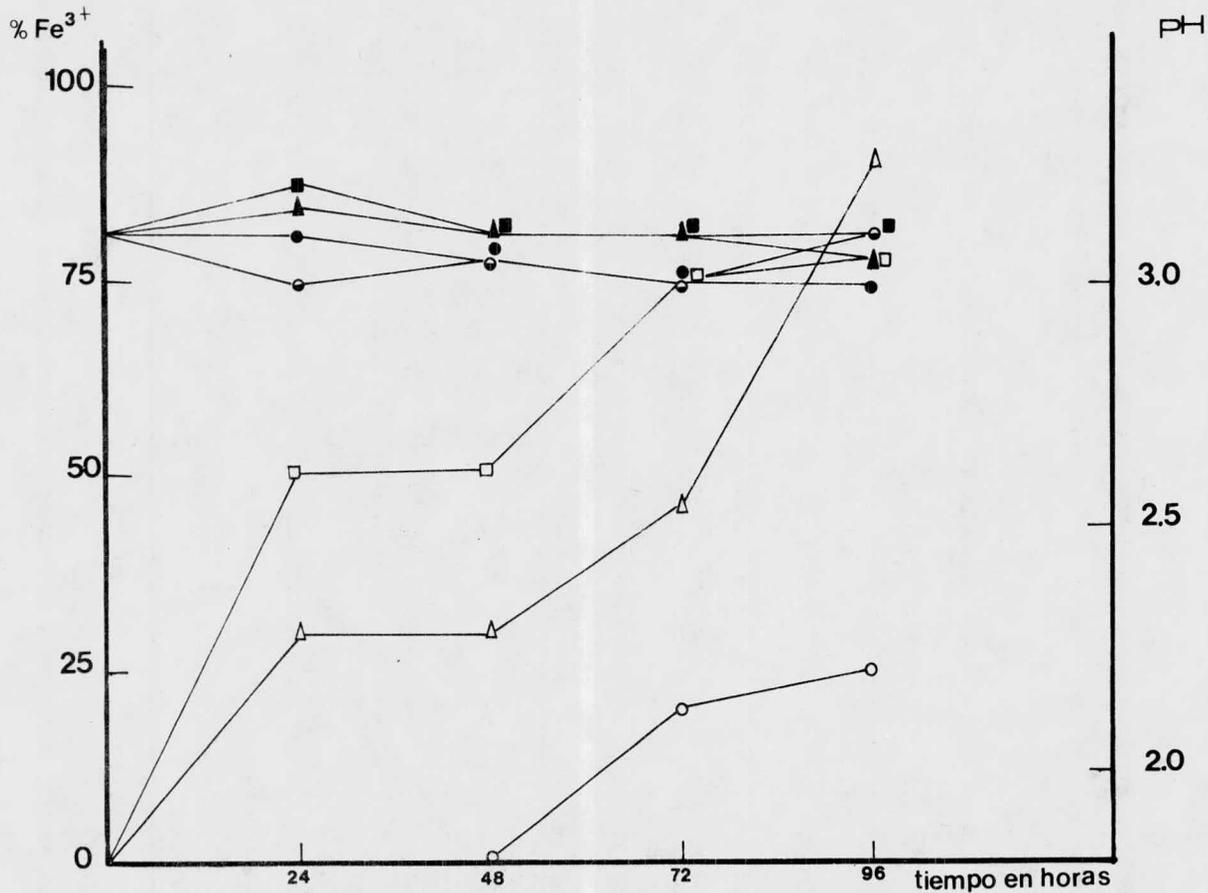


fig. 9

Efecto de la urea(fuente de nitrógeno) en el crecimiento, estimado en base al porcentaje de fierro oxidado, medio 9k mo ificado; ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ Fe³⁺ de la cepa 3; △ Fe³⁺ de la cepa 4; ◻ Fe³⁺ de la cepa 5.

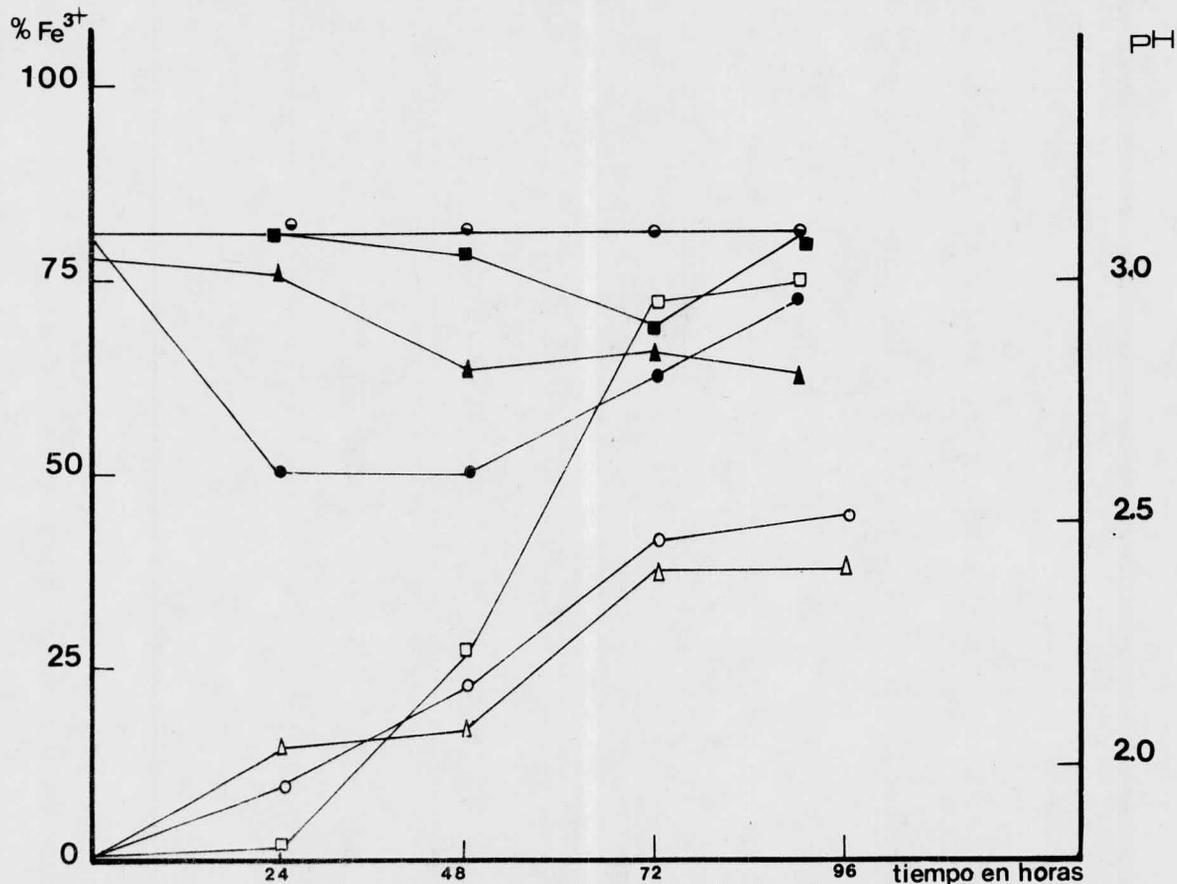


fig. 10

Efecto de la peptona (fuente de nitrógeno) en el crecimiento, estimado en base al porcentaje de hierro oxidado. ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ Fe²⁺ de la cepa 3; ▲ Fe³⁺ de la cepa 4; □ Fe³⁺ de la cepa 5.

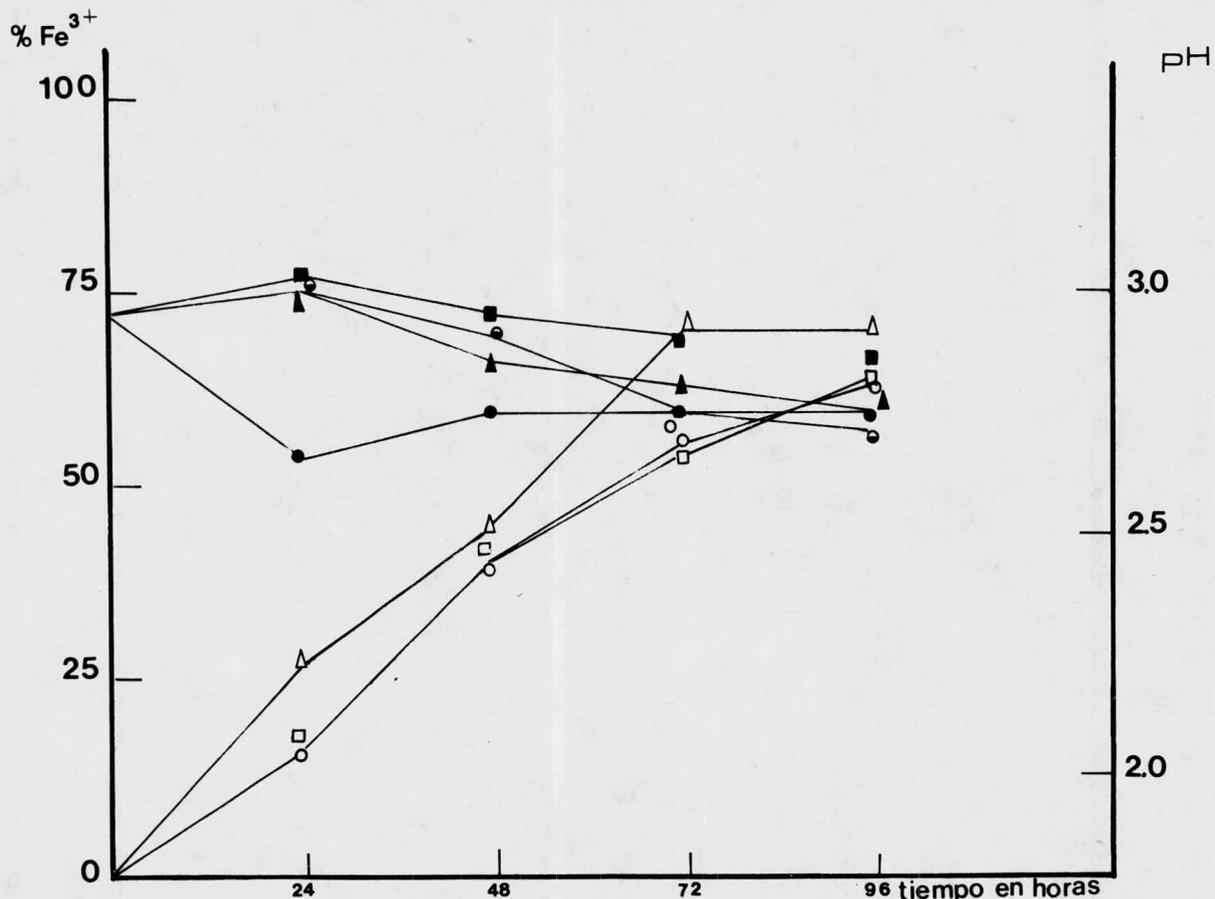


fig. 11

Estimación del crecimiento en medio 9k exento de nitrógeno, en base al porcentaje de fierro oxidado. ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe^{3+} de la cepa 3; ▲ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

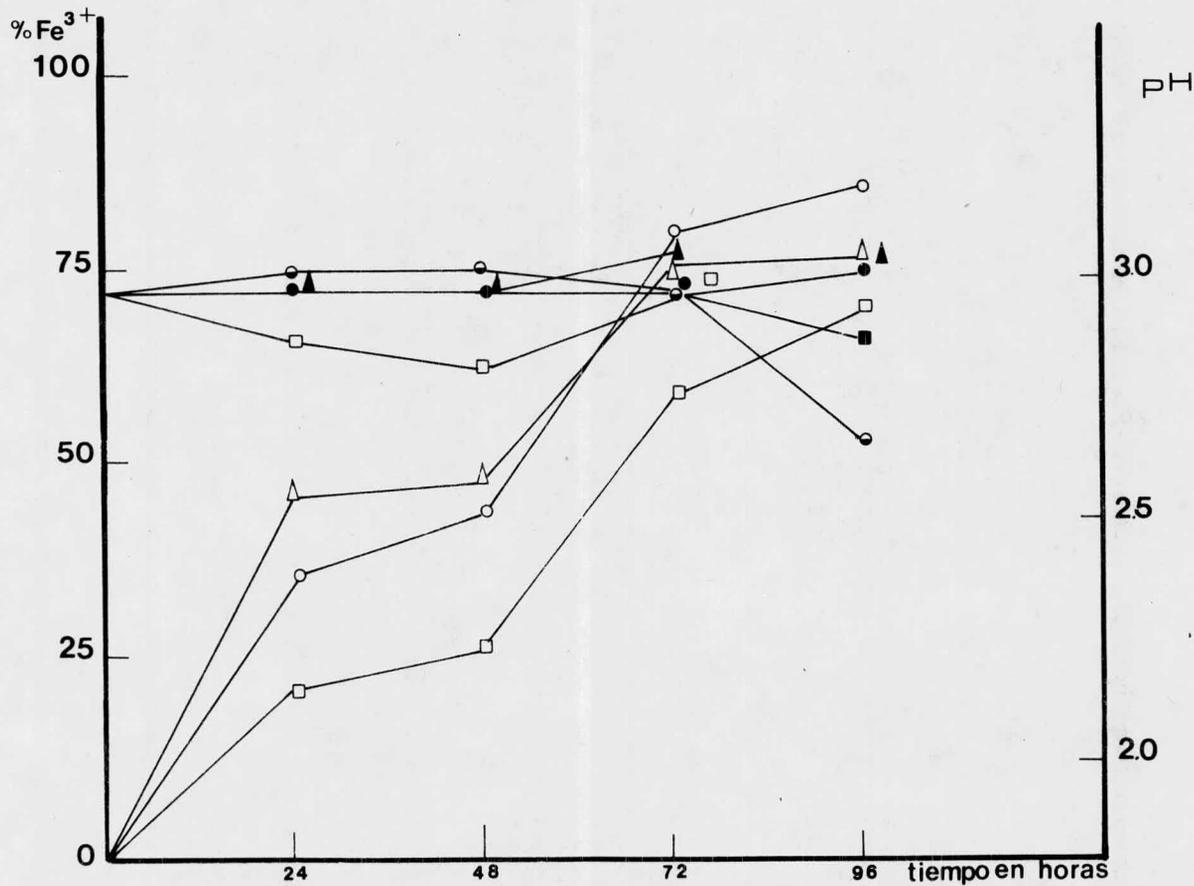


fig. 12 Estimación del crecimiento en el medio 9k exento de ----
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de
 la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de
 la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

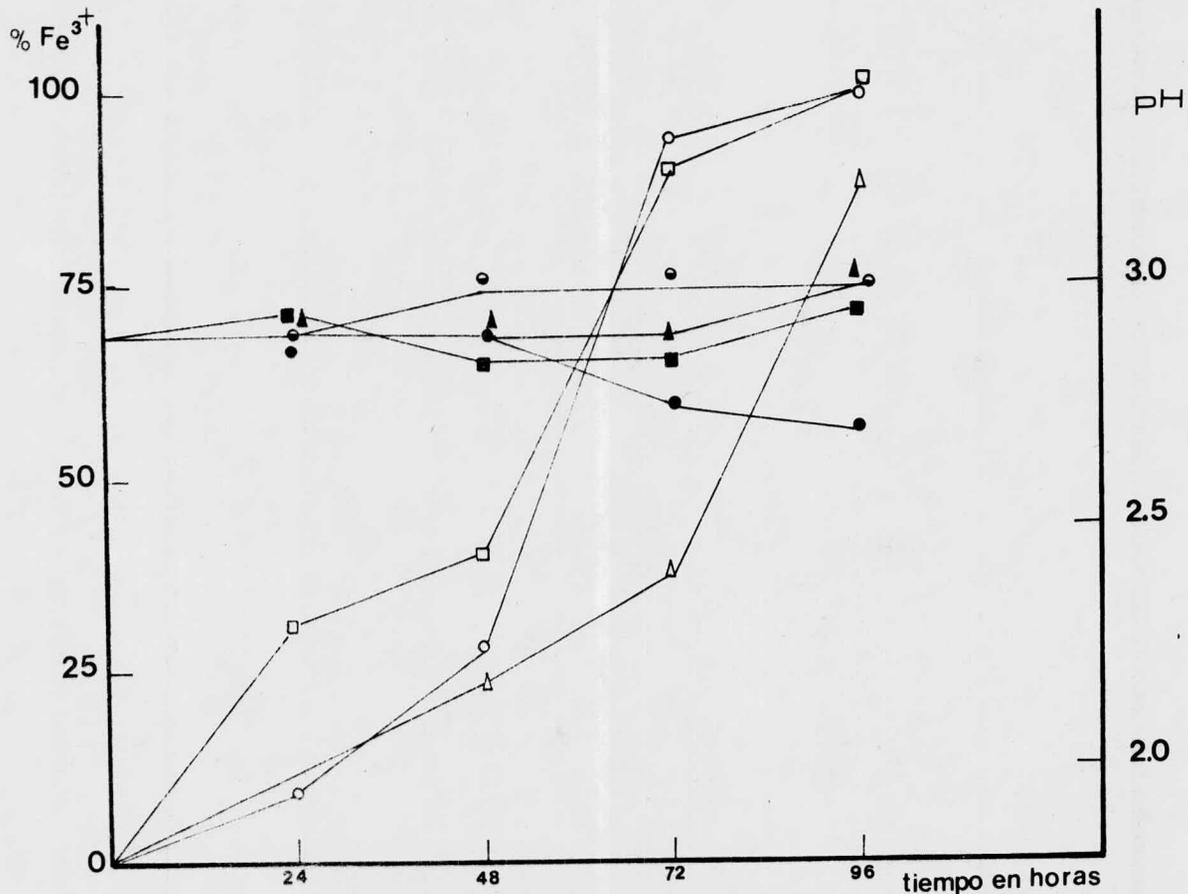


fig. 13

Estimación del crecimiento en medio 9k exento de K_2HPO_4 , estimado en base al porcentaje de fierro oxidado; ● testigo del pH; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

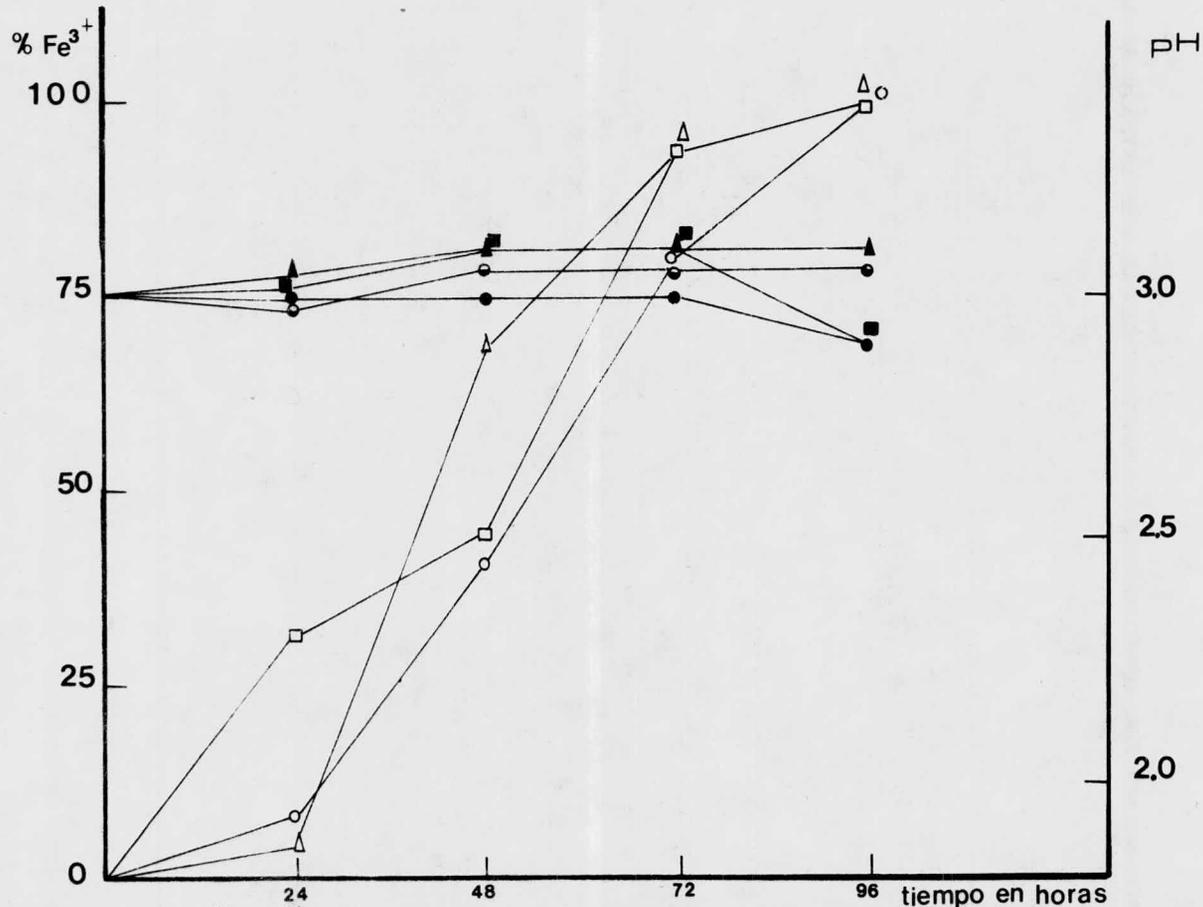


fig. 14

Estimación del crecimiento en medio 9k exento de KCl, en base al porcentaje de hierro oxidado; ● pH del testigo; - ● pH de la cepa 3; ▲ de cepa 4; ■ pH de la cepa 5; -- ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

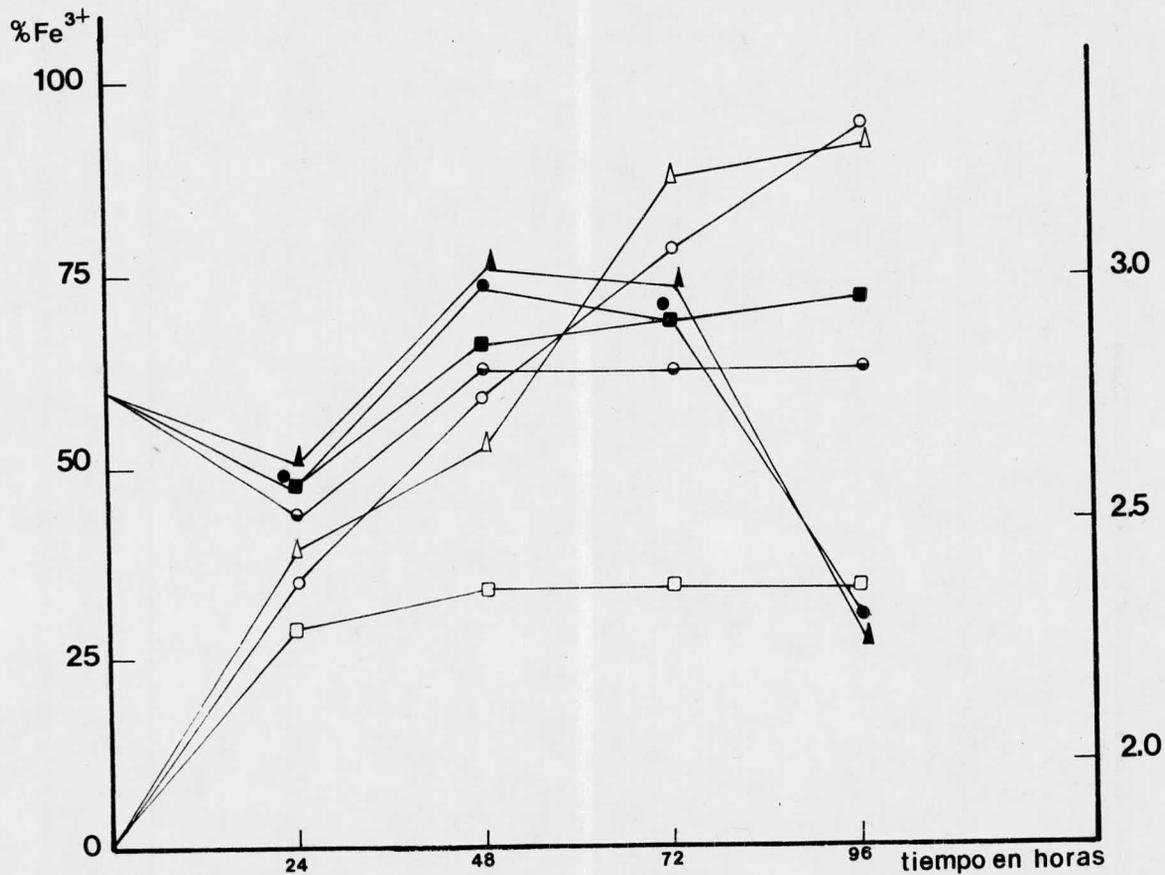


fig. 15

Efecto de la glucosa en el crecimiento, estimado en base al hierro ferroso oxidado. ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ Fe³⁺ de la cepa 3; △ Fe³⁺ de la cepa 4; □ Fe³⁺ de la cepa 5.

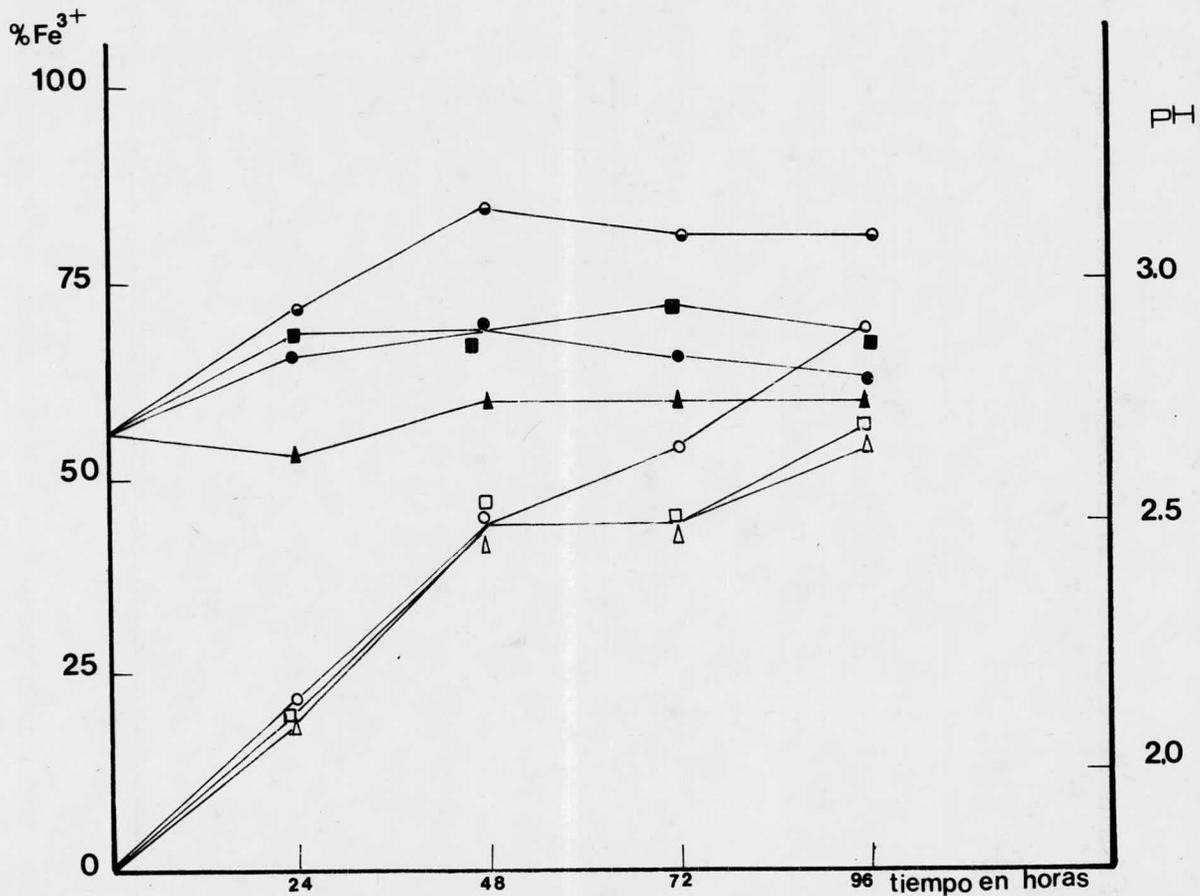


fig. 16

Estimación del crecimiento en medio 9k con una concentración de 0.5 g/l de FeSO_4 , en base al hierro ferroso oxidado; ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; pH de la cepa 5; ○ Fe^{3+} de la cepa 3; ▲ Fe^{3+} de la cepa 4; ○ Fe^{3+} de la cepa 5.

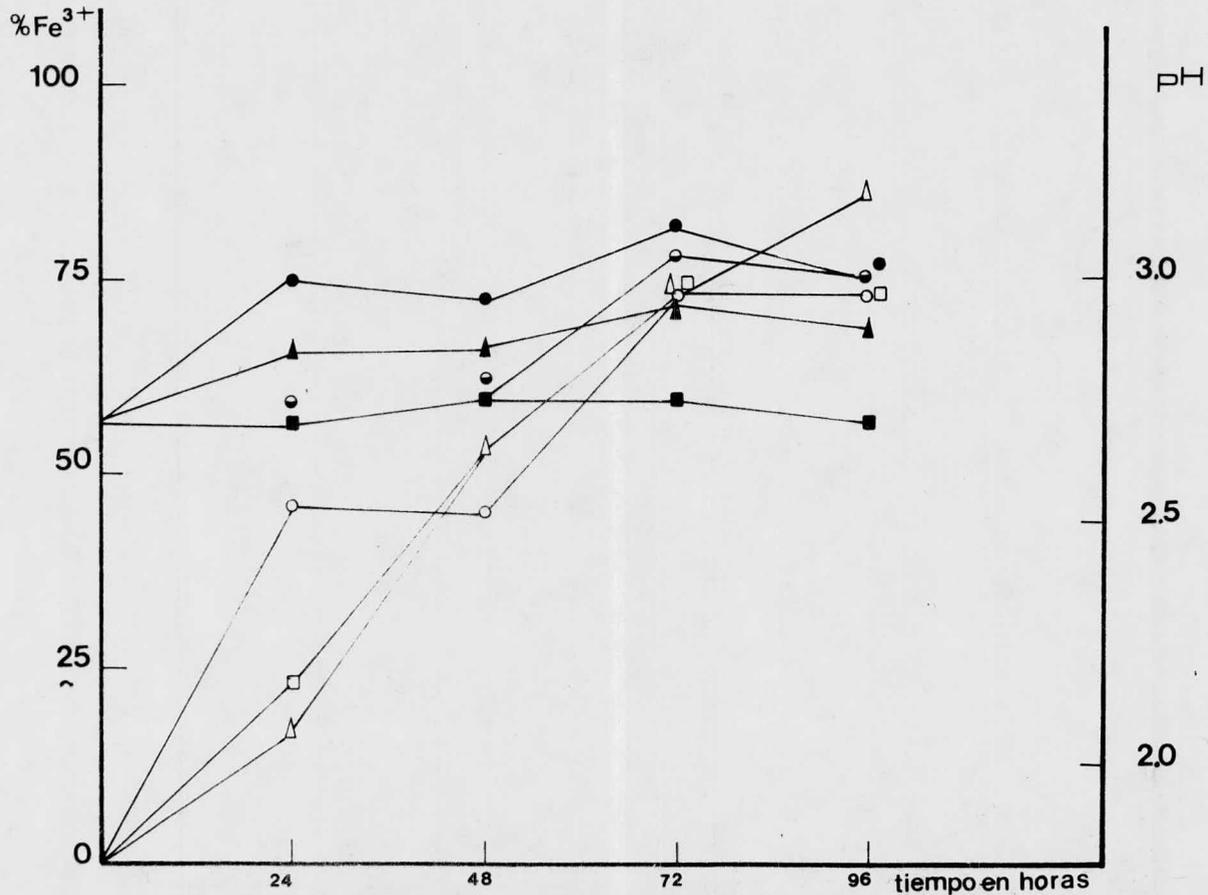


fig. 17

Estimación del crecimiento en medio 9k con una concentración de FeSO_4 de 1.0 g/l, en base al hierro ferro oxidado. ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5; ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

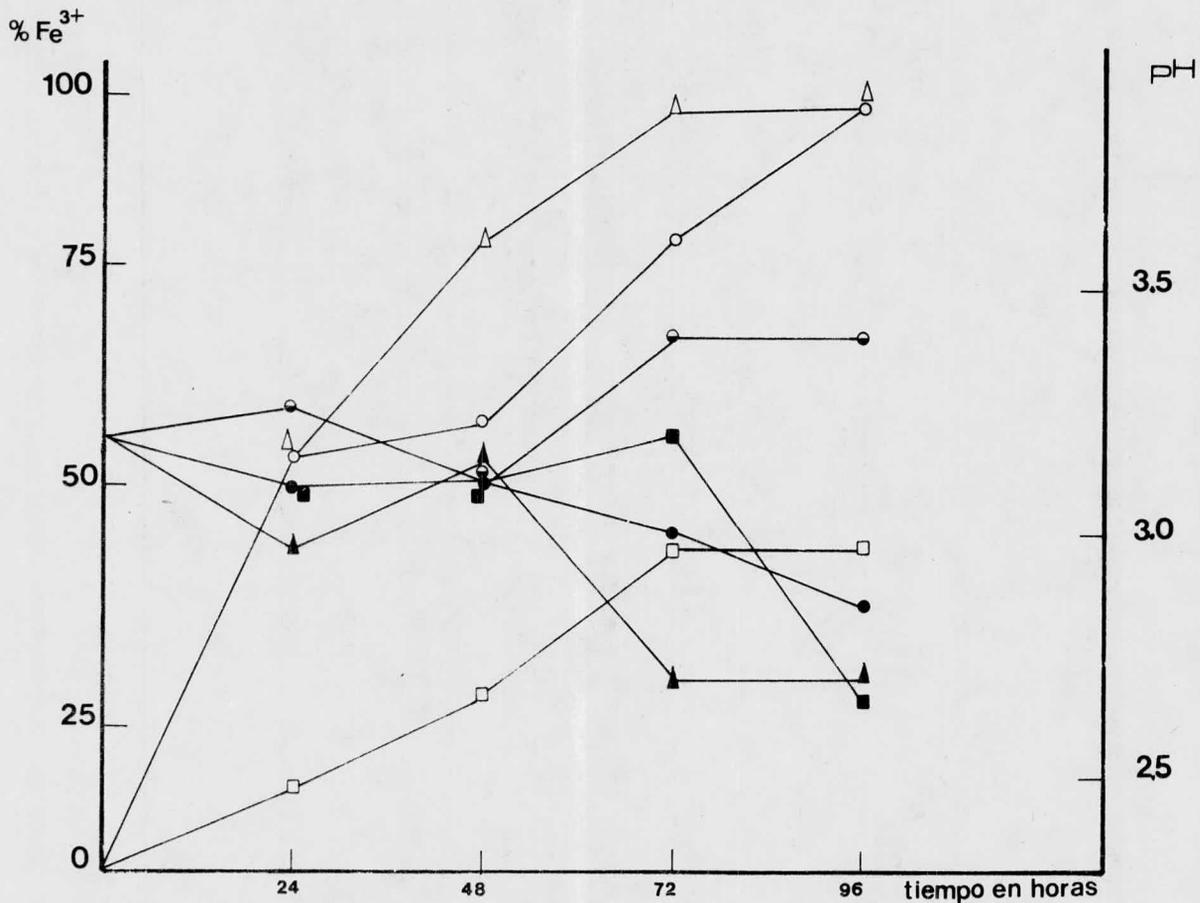


fig. 18

Estimación del crecimiento en medio 9k con 1.5 g/l de FeSO_4 , de FeSO_4 , basado en el porcentaje de fierro oxidado; ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

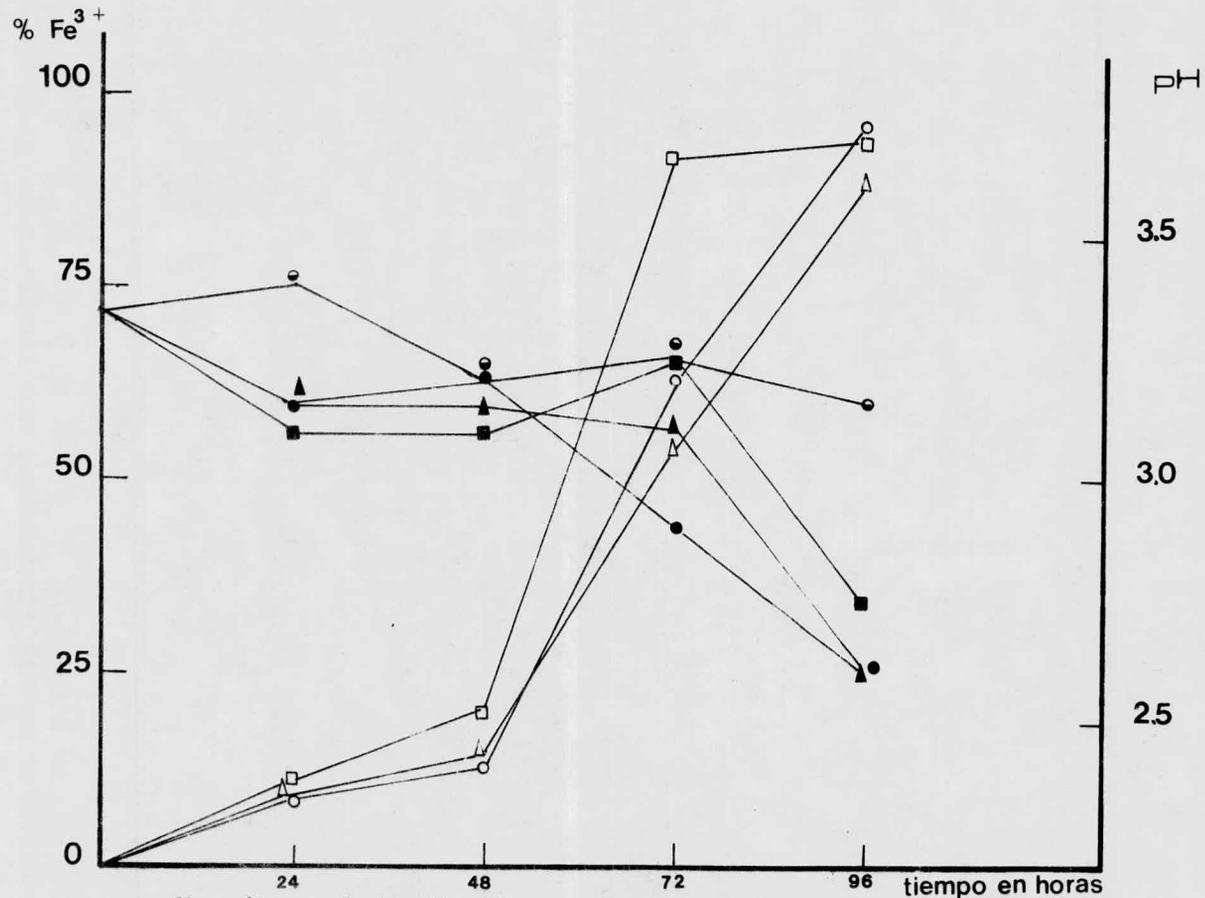


fig. 19

Estimación del crecimiento en medio 9k con una concentración de FeSO_4 de 2.0 g/l, basado en el porcentaje de fierro oxidado. ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

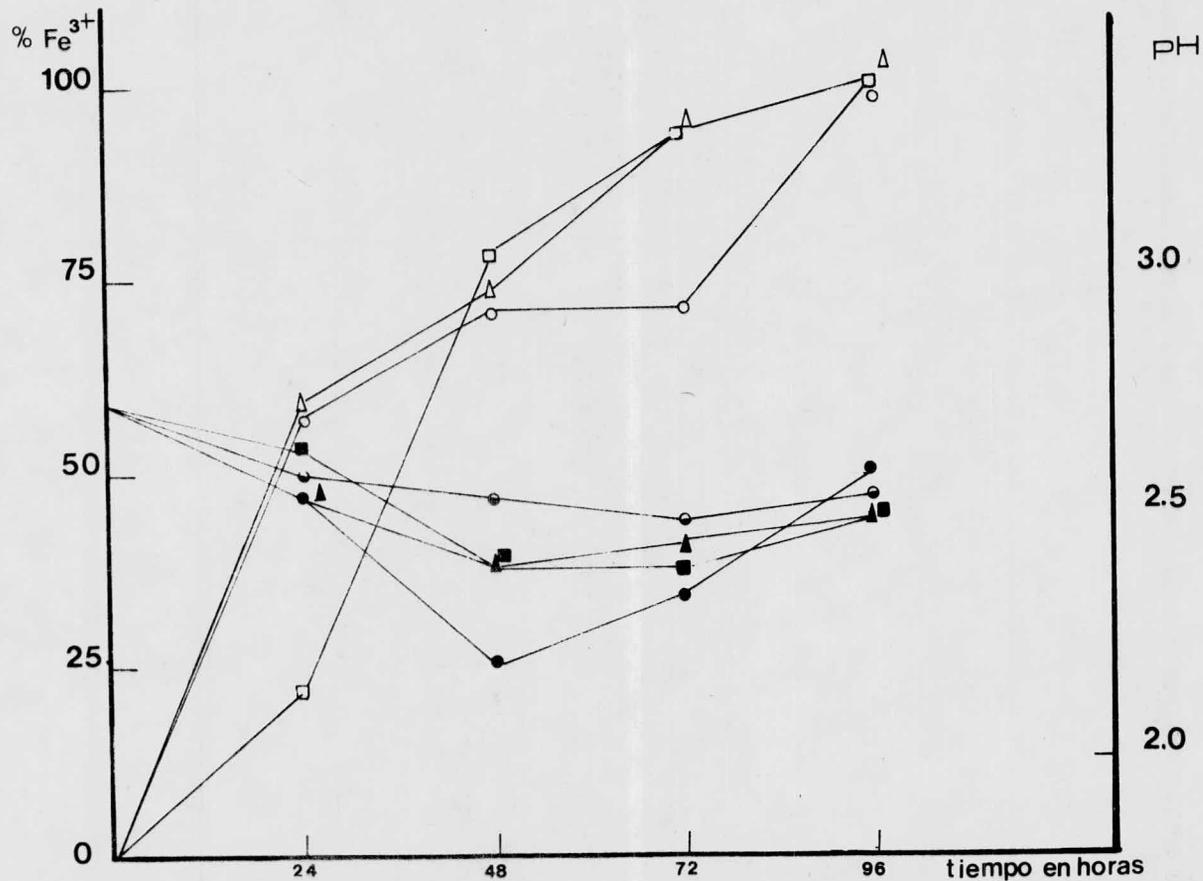


fig. 20

Estimación del crecimiento en medio 9k con una concentración de FeSO_4 de 4,422 g/l basado en el porcentaje de fierro oxidado, ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe^{3+} de la cepa 3; ▲ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

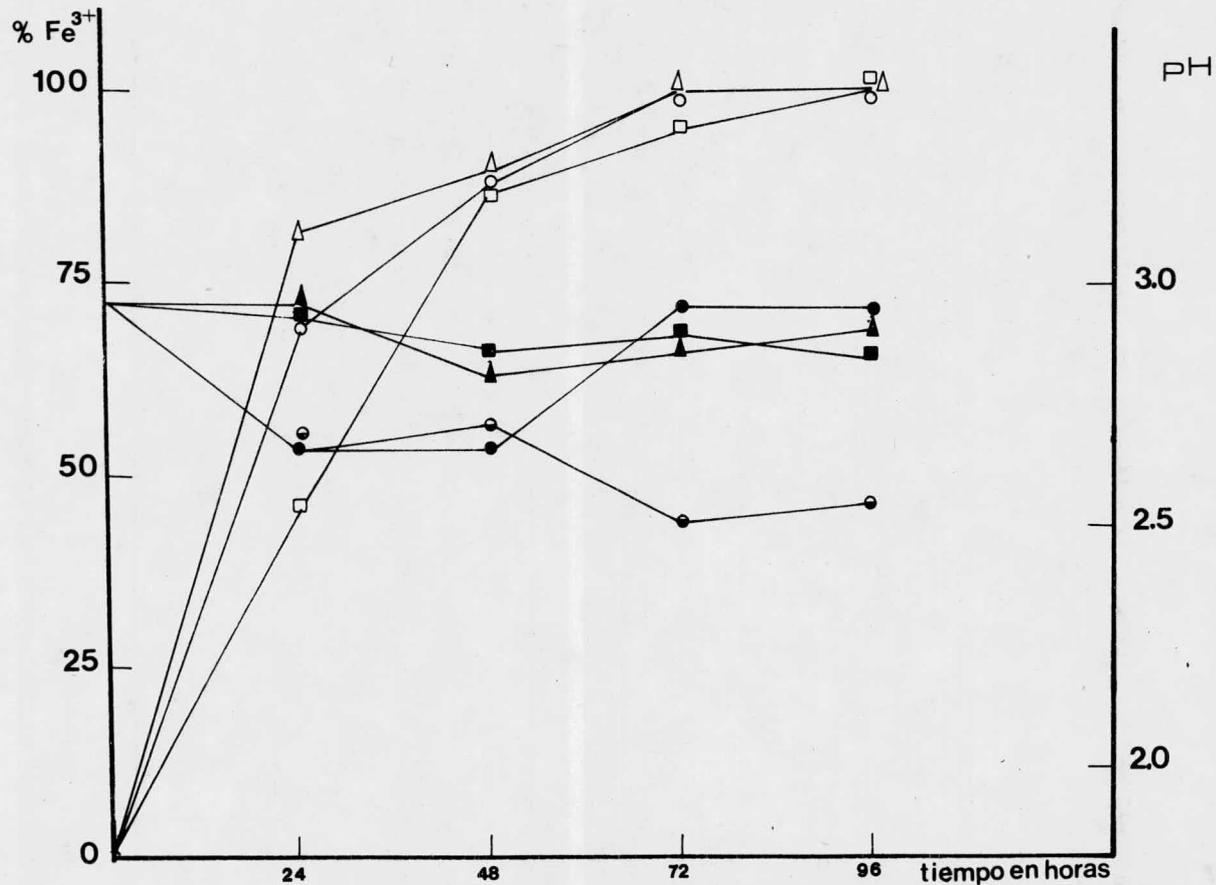


fig. 21

Estimación del crecimiento en medio 9k-original, en base al hierro. ● pH del testigo; ● pH de la cepa 3; ▲ pH de la cepa 4; ■ pH de la cepa 5. ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

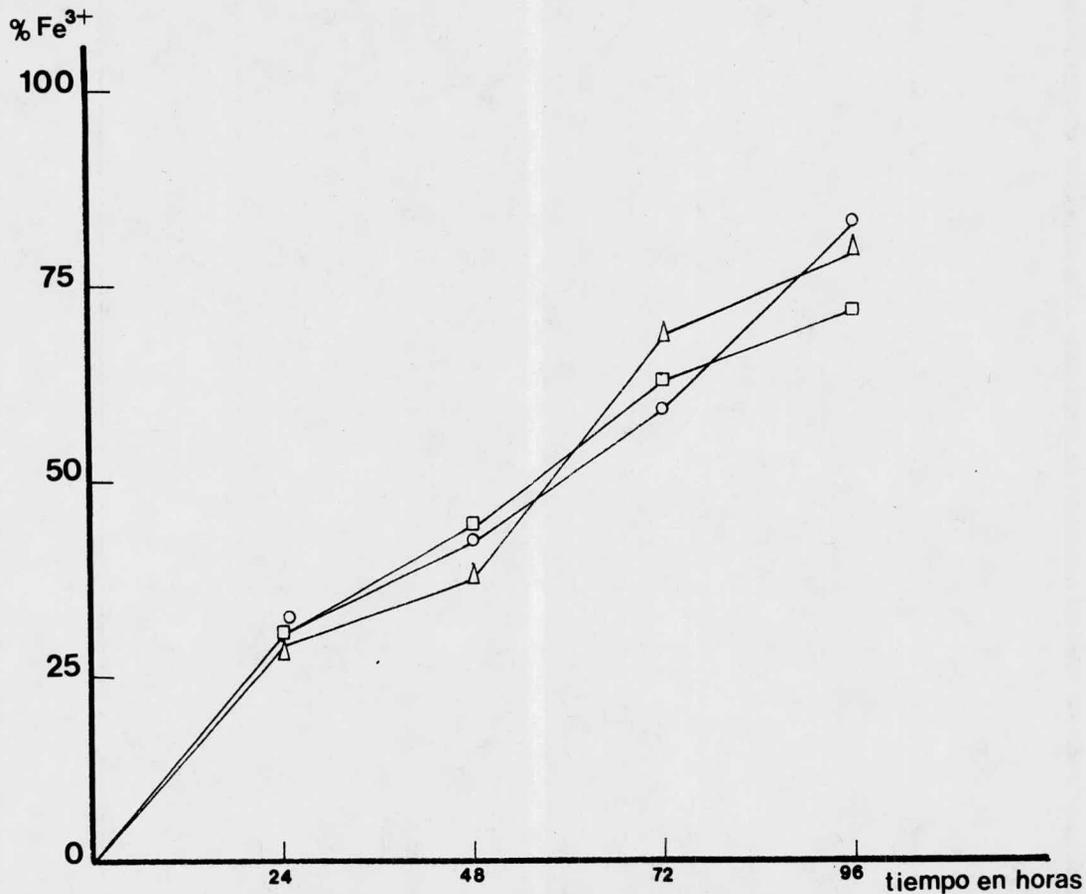


fig. 22

Efecto del medio 9k con una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 g/l, en el crecimiento estimado como fierro oxidado. ■ Fe^{3+} del testigo; ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

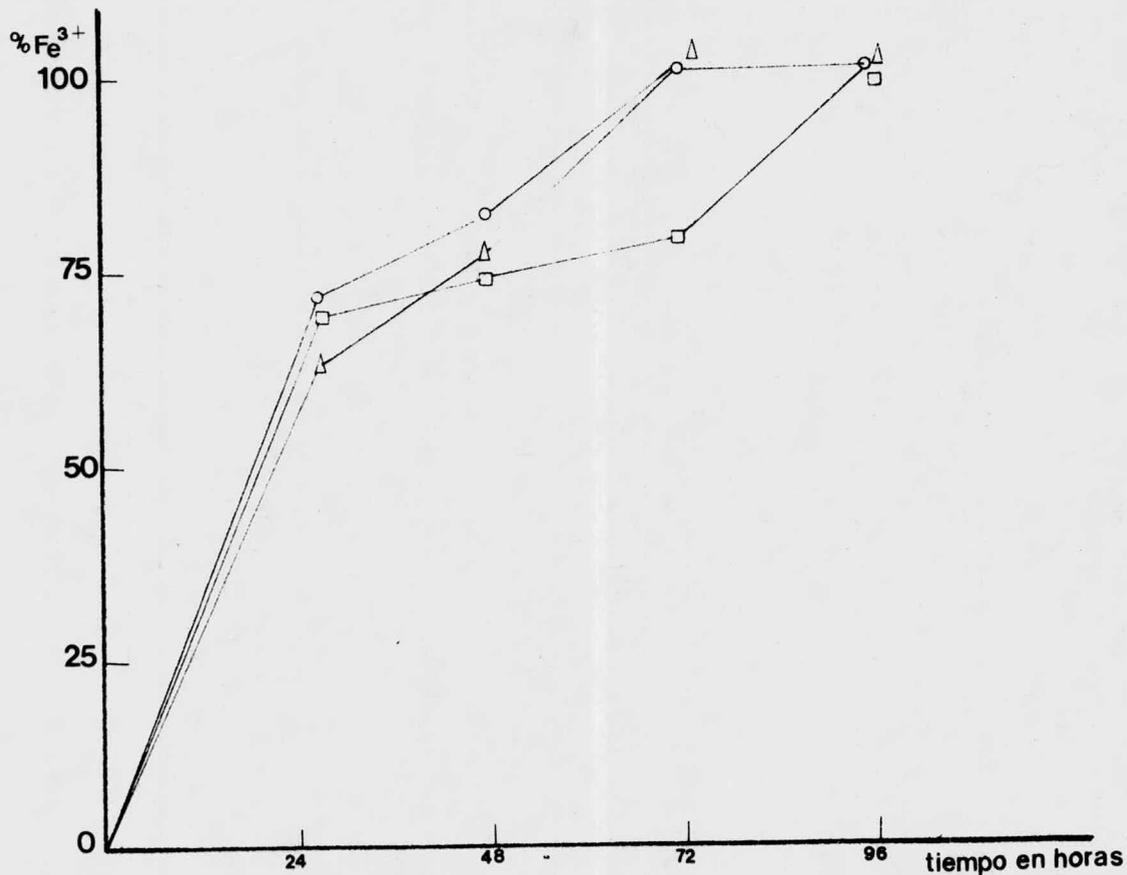


fig. 23

Efecto del medio 9k con una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 g/l en el crecimiento estimado por fierro oxidado.³⁺
 ■ Fe³⁺ del testigo; ○ Fe³⁺ de la cepa 3; ▲ Fe³⁺ de la cepa 4; □ Fe³⁺ de la cepa 5.

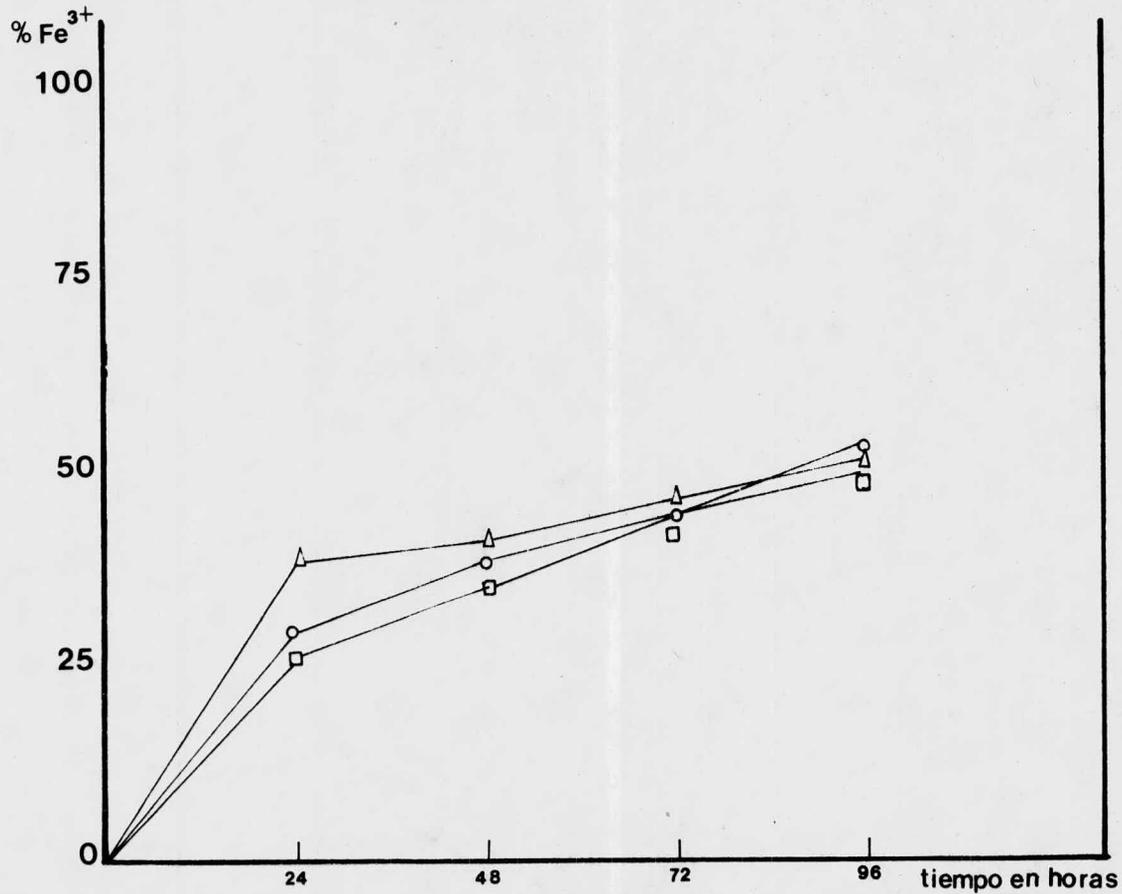


fig. 24 Efecto del medio 9k con una concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 6.6 g/l en el crecimiento estimado en base al % de fierro oxidado; \square Fe^{3+} del testigo; \circ Fe^{3+} de la cepa 3; \triangle Fe^{3+} de la cepa 4; \square Fe^{3+} de la cepa 5.

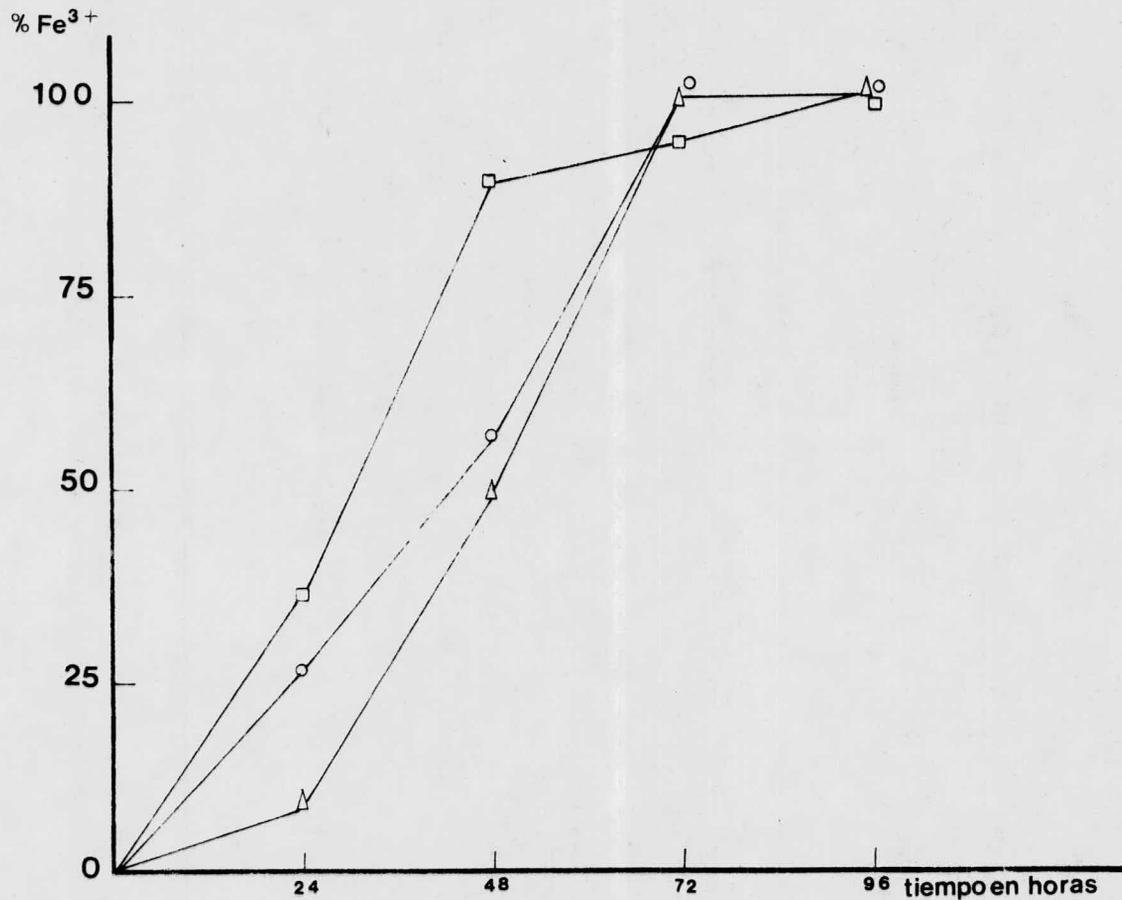


fig. 25 Efecto del medio 9k con una concentración de 0.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en el crecimiento estimado como fierro oxidado. ■ Fe^{3+} del testigo; ○ Fe^{3+} de la cepa 3; ▲ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

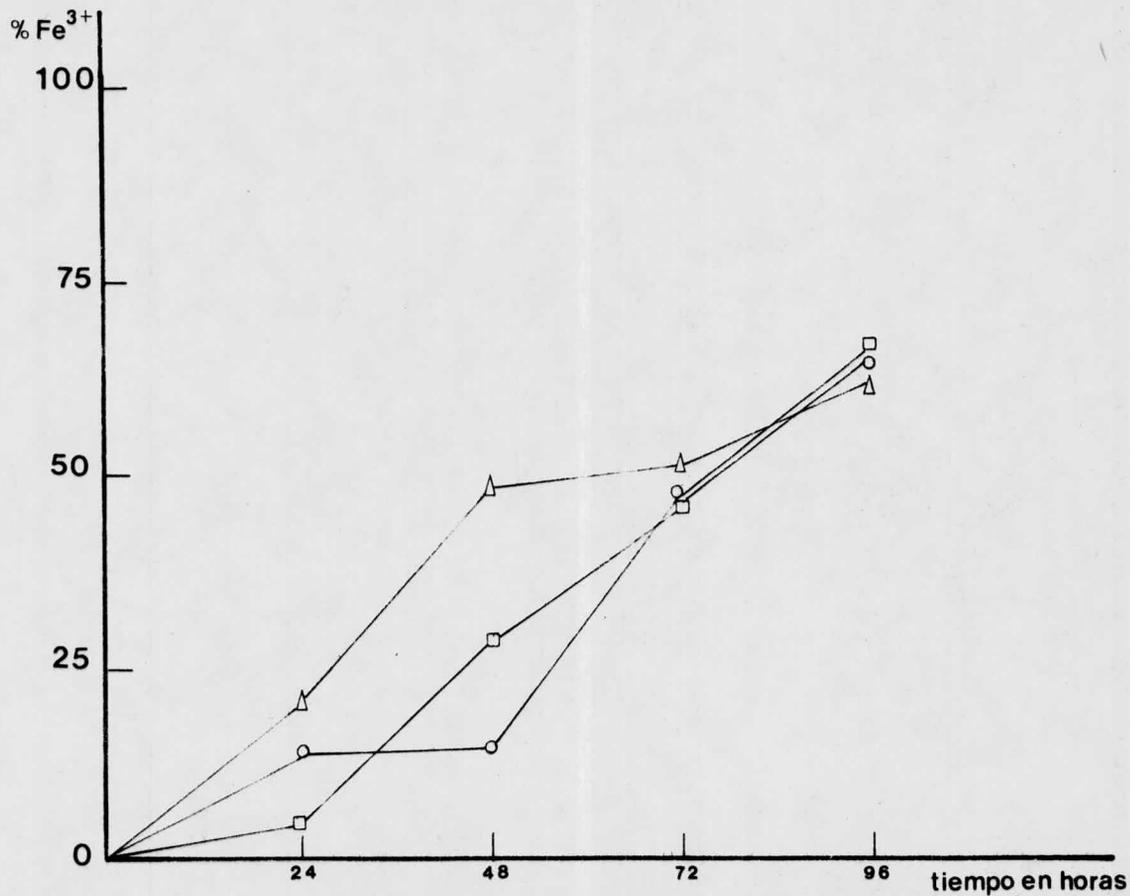


fig. 26

Efecto del medio 9k con 1.0 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en el crecimiento estimado por la oxidación de hierro ferroso. ● Fe^{3+} del testigo; ○ Fe^{3+} de la cepa 3; △ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

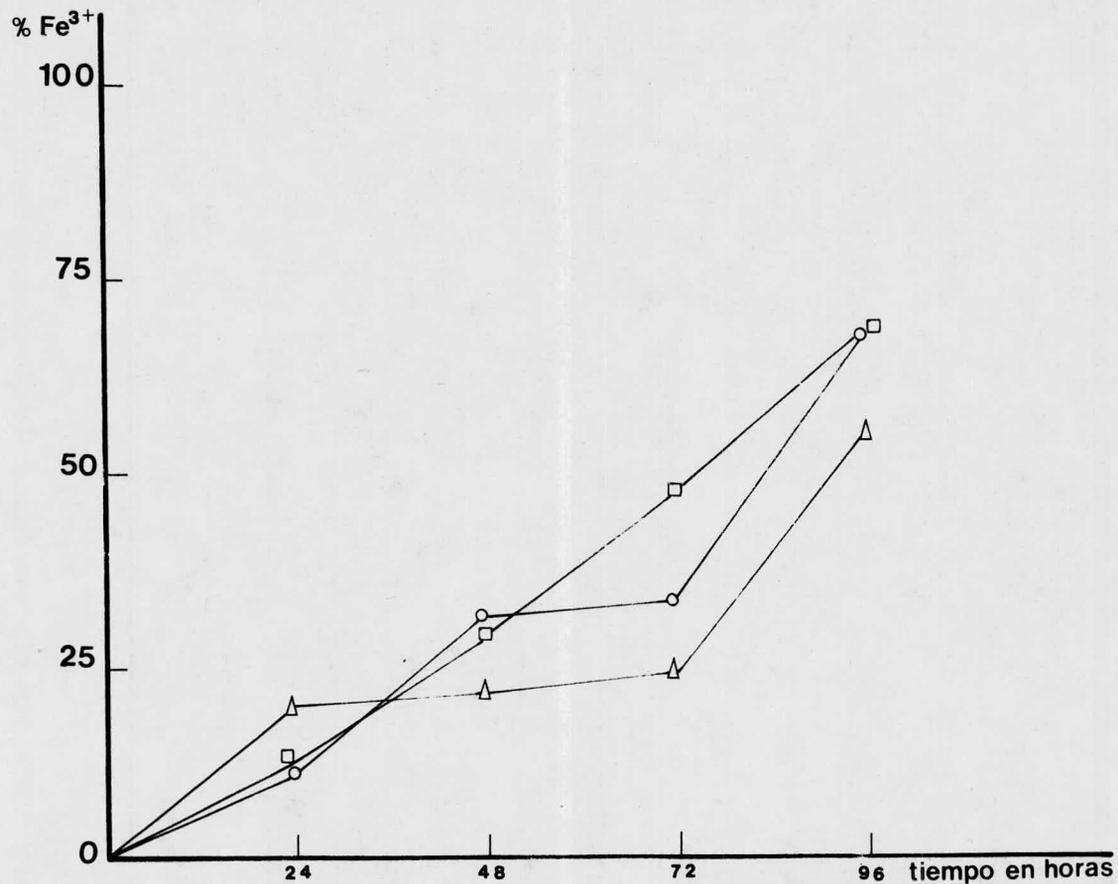


fig. 27 Efecto del medio 9k con 2.5 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en el crecimiento estimado por la oxidación del hierro ferroso. \blacksquare Fe^{3+} del testigo; \circ Fe^{3+} de la cepa 3; \triangle Fe^{3+} de la cepa 4; \square Fe^{3+} de la cepa 5.

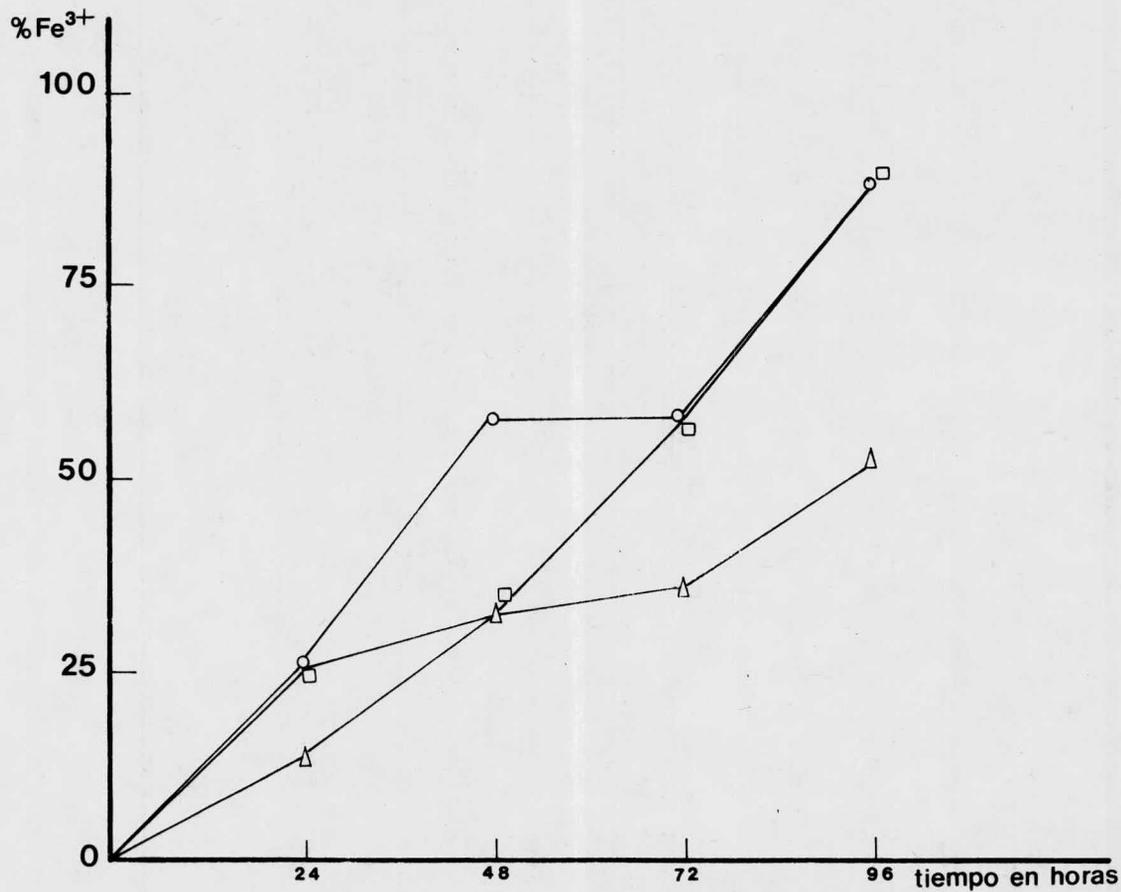


fig. 28 Efecto del medio 9k con 0.5 g/l K_2HPO_4 en el crecimiento estimado en base al % de hierro oxidado. ● Fe^{3+} del testigo; ▲ Fe^{3+} de la cepa 4; □ Fe^{3+} de la cepa 5.

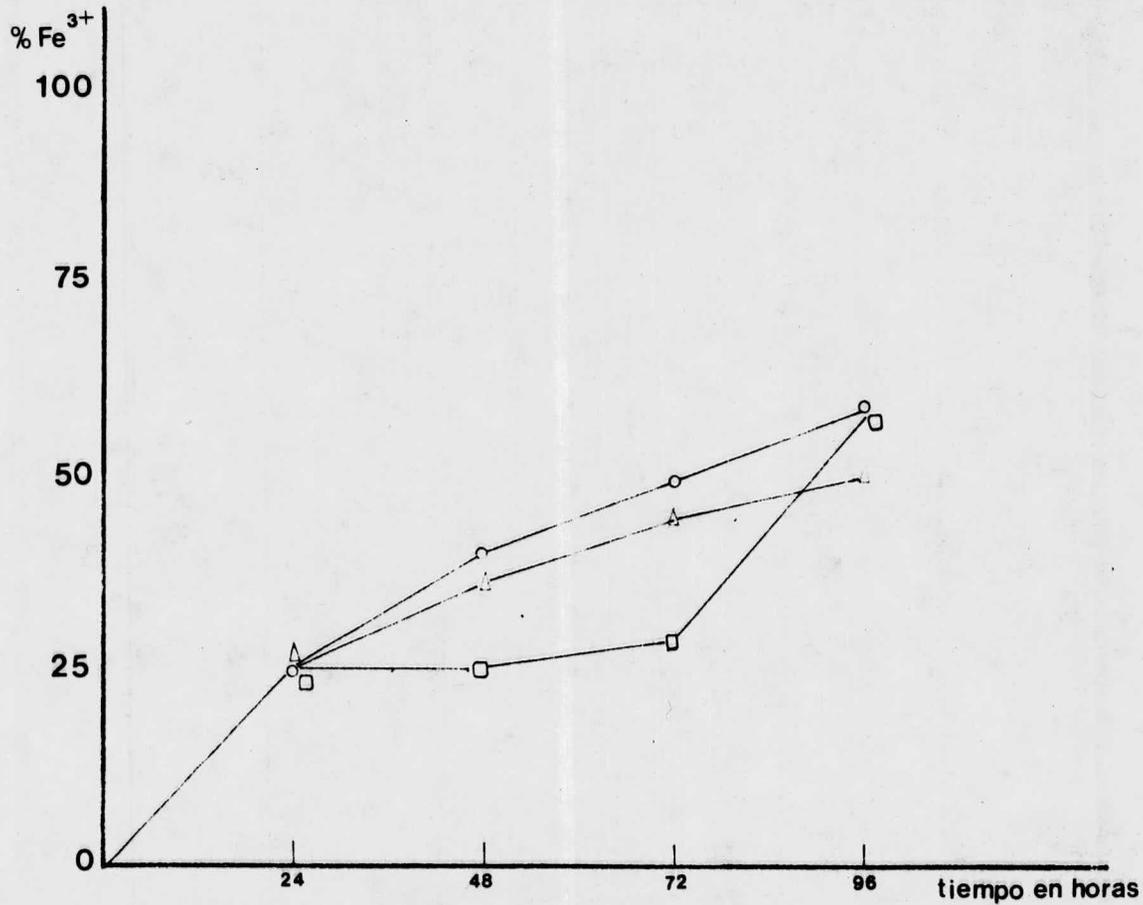


fig. 29 Efecto del medio 9k con una concentración de 1.0 g/l de K_2HPO_4 , en el crecimiento estimado en base al % de hierro oxidado. \bullet Fe^{3+} del testigo; \circ Fe^{3+} de la cepa 3; Δ Fe^{3+} de la cepa 4; \square Fe^{3+} de la cepa 5.

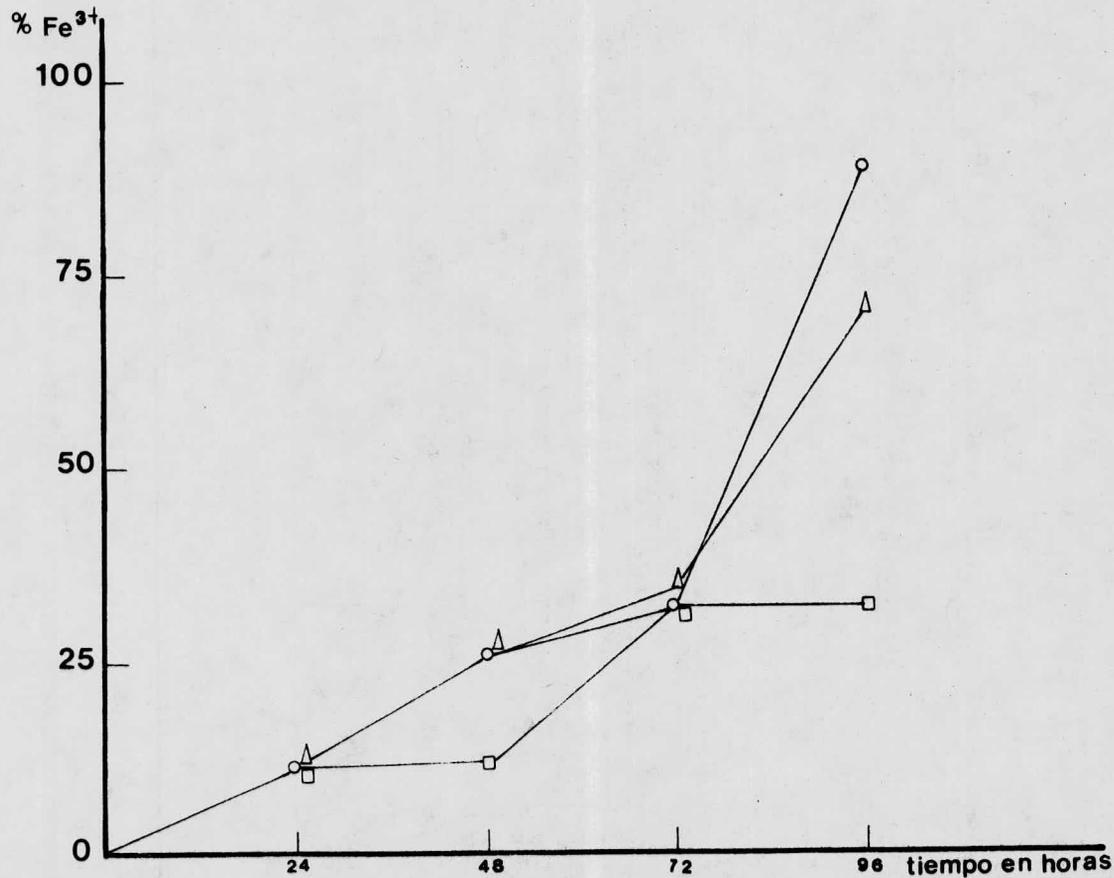
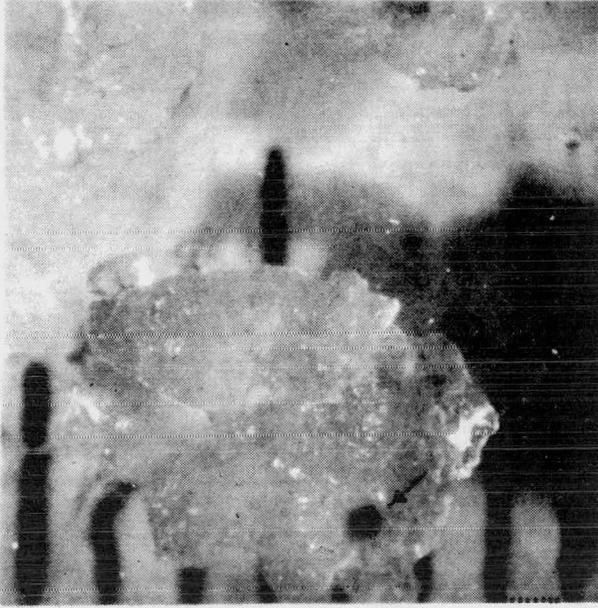


fig. 30 Efecto del medio 9k con 2.7 g/l K_2HPO_4 en el crecimiento estimado en base al % de hierro oxidado. 2 □ 4 Fe^{3+} del testigo; O Fe^{3+} de la cepa 3; Δ Fe^{3+} de la cepa 4; ◇ Fe^{3+} de la cepa 5.



Colonia de la cepa 5 desarrolla-
da en medio 9k- agar (1 mm =
escala)

V CONCLUSIONES

1. Se encontraron algunas características ya descritas en la literatura, entre las cuales están:
 - a) Por sus características microscópicas (tamaño celular, tinciones) las cepas 3 y 5 pueden ser descritas como F. ferrooxidans de acuerdo con la caracterización propuesta por Leathen et al. (1956), y Unz et al. (1960). La cepa 4 como I. ferrooxidans, de acuerdo a los estudios de Colmer et al. (1951), Beck (1960) y Unz et al. (1960), y como F. sulfooxidans de acuerdo con las investigaciones de Kinsel (1960). Sin embargo, en vista de una última clasificación propuesta en el Manual de Bergey (1974), la cual se basa, además en el comportamiento fisiológico de este tipo de cepas, las tres cepas estudiadas se pueden considerar como pertenecientes al género Thiobacillus, especie ferrooxidans.
 - b) De acuerdo a sus características fisiológicas se concluye que:
 - 1) La mejor fuente energética para las tres cepas fué el sulfato ferroso. Las cepas 3 y 4 oxidan completamente este sustrato a las 72 horas, la cepa 5 lo hizo a las 96 horas; las dos primeras cepas se asemejan a I. ferrooxidans y F. ferrooxidans - de acuerdo a Unz et al. (1960), y F. sulfooxidans según Kinsel (1960). La cepa 5 se comportó como I. ferrooxidans, Gutiérrez et al. (1968). En segundo lugar como fuente energética estuvo el azufre. El mejor desarrollo fué para la cepa 4, siendo similar a F. ferrooxidans, Unz et al. (1960). El tiosulfato ocupó el tercer lugar como sustrato energético; El mejor desarrollo lo obtuvo la cepa 5, estando de acuerdo al comportamiento de F. ferrooxidans, Unz et al. (1960) y al de

de F. sulfooxidans, Kinsel (1960).

En los medios 9k-Fe²⁺ y 9k-tiosulfato de sodio, no siempre se observó una relación directa entre la oxidación del sustrato y la acidez del medio. En tanto que en el medio 9k-azufre siempre se obtuvo una relación directa entre estos parámetros.

2) La mejor fuente de nitrógeno para las tres cepas resultó ser el amonio, y de segundo a cuarto lugar los nitratos, urea y peptona. Para las tres cepas este orden fué: amonio, nitratos, urea y -- peptona, y para la cepas 4 y 5: amonio, nitratos, urea y peptona. La cepa 3 se comportó como I. ferrooxidans, Gutiérrez et al. -- (1968).

3) En medios exentos en algún nutrimento, la falta de fuente de nitrógeno y sulfato de magnesio no afectó sensiblemente el crecimiento de estas tres cepas bacterianas. Los medios sin fosfato dipotasico y cloruro de potasio indicaron una disminución en el crecimiento de las 3 cepas; esto es análogo al comportamiento de F. sulfooxidans, según Silverman et al. (1959).

4) Las mejores concentraciones de sulfato ferroso para las tres cepas en orden de mayor a menor es: 44.22, 4.422 y 2 g/l, coinci--diendo con lo descrito para I. ferrooxidans, Unz et al. (1960), y Gutiérrez et al. (1968).

La mejor concentración de sulfato de magnesio y cloruro de potasio fué 0.5 g/l. Las cepas 3 y 5 crecieron mejor a concentra---ciones de 2.7 g/l de fosfato dipotásico, estos resultados indican un comportamiento similar al de F. ferrooxidans, Silverman et al. (1959) y Bergey Manual (1974).

5) Las tres cepas fueron capaces de crecer en medio de 9k original con glucosa, Similar comportamiento presentó I. ferrooxidans,

Tabita et al. (1971 a, b, c).

2. Se apreciaron algunas características morfológicas y culturales no descritas antes en la literatura.
 - 1) La cepa 4 presentó una morfología diferente a la descrita por Kinsel (1960), Unz et al. (1960) y Bergey Manual (1974), en los medios sólidos 9k-azufre y 9k-tiosulfato. La cepa 3 logró crecer en medio sólido-peptona.
 - 2) Se apreció una respuesta positiva de las cepas 3 y 5 en la utilización del carbono orgánico, cuando este constituyó la única -- fuente de carbono.
 - 3) Se encontró una adaptación de la cepa 5 a un medio de cultivo -- microaerofílico (atmósfera pobre en O_2).

VI BIBLIOGRAFIA

- Avakyan A.A. y Karavaiko G. I. 1970. Submicroscopic Organization of Thiobacillus ferrooxidans. Microbiologiya. v. 39-5, p. 855-861.
- Bandurski W. S. 1956. The Mechanism of active sulfate formation. Science. v. 78. p. 6408-6418.
- Beck J. V. 1960. Ferrus ion oxidizing Bacterium. Isolation and some general physiological Characteristics. J. Bacteriol. v. 79. p. 502-509.
- Beck J. V. y Brown D. G. 1968. Direct Sulfide oxidation in solubilization of sulfide ores by Thiobacillus ferrooxidans. J. Bacteriol 88; 850-857.
- Brock D. 1975. Effect of water potencial on growth and iron oxidation by Thiobacillus ferrooxidans, Applied Microbiology. v. 29-4.p. 495-501.
- Bergey's Manual. 1974. 8 ed. Buchanan R. E., Chairman, Gibbons N.E., Cowann S.I., Holt J.G., Liston L., Murray R. G., Niven G. F., Ravin A. W, Stainer R. G. ed. Balimore, Williams y Willkns, 1246 p
- Bryner L. C. y Beck W., 1954. Microorganism in leaching sulfide mineral. Applied Microbiology. v. 6. p. 281-287.
- Bryner L. C., Beck W., Davis D.B. y Wilson D.G. 1958. Microorganisms in Leaching Sulfide Minerals: Ind. and Eng. Chem., v. 46, no. 12, p. 2587.
- Burdon Kenneth y William R.L. 1971. Microbiologia, Ed. Publicaciones Cul turales México 830 p.
- Colmer, A.R. y Hinkle M.E.H. 1947. The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage. Science. v. 106., p. 253.
- Colmer, A.R., Temple K.L. y Hinkle M.E. 1949. An iron oxidizing bacterium from acid drainage of some bituminous coal mineral. J. Bacteriol. v. 59. p. 317-328.
- Duncan D.W. y Trusell, P.C. (1964). Advance in the microbiological Leaching of Sulfide Ores. Can. Met. Quart. v. 3, 43-55.
- Duncan D.W., Trusell, P.C., y Walden, C.C. (1964). Leaching of Chalcopyrite with Thiobacillus ferrooxidans. Effect of sufactants and shaking. Appl. Microbiol. v. 12. p. 122-126.
- Gale N. I. y Beck J.V. 1967. Evidence for Calvin cicle an hexose monophoshate, pathway in Thiobacillus ferrooxidans, J. of Bacteriol. v. 94. p. 1052-1059.

- Golbrait I.A. 1970. Thionic Bacteria in the oxidation of sulfides of Some Beds in East Kazakhstan. Translated from Microbiologiya. v. 39-1. p. 139-145.
- Gutiérrez R. y Ruíz H.J. 1968. Estudio fisiológico de Thiobacillus ferrooxidans Rev. lat-amer. Microbiol. 10 p. 181-187.
- Hiroimichi Sakaguchi y Marvin Silver. Microbiological leaching of chalcopyrite concentrate by Thiobacillus ferrooxidans. Biotech. and Bioeng. v. XVIII, p. 1091-1101.
- Hutchinson M., Johnstones, K.I. y White D. 1965. The taxonomy of certain Thiobacilli. J. gen Microbiol. v. 41 p. 357.
- Jackson J.F., Moriarty J.W., y Micholas D.J.D. 1968. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of thiobacilli and some nitrificans bacterium J. gen Microbiol. v. 53, p. 53-60.
- Karavaiko G.I. y Avaikyan A.A. 1971. Submicroscopic Organization of Thiobacillus thiooxidans. Translated from Mikrobiologiya v. 40-2 p. 322-326.
- Kingsbury M.J., y Barghoom S.E. 1953. Silica Gel a microbiological medium. Potentialites and a new method of preparation. J. Bacteriol v. p. 5-8.
- Kinsel A.N. 1960. New Sulfur Oxidizing iron bacterium Ferrobacillus sulfooxidans sp. J. Bacteriol. v. 80 p. 623-632.
- Kolthoff. I.M. y Sandell E. B. 1953. Textbook of Quantitative Inorganic Analysis. 3 ed. Mc. Millan, New York. 870 p.
- Kuznetov S.I., Ivanov M.V., Lyalikova N.N. 1963. Introduction to Geological Microbiology. Mc. Graw Hill Book Col New York 252 p.
- Lacey D.T. y Lawson F. 1970. Kinetics of the liquid phase oxidation of Acid ferrous Sulfate by the Bacterium Thiobacillus ferrooxidans. Biotech. and Bioeng. v. XII, p. 29-50.
- Ladesman J., Duncan, D.E. y Walden C.C. 1966. Oxidation of Inorganic Sulfur by washed cell suspensions of Thiobacillus ferrooxidans. Can J. Microbiol. v. 12, p. 957-964.
- Lazaroff N. 1962. Sulfate requirement for iron oxidation by Thiobacillus ferrooxidans J. Bacteriol v. 85 p. 78-83.
- Leathen. N.N. 1951. A medium for the study of bacterial oxidation of ferrous iron. Science. v. 114. p. 280-281.
- Leathen. W.W. y Braley S.A. 1951. A Medium for the Study of the Bacterial oxidation of Ferrous Iron. Science, v. 114, p. 280.

- Loren C. Bryner L.C., y Anderson R. 1957. Microorganism in leachig Sulfide Minerals. Ind. and. Eng. Chem.
- MacGregor, R.A. (1966). Recovery of U_3O_8 by underground leaching. Can. Mining Met. Bull. 59, 583-587.
- Meynell G.G. y Meynell Elinor. 1965. Theory and practice in experimental Bacteriology. Cambridge University Press. New York, 288 p.
- Orozco D.F. 1970. Análisis químico cuantitativo. 6 Ed. Porrúa, México 448 p.
- Parker C.D. y Prisk J.P. 1953. The oxidation of Inorganic Compounds of Sulfur by varios sulfur bacterias. J. gen Microbiol. v. 81. 344-364.
- Peck, H.D. Jr. 1960. Adenosine5-phosphate sulfate as aun intermediate in the oxidation of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. Proc. Natl. Acad. Scie. v. 46. p. 1053-1057.
- Ranzell W.E. y Trusell P. C. 1963. Isolation and properities of an Iron oxidizing *Thiobacillus*. J. Bacteriol. v. 85. p. 595-603.
- Rose A.H. y Wilkinson J.F. 1969. Adv. in Microbiol physiol. Academic, Press. v. 3 252 p.
- Sakaguchi M., Silver M., Torna E.A. 1976. Microbiological leaching of Chalcopurite by *F. ferrooxidans*. Biotech. and Bioeng. V. XVIII, p. 1091-1101.
- Schnaitman C.A. , Korzynski N. S. y Lundgren D.C. 1969. Kinetic studies of iron oxidation by whole cells of *Ferrobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol 99, p. 552-557.
- Silverman M.P. y Lundgren D.G. 1959a. Studies on chemoautotrophic Iron Bacteria: *Ferrobacillus ferrooxidans*. An improved medium and harvesting Procedur for securing high cell yields. J. Bacteriol. v. 70 p. 642-647.
- Silverman M.P. y Lundgren D.G. 1959b. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *F. ferrooxidans*. J. Bacteriol. v. 77. p. 642-647.
- Silverman M.P. 1967. Mechanism of bacterial pyrite oxidaton. Science. v. 94. p. 1046-1051.
- Scott W.W. 1939. Standard method of chemical analysis. 5 ed. D. Van Nostrand Co. Inc. New York, 918 p.
- Shafia F. y Wilkinson F.R. 1969. Growth of *F. ferrooxidans* on organic matter J. Bacteriol v. 97-1, p. 256-260.
- Starkey L.R. 1934. Isolation of some bacterias with oxidize thiosulfate. J. Bacteriol v. 39. p. 197-219.

- Starkey L.R. 1945. Precipitation of ferric hydrate by iron bacteria. Science, v. 102, p. 532-533.
- Steiner M. y Lazaroff N. 1974. Direct Method for continuous determination of iron oxidation by autotrophic bacteria. Appl. Microb. v28, p. 872-880.
- Tabita, R. y Lundgren, D.G. 1971 b. Heterotrophic metabolism of the chemolithotroph Thiobacillus ferrooxidans J. Bacteriol., v. 108-1, p. 334-352.
- Torna A.E. y Walden, C.C. y Branion M.R. 1970. Microbiological leaching of zinc sulfide concentrate. Biotech. and Bioeng. 12, 501.
- Touvinen. O.H., Niemela S.I. y Gylleberg H.G. 1971. Effect of mineral nutrient and organic substances on development of Thiobacillus ferrooxidans. Biotech. and Bioeng. v. XIII., p. 517-527.
- Trudinger P.A. y Kelly D.P. 1968. Metabolism of thiosulfate and tetrathionate by heterotrophic bacteria from sil J. Bacteriol. v. 93-7, p. 550-559.
- Umbreit W. 1962. Symposium on autotrophy II. Comparative physiology of autotrophic bacteria. Bact. Rev. v. 26, p. 145-150.
- Unz R.F. y Lundgren D.G. 1960. A comparative nutritional study of three chemoautotrophic bacteria. Ferrobacillus ferrooxidans, Thiobacillus ferrooxidans y Thiobacillus thiooxidans. Soil Science, v. 92 p. 302-313.
- Vishniac W. y Santer M. 1957. The thiobacilli. Bacteriol. Rev. v. 21, p. 195-213.
- Vishniac W. y Trudinger P. A. 1962. Symposium Autotrophy, Carbon dioxide fixation in chemosynthetic sulfur and hydrogen bacterium. Bacteriol. Rev., v. 26, p. 168-174.
- Vogler, K. G. y Umbreit W. 1941. The necessity for direct contact in sulfur oxidation by Thiobacillus thiooxidans. Soil Scie. v. 51. p. 331-337.
- Waksman S.A. 1922 b. Microorganism concerned in the oxidation of sulfur in the soil medium for the isolation and cultivation of I. thiooxidans. J. Bacteriol. v. 7, p. 605-608.
- Zajic. J. 1969. Microbiol Biogeochemistry. Academic Press. New York and London. 345 p.

FE DE ERRATAS.

1. En la tercera página no numerada dice: Agradesco, debe decir: Agradec--
co.
2. En la séptima página no numerada dice: recimiento, debe decir: Creci--
miento.
3. Página 8, párrafo 3, quinto renglón dice : con lu lón, debe decir :concl-
sión.
4. Página 10, cuarto párrafo, décimo renglón dice: pares, debe decir : pa-
res.
5. Página 57, último párrafo, último renglón dice: cuadro 5, debe decir :
cuadro 3.
6. Página 63, segundo párrafo dice Amnio, debe decir: Amnio.

Impreso en los talleres de
EDITORIAL QUETZALCOATL, S.A.
Paseo de la Facultades No. 37.
Tels: 548-61-80 y 548-58-56
México 20, D.F.