

39



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO** ABRIL 2015

**FACULTAD CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA**

**INSTITUTO DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICA**



**INFORME FINAL DE PROYECTO DE INVESTIGACION**

**DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DEL  
CRECIMIENTO DE THIOBACILLUS THIOXIDANS EN  
SUSTRATO HIDROFOBO DE AZUFRE**

**Blgo. EDGAR ZÁRATE SARAPURA**

**(Periodo de ejecución: 01 de Marzo 2013 al 28 Febrero 2015)**

**(Resolución de Aprobación: RR N° 282-2013-R )**

**CALLAO - 2015**

## ÍNDICE

	Nº Página
I. ÍNDICE	01
II. RESUMEN Y ABSTRACT	03
III. INTRODUCCIÓN	04
3.1. Planteamiento del problema.	08
3.1. Alcances de la investigación	12
3.2 Importancia y Justificación de la investigación	13
IV. MARCO TEÓRICO	16
V. MATERIALES Y METODOS	22
3.1 Técnicas de recopilación de datos	22
3.2 Métodos	23
VI. RESULTADOS	28
VII. DISCUSIÓN	31
VIII. REFERENCIALES	41
IX. APENDICE	48

## INDICE DE TABLAS

		N° Página
Tabla N° 4.1	Parámetros de crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey	49
Tabla N° 4.2	Variación de residuales de la curva de crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey según el modelo de Gompertz	51
Tabla N° 4.3	Variación de pH en el medio de Starkey con adición de azufre hidrófobo	52
Tabla N° 4.4	Crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey con Sustrato hidrófobo de azufre	53

## INDICE DE FIGURAS

		N° Página
Figura N° 4.1	Parámetros de crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey	49
Figura N° 4.2	Crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey (Log UFC/mL)	50
Figura N° 4.3	Crecimiento de Thiobacillus thiooxidans (Log UFC/mL según modelo de Gompertz en medio de cultivo de Starkey	50
Figura N° 4.4	Variación residual del ajuste de la curva de crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey. según el modelo de Gompertz ( $y=a+c*\exp(-\exp(-b*(x-d)))$ )	51
Figura N° 4.5	Variación del pH por el crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey con azufre hidrofobo.	52
Figura N° 4.6	Tendencia de la variación de pH y la concentración de azufre hidrofobo durante el crecimiento de Thiobacillus thiooxidans.	53
Figura N° 4.7	Efecto del pH sobre los parámetros de crecimiento de Thiobacillus thiooxidans en el medio de Starkey.	54

2

## II. RESUMEN

*Thiobacillus thiooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica capaz de catalizar la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos de azufre. El objetivo del estudio fue determinar su cinética del crecimiento en el medio de cultivo de Starkey con sustrato hidrófobo de Azufre, utilizando el modelo primario de Gompertz. Se relacionó la variación de pH con concentraciones de 1, 2, 4 y 8 g% de azufre hidrófobo. Los parámetros cinéticos de crecimiento en el medio de Starkey fueron:  $\mu_{\max} = 0.0404$  ufc/mL/h,  $\lambda = 63.81$  h,  $T_g = 24.87$  h. El agregado del sustrato hidrofobo de azufre al medio de Starkey modifica los parámetros cinéticos del crecimiento, siendo la concentración de 2 g% quién permite un crecimiento óptimo con parámetros;  $\mu_{\max} = 0.102$  ufc/mL/h,  $\lambda = 63.81$  h,  $T_g = 24.87$  h, con una variación de pH = 0.31 alcanzada a las 101 horas. Conclusión: el modelo de Gompertz describe la curva de crecimiento de T. Thioxidans y sus parámetros de crecimiento se afectan en mayor proporción cuando se utilizan concentraciones mayores del 4% por variación del pH.

**Palabras Clave:** Biolixiviación, Bacterias sulfato reductoras, T. thioxidans.

## ABSTRACT

*Thiobacillus thiooxidans* chemolithotrophic bacteria is capable of catalyzing the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds. The aim of the study was to determine the kinetics of growth in culture medium with hydrophobic substrate Starkey Sulfur, using the primary Gompertz model. pH varying concentrations of 1, 2, 4 and 8 g% hydrophobic sulfur related. The kinetic parameters of growth medium were Starkey:  $\mu_{\max} = 0.0404$  cfu / mL / h,  $\lambda = 63.81$  h = 24.87 h  $T_g$ . The addition of sulfur to the hydrophobic substrate through modified Starkey growth kinetic parameters, the concentration of 2 g% who allows optimal growth parameters;  $\mu_{\max} = 0.102$  cfu / mL / h,  $\lambda = 63.81$  h,  $T_g = 24.87$  h, with a variation of pH = 0.31 alcanzada to 101 hours. Conclusion: The described Gompertz growth curve T. thioxidans and growth parameters are affected to a greater extent at higher concentrations of 4% by pH variation are used.

**Keywords:** bioleaching, sulfate reducing bacteria, T. thioxidans.

### III. INTRODUCCIÓN

El género *Thiobacillus* comprende a bacterias capaces de obtener energía de la catálisis oxidativa de compuestos reducidos de azufre utilizando oxígeno como último aceptor electrónico. De este género, algunas especies acidófilas (resisten muy bajos valores de pH), mesófilas (actúan a temperaturas intermedias) y autotróficas (utilizan CO<sub>2</sub> como fuente de carbono), tales como *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*, han mostrado sistemáticamente una acción importante en la solubilización de metales a partir de minerales sulfurados de baja ley. Esta acción se produce por ataque directo sobre la matriz sulfurada o, en el primer caso, por un mecanismo indirecto que implica la generación de un oxidante como hierro (III) el cuál luego actúa abióticamente sobre el sulfuro.

El *Thiobacillus thiooxidans* es notablemente eficaz en la oxidación de azufre elemental y, además, resiste a valores de pH más bajos (incluso inferiores a 1,0) logrando altas velocidades y elevados rendimientos en la producción de ácido que permite una disolución inicial rápida de hierro y el mantenimiento de un valor de pH suficientemente bajo durante toda la experiencia

Estos procesos son esencialmente aeróbicos, es decir, el oxígeno es el último aceptor electrónico de la oxidación. Estas bacterias viven normalmente distribuidas en el suelo o agua y crecen por la oxidación de compuestos sulfurados y asimilación de dióxido de carbono.

Cuando el azufre elemental es el sustrato utilizado por este microorganismo (Gourdon 2008; Konishi, 2005), la ecuación global que interpreta el proceso que tiene lugar es:  $S^0 + O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$ . Precisamente, la ecuación anterior indica probablemente la contribución más importante de esta bacteria a la solubilización de metales especialmente cuando estos se encuentran asociados a especies oxidadas fácilmente atacables por vía ácida (Batty, 2007). La producción de ácido sulfúrico puede realizarse en forma continua utilizando biorreactores que

contengan células inmovilizadas directamente sobre el sustrato, es decir, sobre azufre elemental (Pich,2005).

El papel que juegan los factores ambientales, biológicos y fisicoquímicos, sobre el crecimiento y desarrollo de las bacterias es fundamental en el rendimiento de la extracción de metales por biolixiviación. El control de estos factores es muy importante para asegurar las condiciones óptimas de pH, humedad, temperatura, nutrientes, fuentes de energía que deben existir junto con la ausencia de inhibidores, que permitan obtener el máximo rendimiento del metal.

La exposición de cultivos mesófilos a concentrados de sulfuros metálicos genera inhibición o disminución en su actividad, especialmente a altas densidades de sustratos azufrados o pulpa. Este fenómeno se debe a varios factores: 1) menor cantidad de oxígeno disuelto, 2) daño a la pared celular como resultado de la fricción entre las partículas minerales y los microorganismos, y 3) efecto nocivo de los iones metálicos como  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  (Akcil et al., 2007). Sin embargo, estas bacterias pueden ser adaptadas para tolerar estos factores inhibitorios (Cabrera et al., 2004; Xia et al., 2008). El método generalmente usado para adaptar los microorganismos al mineral, en estos proceso, consiste en una serie de cultivos sucesivos en los cuales se incrementa la densidad de pulpa y se disminuye la fuente de energía principal, obligando a los microorganismos a crecer a expensas de la disolución del mineral (Haghshenas et al., 2009).

Uno de los problemas actuales y más relevantes en los sistemas de biolixiviación de Minerales Sulfurados (SM) refractarios ( $CuS$ ,  $Cu_2S$ , etc.), es la formación de  $Sr^{2-}$  y  $S^0$ , entre otras fases, los cuales limitan la disolución de los metales con valor económico. Así mismo, no se conocen adecuadamente los mecanismos de cómo se forman y evolucionan las fases minerales secundarias de S sobre superficies de SM, ni tampoco la influencia que diferentes mezclas de  $Sr^{2-}$  y  $S^0$  pueden tener sobre el proceso de biooxidación de Microorganismos Sulfuroxidantes (SOMs), particularmente *T. thiooxidans*.

RL

El presente estudio tiene como finalidad describir el crecimiento de *T. thiooxidans* en el medio de Starkey y su posterior ajuste de su curva de crecimiento utilizando el modelo de Gompertz para la obtención de los parámetros cinéticos. En la utilización de bacterias en reactores biológicos con el fin de la descomposición de la materia inorgánica, la fase de crecimiento exponencial será la de interés, ya que en esta fase es en la que se produce la mayor tasa de transformaciones. Para mantener el cultivo en esta fase se tendrá que vigilar los parámetros más importantes que influyen a las bacterias: pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes, presencia o ausencia de oxígeno.

El desarrollo de la biomasa está estrechamente ligado al intervalo de temperaturas para el que un organismo desarrolla sus funciones metabólicas. Dentro de este intervalo existe una temperatura óptima a la que la actividad metabólica es máxima, y por lo tanto, el consumo de sustrato y el desarrollo de biomasa será proporcional a ella. El estudio consideró trabajar con temperatura constante, flujo de aire de tal forma que los experimentos aportaron datos del comportamiento de la bacteria en base a la modificación del pH por consumo del sustrato hidrófobo de azufre.

Por otro lado, el estudio utilizó los principios del modelamiento predictivo es un prometedor campo de la microbiología de los alimentos. Los modelos matemáticos se utilizan para describir el comportamiento de los microorganismos bajo diferentes condiciones físicas o químicas tales como la temperatura, el pH y la actividad de agua. Estos modelos permiten la predicción de la seguridad microbiana o la vida útil de los productos, la detección de las zonas críticas del proceso de producción y distribución, y la optimización de las cadenas de producción y distribución. El crecimiento de bacterias a menudo muestra un tiempo de retardo ( $\lambda$ ) seguido de una fase en la que la tasa de crecimiento específico comienza en un valor de cero y luego acelera hasta un valor máximo ( $u_{max}$ ) en un cierto período de tiempo. Además, las curvas de crecimiento contienen una fase final en la que disminuye la velocidad y finalmente llega a

cero, de modo que se alcanza una asíntota (A). Cuando la curva de crecimiento se define como el logaritmo del número de organismos en función del tiempo, estos cambios en la tasa de crecimiento resultan en una curva sigmoideal, con una fase lag justo después de  $t = 0$ , seguido de una fase exponencial y luego por una fase estacionaria.

Para describir una curva de este tipo y para reducir los datos medidos a un número limitado de parámetros interesantes, los investigadores necesitan modelos adecuados. Uno de los modelos de crecimiento es el modelo de Gompertz. Este modelo describe sólo el número de organismos y no incluyen el consumo de sustrato como lo haría un modelo basado en la ecuación de Monod.

El nivel de sustrato no es de interés para el modelo de Gompertz porque se asume que no existe suficiente sustrato para alcanzar un número intolerable de organismos. Además del período de latencia y el valor asíntótico, otro parámetro muy valioso de la curva de crecimiento es la tasa máxima de crecimiento específico ( $\mu_{\max}$ ). Dado que el logaritmo del número es utilizado,  $\mu_{\max}$  está dado por la pendiente de la línea cuando el organismo crece exponencialmente. Por lo general, este parámetro es estimado para decidir subjetivamente que parte de la curva es aproximadamente lineal y luego determinar la pendiente de esta sección de la curva, por regresión lineal. Un buen método es describir todo el conjunto de datos del crecimiento con un modelo de crecimiento y luego estimar  $\mu_{\max}$ ,  $\lambda$  y A. El modelo de Gompertz describe el número de organismos (N) o el logaritmo del número de organismos [ $\log(N)$ ] como una función del tiempo.

El objetivo de la investigación fue determinar la cinética del crecimiento de *thiobacillus thiooxidans* en sustrato hidrófobo de Azufre. Así mismo se determinan los parámetros de crecimiento y variación de pH cuando se utiliza el medio de Starkey sin y con adición de sustrato hidrófobo de azufre al 1, 2, 4 y 8 g%.

RD

### 3.1. Planteamiento del problema

Las observaciones practicadas a las tecnologías de extracción minera exigen persistir en el diseño y proceso perfecto de las pilas renovables de lixiviación con cero efluentes, y eliminando el cierre de mina final, revegetando las pilas de relaves inmediatamente al término de lavado de cada pila renovada, evitando chantajes y malas especulaciones de la comunidad en el tratamiento de residuos sólidos.

Cuando se trata de evaluar la problemática de los resultados de lixiviación química de los distintos minerales indican que los porcentajes finales de disolución no alcanzan el 100%. Por ejemplo para el caso del cobre tenemos que a 450 horas aproximadamente alcanzan porcentajes son 65% y 50% de disolución. Por otro lado al comparar los parámetros cinéticos de los minerales presentes en los concentrados (estimados por modelación de la lixiviación química), con los de muestras de minerales individuales, se observa que son distintos. Esto se debe a las diferentes áreas superficiales entre los minerales individuales y los minerales presentes en los concentrados, y además es muy probable que existan efectos galvánicos, lo cual explica el aumento en la velocidad de disolución de la bornita, covelita y calcopirita y el retardo en la disolución de la pirita presente en los concentrados.

Frente a la problemática de contaminación del ambiente por la actividad minera en el país, viene dando importancia a la lixiviación bacteriana en donde las bacterias producen reacciones químicas en los minerales para recuperar la energía y poder sobrevivir. Al hacer esta recuperación de energía, crean el desequilibrio entre los enlaces de los átomos liberando los metales preciosos. Esta propiedad de las bacterias ocurre con los sulfuros, que son los que se encuentran en el fondo de las minas. En la superficie se encuentran los óxidos que han producido gran cantidad de riqueza para el Perú en los pasados años. Sin embargo, la recuperación de los minerales del fondo y de baja ley, puede hacerse por intermedio de los métodos de lixiviación bacteriana. Sin embargo los objetivos

empresariales han ocasionado que no se presta atención a la investigación de este tipo de lixiviación, que puede dar excelentes resultados a mediano plazo. Las bacterias actúan en forma lenta pero segura y a bajo costo. Una interrupción de los programas de investigación deja a otros –una vez más- los probables beneficios de una nueva biotecnología. Actualmente, 10% del cobre producido en el mundo tiene que ver con este tipo de producción.

Por otro lado, existe la persistencia de los técnicos de planta en los métodos convencionales y violentos (trituration, lixiviación química, altas temperaturas) sin preocuparse por métodos nuevos, que pueden ser útiles para minerales de baja ley, en los cuales los métodos convencionales no son rentables. Asimismo, existe el complicado problema de la modernización de las minas y sus consecuencias políticas. La lixiviación bacteriana equivaldría a dejar trabajar las bacterias y recurrir a una menor capacidad instalada y de mano de obra.

La lixiviación bacteriana puede ser definida como un proceso natural que resulta de la acción de un grupo de bacterias (principalmente *Thiobacillus ferrooxidans*) quienes oxidan minerales sulfurados para liberar los metales valiosos presentes (2). Dentro de los minerales que pueden ser tratados por lixiviación bacteriana tenemos: chalcopirita, pirita, covelita, sulfuros de Zn, Pb, etc.

En la actualidad se permite establecer que el rol principal desempeñado por las bacterias durante la lixiviación de un concentrado es mantener un adecuado potencial y concentración de agente oxidante en la solución, de modo que pueda facilitar las reacciones de lixiviación de las distintas especies mineralógicas presentes.

Por mucho tiempo se creyó que la disolución o lixiviación de metales a partir de minerales era un proceso netamente químico mediado por agua y oxígeno atmosférico. El descubrimiento de bacterias acidófilas ferroxidantes, fue

primordial en la definición de la lixiviación de metales como un proceso catalizado biológicamente.

La tecnología microbiana presenta ventajas sobre los métodos no biológicos entre los que podemos encontrar que requiere poca inversión de capital (las bacterias pueden ser aisladas a partir de aguas ácidas de minas), tiene bajos costos de operación necesarios para las operaciones hidrometalúrgicas en comparación con los procesos convencionales, presenta una relativa ausencia de polución o contaminación ambiental durante el proceso y facilita el tratamiento del creciente acumulo de minerales de baja ley en las minas los cuales no pueden ser económicamente procesados por los métodos convencionales.

Esta ventajas que ofrecen la lixiviación bacteriana también tienen algunos factores que influyen negativamente en la lixiviación son la presencia de metales pesados, particularmente los iones Ag, Hg y Mn, que son venenosos para las bacterias; además la existencia de temperaturas muy altas muchas veces como consecuencia de las reacciones exotérmicas propias, son inconvenientes para algunos tipos de bacterias. Mejores métodos para la extracción de los metales lo forman, los de lixiviación por pilas usados en la actualidad en la extracción de los sulfuros de cobre. En este método se prefiere triturar el mineral para aumentar su superficie de ataque y algunas veces cuando hay la presencia excesiva de finos se aglomera el material antes de enviarlo a las pilas. El piso de las pilas recibe un tratamiento previo de impermeabilizado colocando, además membranas de material plástico; el piso de la pila esta dotado de una cierta inclinación que va a permitir al licor de lixiviación fluir por gravedad; sistemas aireación a menudo se instalan para aumentar el flujo de aire. Se acumula el mineral en forma de pilar de gran dimensión y se le riega ya sea por aspersión o por goteo con la solución bacteriana, igual que en el caso anterior la solución rica en el metal valioso es recogida en el fondo para luego recuperar el valor por los métodos conocidos ya mencionados. Aunque la lixiviación bacteriana es corrientemente aplicada para la recuperación del cobre y el uranio, sin embargo están ya siendo usada para la recuperación de otros materiales sulfurosos, como en el tratamiento de la

esfalerita y la galena que son sulfuros de zinc y de plomo respectivamente. En el Perú (Tamboraque) se esta haciendo uso de la lixiviación bacteriana para el tratamiento de la arsenopirita y pirita aurífera contenido en bastos depósitos de relaves, la lixiviación bacteriana descompone la arsenopirita logrando que el oro entrampado quede libre y por lo tanto en condiciones de ser disuelto por el cianuro, en la forma tradicional de recuperarlo.

Una de las mayores aplicaciones de la biolixiviación se ha encontrado en el campo de los grandes depósitos de material de muy baja ley y que han sido acumulados como desmonte en las operaciones de tajo abierto.

En este sentido la biolixiviación bacteriana acompañada de lixiviación química está siendo aplicada con éxito en Toquepala (Perú) donde los licores de lixiviación de los botaderos de Cuajone y Toquepala son tratados en la planta de extracción por solvente y electrodeposición para añadir 30000 toneladas anuales de cobre a la producción de cobre electrolítico de Southern Perú Copper Corporation.

El mayor impedimento a la lixiviación bacteriana ha sido la lentitud del proceso, debido esencialmente a que las bacterias como seres vivientes están sometidos a los embates del medio ambiente y son particularmente sensibles a variaciones de humedad y temperatura extremas. La biolixiviación será más sencilla para las especies nativas siempre presentes en los depósitos, pero estas no se reproducen en gran escala por esto es necesario preparar cepas artificiales en el laboratorio, con las características de las nativas y que son finalmente las bacterias que se regaran sobre el material. En las posibilidades actuales de manipulación genética es de esperarse el nacimiento de bacterias con mejores características.

Como se viene planteando la problemática, sobre todo dentro de un marco de explotación y tratamiento de los minerales, son escasos los estudios referidos a la fisiología de las bacterias lixiviantes, en donde la evaluación de los factores

ambientales que los rodean no han sido claramente definidos cuando interactúan con el crecimiento bacteriano. Los crecimientos están referidos a la cuantificación de los productos, sin conocimientos de los factores que pueden estar alterando el normal crecimiento bacteriano y en consecuencia los rendimientos en un determinado proceso no están claramente justificados.

Hay que añadir que el porcentaje cada vez es más grande de cobre extraído de las minas por efecto de la biotecnología. El mineral se rompe y se colocan en tanques en los que el agua se bombea enriquecida con bacterias, como la *Thiobacillus ferrooxidans* y la *Thiobacillus thiooxidans*. Estos microorganismos oxidan el sulfuro de cobre (insoluble en agua) transformándolo en sulfato (soluble), para la obtención de energía para sus funciones vitales. Este sistema permite un ahorro considerable de energía en comparación con la extracción tradicional (hasta 30%) y evitando la liberación de gases nocivos en la atmósfera.

La lixiviación bacteriana resulta en el reto más importante en el futuro de la Metalurgia, los métodos tradicionales de recuperación de metales deberán dar paso a métodos no contaminantes y la biolixiviación es uno de ellos y que debe responder a la exigencia de un mundo atribulado que clama por un ambiente que no contamine más.

### **3.2. Alcances de la investigación**

La investigación es de tipo aplicada. El modelo permitirá obtener una curva de crecimiento que servirá de base para que la industria minera pueda estimar en forma inmediata las concentraciones poblacionales de *T. thiooxidans* para iniciar un proceso de lixiviación con un tiempo corto, contrariamente a lo que se realiza en la actualidad en donde el proceso de lixiviación se regula por la dinámica de los sustratos. El conocimiento de los parámetros de crecimiento evitará producir residuos sólidos que impactan el entorno del área de explotación, así como lograr procesos de bioremediación en zonas impactadas por dicha actividad.

Establecer los parámetros de velocidad de crecimiento y tiempos generacionales de *T. thiooxidans* servirán para que el proceso de lixiviación pueda ser más rentable comparativamente a las de tipo físicas o químicas, porque el abastecimiento de células bacterianas será rápida y fácilmente recuperable.

La Industria de explotación de minerales tendrá un recurso para predecir el comportamiento del microorganismo durante el proceso, es decir controlará la fisiología del microorganismo, regulando los sustratos y de esta manera monitorear el proceso para hacerlo eficiente y eficaz, salvaguardando los ambientes donde se realiza la explotación minera.

El beneficio económico es elevado y de dimensiones incalculables, porque se tendrá respuestas fisiológicas que responden a características genéticas de microorganismos adaptados a sustratos inductores de actividad enzimática que luego serán motivo de obtención de patente internacional y convertirse en un producto de exportación.

### **3.3. Importancia y Justificación de la investigación**

Actualmente existe un interés mostrado en el uso de microorganismos y esto es debido a que se debe a que los métodos convencionales para la recuperación de metales, como la pirometalurgia son actualmente económicamente menos viables; por lo tanto, las empresas mineras se han visto obligadas a buscar nuevos procesos para beneficiar minerales de bajo tenor, así como colas de procesos anteriores.

La oxidación y lixiviación bacteriana se muestra como una alternativa debido a sus bajos costos de capital y operación, además de su versatilidad en cuanto adaptación a diferentes procesos y diversos tipos de menas, mostrando grandes ventajas desde el punto de vista ambiental, ya que éste proceso no requiere el uso de grandes cantidades de energía y no se producen emisiones gaseosas. Actualmente se conocen muy bien los microorganismos implicados en el proceso;

además se ha demostrado que el proceso es útil en la recuperación de minerales de baja ley.

Sin embargo, los procesos de biolixiviación son complejos, existe poco conocimiento de las transformaciones que sufren los minerales en el tiempo, así como las variaciones que presenta la solución que contiene el mineral. Por lo tanto, un estudio detallado del proceso permitiría la optimizar la extracción de metales base como Cu, Zn, Pb, entre otros.

Mediante el entendimiento de la mineralogía del proceso de biolixiviación se pretende dar soporte en las implicaciones de las transformaciones de éstos en la optimización de procesos ya mencionados y el mejoramiento en la extracción. Por último, es importante destacar el hecho de que en el país han sido realizados pocos estudios que involucran la investigación sobre minerales de menas nacionales y microorganismos no nativos, por lo que este trabajo se considera de gran relevancia para la optimización de los procesos en la industria minera y la implementación de los mismos en nuestro país.

Desde hace algunas décadas se implementa en la industria minera, a nivel internacional, el empleo de cierto tipo de microorganismos para facilitar la extracción o el beneficio de metales base, tales como el cobre, zinc, uranio, entre otros, a partir de sulfuros. Esta práctica es denominada biominería, término general acuñado para describir como algunos microorganismos solubilizan estos metales; base de la economía y desarrollo de los sectores mineros, mediante la combinación de procesos químicos y microbiológicos.

Los microorganismos pueden ser utilizados como agentes floculantes o como colectores en los procesos de flotación de minerales. La capacidad de muchos microorganismos de poder adherirse a superficies sólidas gracias a la interacción existente entre la carga de la pared celular y las condiciones hidrofóbicas, modificando la superficie del mineral permitiendo su flotación y floculación.

La biodegradación de compuestos tóxicos orgánicos representa otro rubro importante de aplicación de los procesos biológicos. Debemos recordar que una amplia variedad de sustancias, tóxicas y no tóxicas, pueden ser descargadas al medio ambiente como consecuencia de las operaciones mineras. Muchos de estos compuestos son productos químicos complejos empleados en flotación y en procesos hidrometalúrgicos. Asimismo, se reconoce la habilidad de ciertos microorganismos o de sus enzimas de degradar, bajo ciertas condiciones, cianuro empleado en la recuperación de oro y plata.

El estudio de fenómenos y procesos que ocurren en la Naturaleza conduce a la formulación de modelos que los describen y predicen su comportamiento. En términos matemáticos, el estudio de las funciones cuya variable dependiente exhibe una variación discreta constituye una especialidad, que tiene en las sumatorias y series un componente relevante.

La optimización de estos procesos requiere una representación fenomenológica de su comportamiento ante diferentes condiciones de operación, una alternativa para realizar predicciones sobre estos sistemas es la utilización de modelos matemáticos a nivel macroscópico, ya que pueden ser empleados con fines prácticos tales como: escalamiento de biorreactores, diseño de condiciones de operación, diseño de equipos, simulación, control y para diagnóstico de fallas.

Este estudio se justifica porque actualmente los modelos matemáticos en sistemas Bacterias Sulfato Reductores (BSR) no involucran todos los procesos de sulfato reducción en conjunto con la cinética de crecimiento, por lo que en este trabajo se propone establecer los parámetros cinéticos de crecimiento en condiciones de pH óptimo y temperatura ambiente a diferentes concentraciones de azufre hidrofóbico, a fin de establecer posteriormente un modelo matemático integrador de las condiciones de un proceso biológico que se establece por condiciones químicas.

γ  
/

#### IV. MARCO TEÓRICO

Gran parte de los procesos de extracción de metales, tales como el cobre, oro, uranio y otros se basan en la tecnología de lixiviación. Esta tecnología se torna cada vez más importante porque permite explotar de forma rentable minerales que antes eran considerados refractarios y/o marginales. El problema de la refractariedad fue solucionado en gran medida con el auxilio de la tecnología de lixiviación bacteriana desarrollada en las últimas décadas. En la lixiviación bacteriana son utilizadas cepas de bacterias quimioautotróficas mesofílicas y termofílicas principalmente *Thiobacillus Ferrooxidans*. Las bacterias emplean los minerales sulfurados como fuente de energía para su metabolismo a través de la oxidación de estos.

Colmer y Temple (1950, 1951), reportaron que *Thiobacillus ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica la cual crece a bajo pH y puede obtener energía por oxidación del hierro ferroso. Esta bacteria también puede adaptarse a crecer quimiolitotróficamente sobre un número de compuestos inorgánicos sulfurados, incluyendo tiosulfato, tetrionato tritronato, sulfuro elemental, y sulfito metálico. Bounds y Colmer 1972, examinaron la cinética de la oxidación del tiosulfato y tetrionato por *T. ferrooxidans*, *Ferrobacillus ferrooxidans*, and *F. sulfooxidans* como un medio de diferenciación entre estas bacterias, demostrando que existen rutas metabólicas claramente definidas para ellas.

Tuovinen (1972) estableció que *T. ferrooxidans* juega una mayor rol en la lixiviación bacteriana de sulfatos minerales, de modo que su fisiología y bioquímica básica debe ser estudiada a fin de explicar las múltiples reacciones químicas que se desarrollan durante su cultivo.

Kelly y col. (1977) Realizaron estudios de cultivos continuos de *Thiobacillus ferrooxidans* que fueron usados para proporcionar información adicional fundamental sobre la cinética de crecimiento y la producción de energía

FR

bioquímica sobre el hierro, Así mismo Kelly y col. (1978) mencionan que el comportamiento del crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre compuestos inorgánicos de azufre como tiosulfato y tetratiónato hasta ahora ha recibido poca atención, y sólo ha sido examinado en cultivos en batch.

Eccleston y col, (1978); establecieron que el crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* en cultivos en batch sobre tetratiónato de potasio 10 mM fue óptimo a pH 2.5 (índice de crecimiento específico,  $0.092 \text{ h}^{-1}$ ). se demostró que el  $K_m$  para la oxidación del tetratiónato (0.13 a 8.33 mM) fue dependiente del pH, sugiriendo la elevada afinidad de sustrato a pH alto. A la inversa, los índices de oxidación eran mayores en el pH bajo. Altas concentraciones de sustrato (7.7 a 77 mM) no afectaron los índices de oxidación máximo a pH 3.0, pero produjeron la inhibición de sustrato en otros valores de pH. El prolongado cultivo continuo sobre tetratiónato o tiosulfato no afectan la habilidad del organismo para crecer subsecuentemente en medio de hierro ferroso

Pronki, (1991), Estudiaron la habilidad de varios acidófilos para utilizar el ácido fórmico y en forma particular la posibilidad del crecimiento limitado en ácido fórmico de *T. ferrooxidans*. Encontraron que una variedad de microorganismos acidófilos demostraron tener capacidad para oxidar el ácido. Sin embargo *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 21834, no puede crecer sobre el ácido fórmico en cultivos normales tipo batch. La densidad de células alcanzada por el empleo del método de cultivo en quimiostato era más alto que la densidad de células obtenido por el crecimiento de *T. ferrooxidans* sobre hierro ferroso o compuestos de azufre reducido. Estas respuestas explican que concentraciones por debajo de 100mM son limitantes para el crecimiento en batch. Las células crecieron en quimiostato con formiato limitante reteniendo la capacidad para oxidar hierro ferroso a niveles elevados. La actividad de la ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa en los extractos celulares indican que *T. ferrooxidans* emplea el ciclo de Calvin para la asimilación de carbono durante el crecimiento sobre formiato y la actividad de la enzima es independiente de NADP.

Klein (1987), estudió el crecimiento de *Thiobacillus novellus* (ATCC 8093) y de una cepa de laboratorio que fueron experimentados en un medio de sales minerales (MSM) y un medio conteniendo soluciones trazas de metales (TMM). El tiempo generacional durante el crecimiento sobre MSM fue siempre la mitad del valor para el crecimiento sobre TMM (134 min vs 252 min). Los cultivos que fueron mantenidos por 5 semanas en medios con trazas metálicas exhibieron disminución del tiempo generacional, pero sin cambios en la producción total. Un incremento en la concentración de la glucosa resultó un incremento en la producción pero no tuvo efecto sobre el tiempo generacional. La adición de biotina a uno u otro medio causó la menor disminución de la utilización de glucosa. La omisión de los componentes de metales trazas, individualmente, por lo general causaba tiempos de generación más cortas y aumento de la producción del crecimiento.

Brock y col. (1995), midieron el efecto del potencial del agua sobre el crecimiento de dos cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* adicionando cantidades definidas de cloruro de sodio o glicerol al medio de cultivo. Las dos cepas difieren ligeramente y la cepa más tolerante tuvo una tolerancia mínima del potencial del agua para el crecimiento de 15 a 32 bars cuando se usó ClNa y 5 bars cuando se usó glicerol. En cantidades limitantes de agua en depósitos de carbón o el vertedero de lixiviación de cobre la oxidación del fierro ocurre a 23 bars. Así mismo la presencia de materia orgánica puede limitar el crecimiento de la bacteria. Sus resultados indican que se deben controlar el potencial del agua para maximizar el proceso de lixiviación del cobre, porque un adecuado drenaje es necesario para asegurar una suficiente aireación y en muchos casos la disponibilidad del agua en los vertederos de lixiviación puede restringir el desarrollo de la bacteria necesaria para el proceso.

Espejo y Ruiz (1987), investigó el crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* en una suspensión de mena que contiene cobre, incubada en frascos sometidas a agitación fue estudiado para determinar el número de unidades formadoras de

colonias tanto en la solución como sobre las partículas del mineral. Las cantidades de hierro y cobre liberado de la mena en condiciones experimentales también fueron determinadas. Concluyeron que cuando la cantidad de bacteria ligada a las partículas de mineral fue determinada monitoreando la formación de hierro férrico en las placas, el porcentaje de la actividad total asociada con la bacteria depositada en la mena se encontró entre 1 y el 10 %.

Shrihari y col. (2001), consideraron que el crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* y el proceso del ataque sobre las partículas de sulfuro es conocidos; sin embargo, se demuestra que las células presentes en la fase líquida no atacan a las partículas de sulfuro pero crecen. Demostraron que este aumento es parcialmente debido a la liberación de iones, correspondiente a los estados parcialmente oxidados de azufre, en la solución por las células adheridas. El principal ion soluble fue el tiosulfato, pero también han sido descubiertos trazas de sulfito. Proponen el siguiente mecanismo para el crecimiento de *T. ferrooxidans* sobre el azufre. Al principio, la bacteria se adhiere a las partículas de azufre y comienza a oxidarlo. El número de bacterias adheridas aumenta con el tiempo, causando un aumento de la tasa de generación de los compuestos de azufre parcialmente oxidados, siendo los más importantes el tiosulfato y sulfito. Estos compuestos de azufre entonces son consumidos por la bacteria en la fase líquida, causando su crecimiento. Así, puede haber un aumento del número de bacterias en el líquido debido a la liberación de células, recién cultivadas, provenientes de los sustratos sólidos así como del crecimiento en el líquido las cuales usaron el sustrato intermedio y el sustrato alterno. Dependiendo de su tasa de generación y la tasa de consumo de las concentraciones intermedios de estos compuestos pueden o aumentar, permanecer constantes, o disminuir en el líquido.

Hossain, (2004). Realizaron un experimento de lixiviación biohidrometalúrgica de la mena de sulfuro de zinc (ZnS) en un sistema de horneado aeróbico con *Thiobacillus ferrooxidans* con la finalidad de optimizar los parámetros del proceso. La máxima biolixiviación de sulfuro de zinc fue de 74.85 % (w/w) y el

1

71.50 % (w/w) para 25 kg/m<sup>3</sup> y 30 kg/m<sup>3</sup> de carga (densidad de pulpa) inicial, con un tamaño de red mineral de 200 a +240 en 192 horas con el pH 2.5 y la temperatura 35°C, respectivamente. La concentración óptima de glucosa y nitrógeno (como sulfato de amonio) para la lixiviación máxima bacterial fue de 3.0 % (w/w) y 0.30 % (w/w), respectivamente. El grado óptimo de velocidad de agitación fue de 60 revoluciones por minuto. La bacteria puede tolerar hasta 40 kg/m<sup>3</sup> zinc inicial. En este experimento se utilizaron inóculos con siete días de cultivo y en niveles del 20 % (v/v).

Collinet, (2003), realizó estudios en cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*, que fueron aislados de un inóculo bacterial cultivado en forma continua durante un periodo de un año en 100 L en un laboratorio piloto para el tratamiento de un concentrado arsenopirita/pirita. El pH óptimo para el crecimiento de ambas cepas fue hallado entre 1,7 y 2.5. A causa de la alta toxicidad metálica en pulpas biolixiviadas, la tolerancia de *T. ferrooxidans* e *thiooxidans*, en lo que concierne al hierro y el arsénico, ha sido estudiado. El crecimiento de ambas cepas es inhibido con 10g/L de ion férrico, 5 g/l de arsenito y 40 g/L de arsenato. 20,8 g/L de hierro ferroso es tóxico para *Th. ferrooxidans* pero 30 g/l es necesario para impedir el crecimiento de *Th. thiooxidans*.

Katrina y col. (2000), establecieron que para un mejor entendimiento del rol ecológico de los microorganismos sulfuro-oxidantes en la generación de ácidos en el drenaje minero, estudiaron el crecimiento y ataque de las bacterias quimioautotróficas sulfuros-oxidantes, *Thiobacillus caldus*, sobre el sulfito mineral de la pirita, marcasita y arsenopirita. Las curvas de crecimiento fueron estimadas basadas sobre el total de células detectadas en el sistema (en suspensión y atacando o adheridas a la superficie del mineral. En general, elevado número de células fueron detectados tanto en la suspensión como en la superficie). Se confirmó que las células sobre las superficies fueron metabólicamente activas. El total de células (ambos superficie y la fase en solución), el tiempo generacional sobre pirita y marcasita (ambos FeS<sub>2</sub>) fueron calculados en aproximadamente en 7

y 6 horas respectivamente. Se confirmó que el ataque a los tres sulfitos ocurre de una manera orientada. La orientación celular coincide con la disolución de los bordes de un hoyo y secundariamente con los minerales sulfurados que se desarrollan durante la disolución. La colonización preferencial de superficies en relación con la solución y la orientación celular sobre estas superficies de sulfuro sugiere que *T. caldus* pueda quimiotacticamente seleccionar el sitio óptimo para el crecimiento sobre el azufre (p. ej. la superficie mineral).

Zevallos y col (2004), desarrollaron un sistema de modelos matemáticos que permitan mejorar el control del proceso de lixiviación de minerales por medio de la simulación de estos a nivel industrial. Para este propósito, fueron utilizadas la ecuación de continuidad en el balance de materiales, el modelo cinético del núcleo no reducido para la disolución del sólido, la ecuación de Michaelis-Menten para la actividad enzimática de las bacterias y algunos valores de variables presentados en la bibliografía junto con modelos empíricos para relacionar variables de las cuales no se tenía datos experimentales u operacionales específicos. Parte del trabajo se desarrolló en una empresa en Perú utilizando la base de datos de las operaciones industriales de lixiviación. Esta base de datos contiene el histórico de los resultados del análisis secuencial del cobre aplicado al mineral durante todo el período de lixiviación (256 días como promedio). Al final del proceso de modelamiento de la Lixiviación Química y Bacteriana de Minerales de Cobre en Pila se hace una validación estadística para determinar la calidad de los resultados de los modelos en la aplicación en procesos industriales, concluyendo que la predicción se logra hasta un 794%, sin embargo la predicción de la presencia biológica o bacteriana no está correlacionada eficazmente debiéndose establecer otros criterios y modelos de predicción.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1. Técnicas de recopilación de datos

Universo: La población de células de *T. thiooxidans* contenidas en un cultivo fresco en fase logarítmica.

Muestra: De la misma dimensión que la población.

### 5.2 Métodos

#### a). Materiales y métodos

- Equipos

Estufa incubadora temperatura hasta 60 °C sensibilidad 1°C

Estufa esterilizadora temperatura máxima 250°C

Autoclave vertical 100 L capacidad

Destiladora de agua 5 L/min

Contador de colonias con interfase con visor de 20X

Baño de agua temperatura máxima 100°C sensibilidad de 0.1 °C,  
c/agitador hasta 200 mov./min

- Material de vidrio

Placa de Petri 15 mL

Pipeta 10 mL 1/10

Pipeta 5 mL 1/100

Tubos de vidrio c/tapa rosca 18 x 200 mm

Matríz erlenmeyer 1 L

Matríz erlenmeyer 500 mL c/t

Matríz erlenmeyer 250 mL c/t

Tubos para centrifuga c/t 20 mL

- **Reactivos**

Agar agar 1000 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

Amonio Molibdato

Sulfuro de Coibre

Sulfuro elemental

### 5.3. Métodos

Tipo de Investigación: El estudio es de tipo prospectivo, longitudinal y experimental.

#### Medio de cultivo

Se utilizara como medio para el crecimiento el medio de Starkey modificado cuya composición es la siguiente:

Ammonium sulphate	0.400
Monopotassium phosphate	4.000
Calcium chloride	0.250
Ferrous sulphate	0.010
Magnesium sulphate	0.500
Sodium thiosulphate	5.000
Agua destilada cspc	1 Litro

Los reactivos se disolvieron en un litro de agua estéril, para luego esterilizarlo por filtración utilizando membrana de celulosa 0.45 micrones.

Las condiciones del crecimiento serán a 30 °C, pH 1,5; flujo de aire 1L/min, tiempo 20 días con agitación constante.

#### 5.3.1. Acondicionamiento del sustrato hidrofobo

El sustrato experimental estará conformado por el sulfuro de cobre (CuS) en una cantidad total de 3 Kg cuyas partículas deberán caracterizarse por tener un diámetro aproximado de 30 micrones.

Las partículas fueron lavadas con ácido clorhídrico 1M por 30 minutos, seguido por un lavado por con Hidróxido de sodio 1M por un minuto, dos veces. Enseguida se procederán a efectuar un lavado con agua destilada por dos veces

consecutivas. Luego se aplicará dos lavados con acetona por espacio de 3 minutos. Inmediatamente se lavará con agua destilada, dos veces. De inmediato se procederá a secar a temperatura ambiente en recipientes estériles. Una vez secos se almacenará hasta su posterior uso.

### **5.3.2. Activación de la cepa de *Thiobacillus thiooxidans* y obtención del inóculo**

La cepa se encuentra en un cultivo en medio de Starkey, conservado a temperatura ambiente, del cual se obtendrá una muestra de 5 mL para ser inoculado en un matraz Erlenmeyer estéril de 1 L en el cual se encuentra 600 mL del medio de Starkey estéril. El matraz se cubre con un tapón de algodón estéril y se colocará dentro de un baño de agua a 30 °C, con agitador incorporado que otorgue 120 movimientos/min.

El cultivo se dejará incubando por espacio de 5 días, al término del cual se procederá a repartir, en condiciones de esterilidad, el cultivo en tubos de centrifuga de 20 mL estériles con tapa. Se procederá a centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos. Luego se eliminará el sobrenadante y al sedimento se aplicará medio de cultivo de Starkey estéril para efectuar lavados del sedimento. Nuevamente se centrifugará en las condiciones anteriormente señaladas y se obtendrá concentrados celulares que se unificarán en un solo envase estéril y constituirse de esta manera en el inóculo experimental.

### **5.3.3. Efecto del sulfuro hidrofobo sobre los parámetros de crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans***

Se dispondrá de un biorreactor de vidrio de 2 L de capacidad con 3 bocas de salida, estéril, acondicionado en una salida o boca lateral con un sensor de pH, en la salida central con una tapa de silicona con orificios para el ingreso del inóculo y retiro de muestras, otra salida lateral adaptada para el ingreso de una manguera siliconada de 0.8 mts de longitud por la cual ingresará el flujo de aire a razón de 1 L/min que será esterilizado por un filtro de 20 micrones instalado en el trayecto de la manguera, antes de su ingreso al birreactor.

12

Se establecerán 5 grupos experimentales, cada uno de ellos se caracteriza por contener en el biorreactor 1 L del medio de Starkey (MS)

**Grupo control (GC):** comprende un biorreactor estéril de 2L de capacidad al cual se le instala en condiciones de máxima esterilidad un sensor de pH y la manguera para la aireación del cultivo, así mismo se condiciona una jeringa de plástico de 20 mL en la boca central con la finalidad de incorporar el inóculo o extraer las muestras para análisis.

Al biorreactor se adicionó 1 L del medio MS estéril, se ajustó el pH a 1,5 con KOH 0.1M. Luego se deposita el envase en el baño de agua a 30°C hasta que el medio de cultivo alcance dicha temperatura. Enseguida se adicionó 5 mL del inóculo bacteriano. Se enciende el agitador del baño de agua e inmediatamente se procedió a tomar una muestra de 10 mL, el cual sirve para determinar la UFC/mL en agar MS.

La cuantificación de colonias/mL se realizará en el mismo medio de cultivo al cual se le adicionará agar agar 12.5 gramos por litro.

El medio contiene tres sulfatos inorgánicos y un tiosulfato. El fosfato sirve como un buffer que junto con el ClNa mantiene el balance osmótico del medio.

**Grupo experimental 1 (GE 1%)** Se procede de la misma forma que el grupo control, con la diferencia que momentos antes de incorporar el inóculo de adiciona al biorreactor 10 gramos de sustrato hidrófobo.

**Grupo experimental 2 (GE 2%)** Se procede de la misma forma que el grupo control, con la diferencia que momentos antes de incorporar el inóculo de adiciona al biorreactor 20 gramos de sustrato hidrófobo.

**Grupo experimental 3 (GE 4%)** Se procede de la misma forma que el grupo control, con la diferencia que momentos antes de incorporar el inóculo de adiciona al biorreactor 40 gramos de sustrato hidrófobo.

**Grupo experimental 4 (GE 8%)** Se procede de la misma forma que el grupo control, con la diferencia que momentos antes de incorporar el inóculo de adiciona al biorreactor 80 gramos de sustrato hidrófobo.

#### 5.3.4. Análisis del modelo primario

Los datos del crecimiento para cada concentración de sustrato hidrófobo fueron incorporados como una variable dependiente en el modelo matemático de Gompertz de cuatro parámetros (Ec. 1), mientras que el tiempo de incubación (t) se incorporará como variable independiente.

La ecuación correspondiente al modelo descrito y sus variables fueron incorporados al programa Curva Expert 3.1 y se efectuará el proceso analítico hasta encontrar el punto de convergencia, en el cuál los parámetros de regresión (A, D, B y M) consiguen una magnitud apropiada, ajustando de la mejor forma posible la relación entre las variables.

El proceso e ajuste utilizará el modelo de Gompertz para la disminución del error en la suma de cuadrados en cada proceso iterativo al aplicar la ecuación de regresión no lineal.

$$\text{Log } N = A + D \cdot \exp[-\exp(-B \cdot (\text{Tiempo} - M))] \quad (1)$$

*Donde:*

Log N = es el logaritmo común de poblaciones bacterianas (UFC/mL).

T= Tiempo de incubación; es la variable independiente (días).

**A, D, B y M** son los parámetros de ajuste del modelo y representan el efecto a todos los eventos del ciclo de crecimiento que se da en forma iterativa en un determinado periodo de días y que se analizarán según modelo computacional, en donde

**A** es el logaritmo común de la población inicial en UFC/mL (inóculo),

**D** es el logaritmo común de la diferencia entre la población inicial y final que se alcanza en la fase estacionaria;

**B** representa la pendiente de la curva y describe la tasa de crecimiento;

**M** es el tiempo en el cual la tasa de crecimiento es de mayor magnitud.

La verificación de la bondad del modelo empleado en cada caso, se llevó a cabo mediante la construcción de gráficos, en los cuales se contrastaron las curvas ajustadas con los valores de las poblaciones observadas para cada concentración del sustrato hidrofobo.

Utilizando los parámetros de ajuste del modelo de Gompertz, se calcularon la fase de adaptación (DFL), la tasa máxima de crecimiento exponencial ( $\mu_m$ ) y el tiempo de generación (Tg), como descriptores microbiológicos a ser utilizados para efectos de predicción de la población en un tiempo dado y en cada concentración del sustrato hidrófobo incluida en el rango de estudio (1 a 8 %), a tal efecto, se utilizó las siguientes expresiones matemáticas:

$$\text{Fase de adaptación (DFL): } [h] = M - 1/B + ((\log N - A)/((B \times D)/\exp(1))) \quad (2)$$

$$\text{Tasa específica de crecimiento } (\mu_m): [\log (\text{UFC/mL})/h] = B * D/\exp(1) \quad (3)$$

$$\text{Tiempo de generación (tg): } [h] = \exp(1) * \log(2)/B * D \quad (4)$$

## VI. RESULTADOS

Se determinó los parámetros de crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* en el medio de Starkey, con flujo de aire estéril de 10 L/min; pH 1,5; y a temperatura de 20 °C. La tabla N° 4.1, página 47, muestra el  $\text{Log}_{10}$  de las unidades formadoras de crecimiento por ml ( $\text{Log}_{10}$  UFC/mL) y por cada iteración realizada cada 10 horas hasta alcanzar las 120 horas.

La tabla N°4.1, página 49; muestra el crecimiento que se inició con un inóculo (A) de 2.89 Log UFC/mL requiriendo de un tiempo de latencia ( $\lambda$ ) de 49.70 horas (fase de latencia o Fase Lag), presentando un incremento poblacional logarítmico que se desarrolla a una velocidad de 0.0595 Log UFC/ml/h, hasta obtener un incremento poblacional final (C) de 3.56 unidades logarítmicas y un Tiempo generacional (Tg) 16.80 horas. La tasa máxima de crecimiento se alcanza a las 77 horas; así mismo, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es igual a  $0.992 \pm 0.099$ , el cual confirma qué tan bien se ajusta la línea de regresión que se construyó con el conjunto de datos experimentales. (Ver Figuras N° 4.1, página 49, 4.2, página 50).

La curva de crecimiento obtenida experimentalmente, fue ajustada por el modelo de Gompertz:  $y=a+c*\exp(-\exp(-b*(x-d)))$  obteniendo los valores de los parámetros cinéticos de su crecimiento los cuales se encuentran en la tabla N°1, página 47, obteniéndose un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) = 0.998. Éste valor da una idea del ajuste total conseguido midiendo la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente respecto a su media que es explicada por el modelo de regresión. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por ese modelo. (Ver figura N° 4.3, página 50).

La tabla N° 4.2, página 50, muestra la variación residual que confirma el ajuste de la línea de regresión al conjunto de datos de la curva de crecimiento experimental. La variación en este caso es muy pequeña por lo se puede inferir

que los cálculos estimados son están muy acertados, por lo que los parámetros encontrados de crecimiento son los referentes para la interpretación de los experimentos con diferentes concentraciones de azufre hidrófobo Ver figura 4.4, página 51. La ecuación de Gompertz que describe el comportamiento de *T. thiooxidans* queda expresada de la siguiente manera:  $y=3.02+4.18*\exp(-\exp(-0.0404*(x-76.04)))$

Se determinó la variación del pH durante el crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* en el medio de cultivo de Starkey adicionando azufre hidrófobo a concentraciones de 1, 2, 4, 8 g%, con flujo de aire estéril de 10 L/min; pH 1,5; y temperatura ambiental.

La tabla N° 4.3, página 52, muestra la variación de pH cuando *Thiobacillus thiooxidans* crece en el medio de Starkey al cual se le adicionó, por separado, concentraciones de 1%, 2%, 4% y 8% de azufre hidrófobo, observándose un cambio proporcional del pH en relación a la concentración del Azufre hidrófobo. Así tenemos que la mayor variación corresponde a 4% y 8%, con variaciones de unidades pH de 0.36 y 0.44, con tiempos de duración de 74 y 69 horas, respectivamente. Mientras que las concentraciones 1% y 2% muestran una variación de 0.24 y 0.31 unidades de pH, con tiempos de duración de 120 y 101 horas. (Ver Figura N° 4 5, página 50). La comparación de las líneas de tendencia que relaciona las concentración y el pH, entre los cultivos con las diferentes concentraciones de azufre hidrófobo indican que existe, entre ellas, diferencias estadísticamente significativas ( $p= 1.23813E-07$ ). Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos prueban que todas las curvas tienen un alto grado de relación entre la variación del pH en función del tiempo para cada concentración de azufre hidrófobo utilizado, demostrándose así que el microorganismo tiene diferente capacidad de consumir el azufre hidrófobo a concentraciones menores del 4%.(Ver figura N° 4.6, página 53).

La tabla N° 4.4, página 53, contiene los parámetros de crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* cuando es cultivado en el medio de Starkey al cual se le

incorporó, por separado, concentraciones de 1, 2, 4 y 8% de sustrato Hidrofobo de Azufre teniendo como condiciones del cultivo flujo de aire estéril de 10 L/min, pH 1.5; y temperatura ambiental, dentro de un periodo de tiempo de 120 horas.

El ajuste de las curvas de crecimiento se realizó mediante el modelo de Gompertz que opera con cuatro variables que se obtienen durante el crecimiento. El modelo sigue la siguiente formulación:

$$Y = A + C.e^{(-e^{(-B \cdot (t-M))})}$$

El modelamiento de las curvas de crecimiento muestra que las concentraciones de 1 y 2% se desarrollan, respectivamente, a velocidades de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) 0.117 y 0.102 LogUFC/mL/h, lográndose incrementos de poblaciones (C) 8.04 y 5.61 Log UFC/mL; estos valores inciden sobre el tiempo para lograr la Tasa Máxima de Crecimiento (M) el cual se incrementa en tiempos de 39.82 y 42.64 horas afectando al Tiempo generacional (Tg) de 8.54 y 12.67 horas. Concentraciones de azufre hidrófobo de 4% y 8% afectan sustancialmente los parámetros de crecimiento  $\mu_{\max}$  y C, disminuyéndolos, e incrementando M y Tg. Los coeficientes de correlación de cada ajuste de la curva de crecimiento tienen valores por encima de 0.99. Los grupos experimentales muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p=2.6796E-08$ ) siendo la causa de la diferencia la concentración del azufre hidrófobo presente en el medio de cultivo. El análisis de Tukey permite inferir que la causa de la diferencia entre los tratamientos es el tratamiento que contiene 2% de azufre hidrófobo (DMS: 0.1435).

En la figura N° 4.7, página 54, se observan que cualquiera de los cuatro parámetros indicados: pH, tasa de crecimiento, Incremento de la población bacteriana libre en suspensión, puede utilizarse como descriptiva de la evolución del cultivo. Se demuestra la existencia de una relación del descenso del pH y la variación de los parámetros de crecimiento  $\mu_{\max}$ , C y M y que la variación del pH por debajo del óptimo 1.5 altera significativamente el normal funcionamiento el metabolismo de la bacteria en estudio. En este estudio variaciones de 0.24 hasta 0.44 de unidades de pH por debajo de 1.5 pH afectan a los parámetros de crecimiento haciendo difícil el aprovechamiento del azufre hidrófobo.

## VII. DISCUSIÓN

Diversos resultados hallados en experimentos previos demuestran que los microorganismos que participan en la Biolixiviación tienen características típicas de crecimiento y supervivencia como su capacidad de crecer a pH ácido (1-3 ideal 2.5), a temperaturas entre 2 a 37° C (mesófilos), algunas a temperaturas mayores entre 45 . 50 °C (termófilos moderados) llegando hasta temperaturas de 70° C (termófilos extremos).

En este experimento, solo se facilitó el crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* caracterizado por ser una bacteria mesófila y que requiere de condiciones aerobias. Además son quimiolitioautotróficas facultados a oxidar compuestos inorgánicos para generar todos los componentes de la célula, esta capacidad metabólica es la que se aprovecha para solubilizar cobre y otros minerales. Dichas características se constituyen en la base fundamental para el crecimiento y la conservación de los mismos.

En este experimento se logra establecer las condiciones propicias para el óptimo crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* utilizando el medio de Starkey con la finalidad de establecer los parámetros de crecimiento provenientes del ajuste de la curva se sus crecimientos con el modelo de Gompertz , el cual se caracteriza por ser un modelo primario que tiene una lógica matemática y biológica para describir el crecimiento de *Th. Thiooxidans* aportando parámetros de crecimiento válidos para realizar predicciones en condiciones diferentes no experimentadas.

La cepa *Th. thiooxidans* fue cultivada en el medio de Starkey, tanto en su activación como en su condición de inóculo. Todos los cultivos líquidos fueron inoculados con células provenientes de cultivo jóvenes en su fase logarítmica a una concentración aproximadamente de 3.00 LogUFC/mL, con el propósito de no propiciar un uso inmediato de los sustratos y frenar el crecimiento. Debido a que

el medio de cultivo es apropiado para sostener poblaciones en periodo de tiempo que se ajusta al propósito del estudio se inicia con un pH 1.5, valor considerado como el óptimo para ésta bacteria. (Das, T, 2005)

Se estudió la cinética de crecimiento de *Th. thiooxidans* en el medio de Starkey en cultivos discontinuos a temperatura ambiente 20°C y pH 1,5 midiendo el curso de la concentración de células libres en suspensión en el medio líquido, y la variación del pH por la formación de ácido sulfúrico. (Hsuan-Liang Liu, 2006)

El crecimiento se inicia con un inóculo de 2,89 Log UFC/mL proveniente de una fase exponencial (Fase Log) presentándose una fase de latencia (Fase lag) o adaptación de 49 horas, en esta etapa el microorganismo logra sintetizar todos los sistemas enzimáticos para activar su metabolismo. Un rol muy importante cumple los componentes del medio de cultivo que aporta sulfatos sulfatos y tiosulfato garantizando fuentes energéticas suficientes para lograr una adaptación corta. En este tiempo se genera un consumo de protones de hidrogeno, sin embargo no se produce cambios significativos de pH por efecto del buffer presente en el medio de cultivo, siendo menor el efecto a bajas concentraciones de sustrato.

El tiempo de latencia ( $\lambda$ ) hallado en esta investigación es similar a los hallados en la investigación realizado por Rajagopal (2007) quien estimó una fase de latencia de 63 horas cuando aisló y caracterizó bacterias sulfuro oxidante; Arias (20014) logró adaptaciones a sustratos conformados con especies de minerales piríticos en un tiempo de 48 horas.

La oxidación biológica de los sustratos del medio de cultivo ocurre directa o indirectamente. El mecanismo directo ocurre cuando las células bacterianas oxidan biológicamente el azufre o el hierro. En el mecanismo indirecto las células oxidan el hierro ferroso soluble a hierro férrico, que a su vez oxida químicamente al sustrato azufrado (Silverman *et al.* 2001). Yu *et al.* (2001) demostraron que el

mecanismo directo domina durante el período de adaptación bacteriana (es decir, fase de latencia o lag). Sin embargo, en general se concluyó que el mecanismo indirecto es el más probable (Sand *et al.* 2006, Rohwerder *et al.* 2003) indicaron que aunque la oxidación microbiana de los sustratos azufrados opera indirectamente a través de hierro férrico, las bacterias son realmente fijadas a las superficies minerales.

Las bacterias del género *Thiobacillus* son microorganismos acidófilos, es decir, requieren un pH = 2,5 para crecer en condiciones óptimas, lo cual resulta adecuado para mantener a los metales en solución, sobre todo al  $\text{Fe}^{3+}$ . Con valores de pH mayores a 5,5, estos microorganismos no se desarrollan. Por motivo la fase logarítmica empieza con ligeras disminuciones de pH. Durante las primeras 48 horas en general se aprecia disminución de la acidez y de manera más atenuada en medios con menor contenido de sulfato ferroso y, posteriormente por la actividad bacterial y específicamente por el mecanismo indirecto de oxidación bacteriana se genera el ácido sulfúrico y consecuentemente el incremento del grado de acidez.

Cualquiera de los cuatro parámetros de crecimiento obtenidos:  $\mu_{\text{max}}$ ,  $\lambda$ , M, Tg, y población bacteriana libre en suspensión (C), puede utilizarse como descriptiva de la evolución del cultivo. Bajo estas condiciones utilizaremos el parámetro velocidad de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) de instaura la fase logarítmica la cual alcanza un valor de 0.0595 UFC/mL/h, esta velocidad de crecimiento se desarrolla en un periodo de 59 horas. Esta constante de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) es indicativo de que el microorganismo cuenta con un sistema enzimático y metabólico para tolerar concentraciones de sulfatos diversos presentes en el medio de cultivo y poder utilizarlos debidamente.

La respuesta de la velocidad de crecimiento se explica porque una característica de este ser vivo es su tolerancia a la acidez, siendo capaz de sobrevivir en un medio de un PH de 2.0, es decir, un medio extremadamente ácido. Por ende podemos clasificar esta bacteria como un Acidófilo. Estos seres vivos han

desarrollado una variedad de mecanismos para mantener su pH interno a un nivel constante, los cuales incluyen la regulación “pasiva” y la regulación “activa”. La diferencia entre ambas regulaciones reside en que la primera no requiere que la célula gaste energía y la segunda sí lo requiere. Tres métodos o fases mediante los cuales la bacteria logra llevar a cabo este proceso. Mediante la enzima sulfito-oxidasa: ésta transferirá electrones desde el sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) al citocromo C lo cual generará ATP. Mediante la fosforilación por transporte de electrones. Mediante la actividad invertida de la enzima adenosina-fosfosulfato-reductasa (APS): por éste método se creará una molécula de alta energía formada a partir de sulfito y de adenosinammonofosfato (AMP). Su función durante la fase logarítmica es la oxidación del azufre elemental y sulfuro de hidrógeno que se forma como resultado de la oxidación por el hierro férrico, para esta oxidación se producen iones de hidrógeno que a su vez atacan a los minerales.

El modelo de Gompertz permitió el uso de 13 iteraciones y la covarianza existente es un valor que indica el grado de variación conjunta de dos variables aleatorias como el crecimiento logarítmico en función del tiempo. Es el dato básico para determinar la existencia de una dependencia entre ambas variables y además es el dato necesario para estimar otros parámetros básicos, como el coeficiente de correlación lineal o la recta de regresión que para el caso de ésta investigación alcanzó un valor de 0.998, éste da una idea del ajuste total conseguido, midiendo la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo, es decir mide la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente respecto a su media que es explicada por el modelo de regresión. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por el modelo; así mismo, la variación residual nos ayuda a confirmar qué tan bien se ajusta la línea de regresión que construimos al conjunto de datos en sí. La variación encontrada es pequeña por lo cual podemos inferir lo acertado que fueron los cálculos estimados.



El valor de la velocidad de crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* hallado en este estudio es relativamente cercano a los hallados en otros estudios referentes a la cinética del crecimiento; así tenemos que Rodríguez, (2009) encuentra un valor de 0.079 Log UFC/mL/h cuando investiga la remoción por vía bacteriana de Níquel y Vanadio. Zafar (1988), después de una fase lag de 16 días *Thiobacillus thiooxidans* solubilizó hasta 19% del cobre presente en la calcopirita en 14 d con una velocidad de crecimiento de 0.068 LogUFC/mL/h, antes de alcanzar la fase estacionaria.

Así mismo, Najafpour, (2005), utilizó *Thiobacillus thiooxidans* en procesos de desulfurización reportando velocidades de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de 0.063 Log UFC/mL/h obteniendo una población máxima de  $4.5 \times 10^6$  UFC/mL.

Otros estudios con *Thiobacillus thiooxidans* cultivados en el medio con tiosulfato permitió un rápido crecimiento con una velocidad de crecimiento de  $u = 0,067 \text{ h}^{-1}$ , Kazuo, (1990). Hsuan-Liang Liu (Hsuan-Liang Liu (2004) aplicó un modelo semiempírico para el crecimiento bacteriano a partir de concentraciones de células libres de  $8.18 \times 10^{12}$  a  $4.43 \times 10^{13}$  obteniendo un valor de  $\mu_{\max} = 0.052$  Log UFC/mL/h. Otro estudio de Hsuan y col (2004) que estimó la producción óptima de ácido sulfúrico obtuvo un  $\mu_{\max} = 0.067$  Log UFC/mL/h, con una población final de  $10^7$  Log UFC/mL y  $\lambda = 27$  horas. 27h.

Se concluye que el crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* es favorable en el medio de Starkey y que la bondad de ajuste de la curvas de crecimiento utilizando el modelo de Gompertz tiene una elevada correlación entre las variables población y tiempo. Así mismo, los parámetros de crecimiento y cinéticos hallados en forma experimental son semejantes a los obtenidos mediante el modelo.

Una vez caracterizado el crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* en el medio de Starkey, se determinó la variación del pH durante su crecimiento en presencia de azufre hidrófobo a concentraciones de 1%, 2%, 4% y, 8% p/v, con flujo de aire estéril de 10 L/min; pH 1,5; y temperatura ambiental.

Se observó un cambio proporcional del pH en relación a la concentración del Azufre hidrófobo presente en el medio de cultivo. Las variaciones de pH fueron mayores en las concentraciones de 4% y 8% con variaciones de unidades pH de 0.36 y 0.44 respectivamente, mientras que las concentraciones 1% y 2% muestran una variación de 0.24 y 0.31 unidades de pH, con tiempos de duración de 120 y 101 horas.

El crecimiento de *A. thiooxidans* exhibió una correlación positiva a la producción de ácido sulfúrico en la fase de crecimiento exponencial, lo que indica fuertemente que la oxidación microbiana del azufre es asociada al crecimiento en esta fase. La máxima variación de pH, se presenta cuando se incorpora 8% de azufre hidofobo y después de 70 horas de cultivo siendo el pH final fue de 1,12, consecuentemente existe mayor producción de ácido sulfúrico, resultados que coinciden con los tiempos de cese del crecimiento lográndose mínimos incrementos poblacionales.

Referente a las concentraciones de 1% y 2% la variación de pH fue de 1.26 y 1.22, respectivamente y en los cuales se producen incrementos de crecimiento de (C) 8.04 y 5.61 Log UFC/mL; de estos tratamientos, según la prueba de Tuckey, es el que contiene 2% lo cual permite inferir que es la concentración óptima.

Por otro lado la fase de crecimiento exponencial coincide con el tiempo y el pH que favorece el ingreso a la fase de estacionaria que para estas concentraciones se produce a las 81.5 y 72 horas respectivamente; sin embargo, la concentración de la sulfúrico ácido se frena en su producción por agotamiento de sustratos, lo que implica que la oxidación de azufre está asociado a la fase estacionaria bajo las concentraciones de 1 a 2%, aunque en esta última se frena la formación de ácido sulfúrico. Estos resultados indican el gran potencial de los *Th. thiooxidans* para ser utilizados para el proceso de biolixiviación siempre y cuando se encuentre en armonía la concentración de sustratos azufrados, tiempo y  $\mu_{max}$ .

En el caso de las bacterias del género *Thiobacillus* la oxidación de sulfuros, particularmente  $\text{H}_2\text{S}$ , no produce azufre elemental como producto intermediario. No obstante, estos microorganismos generan  $\text{S}^\circ$  cuando oxidan tiosulfato. El azufre elemental que se produce de la oxidación de tiosulfato puede ser oxidado posteriormente cuando el suministro de tiosulfato sea escaso. Si la fuente de tiosulfato es escasa, la bacteria no acumula  $\text{S}^\circ$ . Esto implica que bajo condiciones limitantes de tiosulfato, el azufre elemental se oxida tan pronto es producido.

El pH es un factor determinante en el proceso de adaptación de los microorganismos a los diferentes minerales e influye de forma significativa en la velocidad de crecimiento de los mismos, debido a que afecta a los grupos ionizables presentes en las enzimas, situadas en el citoplasma y periplasma de la célula (Das *et al.*, 1999; Gómez y Cantero, 2005).

Es conveniente señalar que en las reacciones de oxidación de azufre, uno de los productos generados es  $\text{H}^+$ . Por lo tanto, una de los resultados de la oxidación de compuestos de azufre, por Th. thiooxidans, es la acidificación del medio. El ácido que generan estas bacterias es ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), las cuales tiene capacidad para vivir en ambientes con un pH ácido, mientras otras especies viven en ambientes con un pH neutral. Muchas de las especies bacterianas que viven en ambientes ácidos también exhiben la capacidad para crecer como quimiolitotrofos, utilizando el ión ferroso como donante de electrones (refieráse a la unidad del Hierro) (Brock *et al.*, 1994).

Los electrones provenientes de la oxidación de sulfuros, tiosulfato o azufre elemental entran en diferentes puntos de la cadena de transporte dependiendo de su potencial de reducción. Se genera ATP a través de la fosforilación oxidativa acoplada a la cadena de transporte de electrones de electrones, siendo oxígeno el aceptador final de los electrones. La energía para la fosforilación de ADP a ATP proviene de la generación de un gradiente de protones.

Cabe destacar la concentración y velocidad de ingreso de aire estéril cuando se trabajan con los sistemas de oxidación por aeración que utilizan el oxígeno del aire como agente oxidante. Al ser el oxígeno un gas relativamente poco soluble en agua, es necesario reponer el oxígeno a medida que se consume para mantener una concentración de oxígeno adecuada y permanente en solución. Para ello es necesario incrementar la velocidad de disolución del oxígeno, lo que se logra aumentando la superficie y el tiempo de contacto de las burbujas de aire con la solución, mediante la producción de burbujas de aire cuyo tamaño sea lo más pequeño posible.

Para oxidar el sulfuro a sulfato la cantidad estequiométrica (teórica) de oxígeno requerida es de  $2 \text{ g O}_2/\text{g S}^{2-}$ . Sin embargo, en la práctica, la dosis de oxígeno necesaria es mucho mayor, dado que depende de varios factores, como la concentración del sulfuro, la temperatura y la eficiencia del sistema de aeración (tamaño de las burbujas y tiempo de contacto). Éste último, en el mejor de los casos, puede variar entre 25-30%. Por este motivo los sistemas de aeración deben ser los más eficientes posibles para reducir los tiempos, uso de insumos y facilitar la oxidación. (Salas, 2005)

Los efectos de las concentraciones de sustrato hidrófobo de azufre se han investigado por varios autores los cuales llegan a resultados similares de éste estudio aun cuando los sustratos azufrados se encontraban bajo las formas de minerales o en medios de cultivo formulado. Así tenemos que Vidyalakshmi (2007), en su estudio sobre aislamiento y caracterización de bacterias oxidantes de sulfuro, la producción de ácido sulfúrico por el mecanismo indirecto de oxidación bacteriana es apreciable del 3° día en adelante estabilizando el pH entre 1.9 a 2.0 siendo los más ácidos los que tienen mayor contenido de sustrato (44.4 g/l).

En experimentos realizados por diversos autores sugieren que la exposición de éste tipo de microorganismos a altos concentrados de sulfuros puede resultar en la disminución o inhibición de la actividad metabólica (Gómez *et al.*, 1999), esto por

la reducción de la cantidad de oxígeno disuelto, el daño que ocasiona las partículas por la fricción a la pared celular, también debido a efectos nocivos de los iones metálicos como el  $As^{3+}$ ,  $As^{5+}$  y  $Fe^{3+}$ , entre otros (Akcil *et al.*, 2007; Mousavi *et al.*, 2007; Marhual *et al.*, 2008). Sin embargo, la bacteria sulfato reductora puede ser adaptado para incrementar su tolerancia a estos ambientes y disminuir los efectos inhibitorios; mejorando notablemente los procesos de beneficio de biolixiviación (Mason y Rice, 2002 y Xia *et al.*, 2008).

Chen (2004), encontró la existencia de una fuerte correlación entre la producción de sulfato y el crecimiento microbiano a pH inferior a 4. Este punto es consistente con el natural crecimiento asociada a la oxidación de azufre a pH más ácidos y las características acidófilas de *T. thiooxidans*. Esto también implica que a pH 2,0 es una condición favorable para la expresión de la enzima sulfuro-oxidante ( $S^{\circ} + O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_3$ ) y la enzima sulfito oxidante ( $H_2SO_3 + 1/2O_2 \rightarrow H_2SO_4$ ) para la oxidación de azufre en ácido sulfúrico con sulfito como el intermediario clave. Esto implica que una iniciación del crecimiento microbiano de *T. thiooxidans* debe ser pHs moderadamente ácidas (es decir, pH 4) en lugar de valores de pH cercanos a pH 2.

El pH es un factor determinante en el proceso de adaptación de los microorganismos a los diferentes minerales e influye de forma significativa en la velocidad de crecimiento de los mismos, debido a que afecta a los grupos ionizables presentes en las enzimas, situadas en el citoplasma y periplasma de la célula (Das *et al.*, 1999; Gómez y Cantero, 2005).

Una razón importante que se debe considerar cuando se incrementa el pH es el menor tamaño de partícula del sustrato hidrófobo de azufre que se traduce en mayor área superficial y, por tanto, una mayor reactividad, generando un consumo de protones más elevado. Además, a menor tamaño de partícula se aumenta el estrés hidrodinámico para los microorganismos, lo cual pudo evitar que estos favorecieran la neutralización de carbonatos más rápidamente. En el presente

estudio se utilizó el azufre hidrófobo en partículas muy pequeñas por lo que concordamos con lo observado por Silverman (1961), Deveci (2004) y Haghshenas *et al.* (2009 a y b). Por otra parte, Deveci (2002) encontró que a menor tamaño de partícula hay mayor posibilidad de colisiones, las cuales son las responsables del daño celular o incluso de la muerte de los microorganismos, que es lo que se presenta cuando se utilizó concentraciones de azufre hidrófobo al 4 y 8%.

Es concluyente que variaciones de pH mínimas por debajo del óptimo alteran significativamente el normal crecimiento de las células de *Thiobacillus thiooxidans* minimizando su acción oxidante de los sustratos hidrófobos de azufre. Así mismo el estudio permite aceptar la hipótesis planteada por la cual se ha podido efectuar curvas de crecimiento de la bacteria y que pudieron ser ajustadas por el modelo de Gompertz con elevada correlación entre sus variables que determinaron que los parámetros de crecimiento y cinético se modifican significativamente cuando se incluyen sustrato hidrófobo de azufre, en el medio de Starkey, concentraciones mayores o iguales al 4%, siendo la mejor concentración a utilizar el de 2%.

## VIII. REFERENCIALES

1. Akcil A., Ciftci H., Deveci H. (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering*. 20: 310–318.
2. Arias, V., Anaya, F., Quiñones, J., Salazar, D., Gil, J., & Jamanca, G. Adaptación del *Thiobacillus Ferrooxidans* a sustratos conformados con especies de minerales piríticos. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 2014. 16(31).
3. Bevilacqua, D., Leite, A., García, Jr O., Touvinen, O. 2002. Oxidation of Chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry*, 38: 587-592.
4. Bor-Yann Chena, Hsuan-Liang Liu b, Yun-Wen Chenb, Yang-Chu Chengb. Dose–response assessment of metal toxicity upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1. *Process Biochemistry* 39 (2004) 735–745
5. Bounds, H. C., and A. R. Colmer. 1972. Comparison of the kinetics of thiosulfate oxidation by three iron-sulfur oxidizers. *Can. J. Microbiol.* 18:735-740.
6. Brock Thomas D. Effect of Water Potential on Growth and Iron Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* 1995 April; 29(4): 495-501
7. Cell growth and accumulation of *Thiobacillus thiooxidans* s3 in a pH-controlled thiosulfate medium (1990) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 36, 369-376
8. Chen Yann, Liu Hsuan-Liang. Dose–response assessment of metal toxicity upon indigenous *Thiobacillus thiooxidans* BC1 Bor. 2004. *Process Biochemistry* 39 735–745
9. Collinet Marie-Noelle and Morin Dominique. Characterization of arsenopyrite oxidizing *Thiobacillus*. Tolerance to arsenite, arsenate,

- ferrous and ferric iron. Rev. Orstom Lab. de Microbiologie, Vol. 4, N° 14. Pag. 456-465. 2003.
10. Colmer, A. R., K. L Temple and M. E. Hinkle. 1950. An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines. *J. Bacteriol.* 59:317-328
  11. Das, T., Ayyappan, S., Chaudhury, G. R. 2005. Factors Affecting Bioleaching Kinetics of Sulfide Ores Using Acidophilic Microorganisms. *BioMetals*, 12: 1-10.
  12. Deveci H. 2002. Effect of solids on viability of acidophilic bacteria. *Minerals Engineering*, 15: 1181-1189.
  13. Deveci, H., 2004. Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. *Hydrometallurgy*, 71: 385-396.
  14. Eccleston M and Kelly D P. Oxidation kinetics and chemostat growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* on tetrathionate and thiosulfate. *J Bacteriol.* 1978 June; 134(3): 718–727
  15. Espejo Romilio T., Ruiz Paulina. 1987. Growth of free and attached *Thiobacillus ferrooxidans* in ore suspension. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol 30 N° 4 pg. 586-592.
  16. G. D. Najafpour, A. Azizan and A. Harun. Microbial desulfurization of Malaysian coal in batch process using mixed culture . 2002 *IJE Transactions b: Applications* Vol. 15, No. 3 227-234
  17. Gomez C., Blazquez M.L., Ballester A. 1999. Bioleaching of a Spanish complex sulphide ore bulk concentrate. *Minerals Engineering*. 12: 93–106.
  18. Gómez, J., Cantero, D. 2005. Biooxidación del ión ferroso. In: Fernando Acevedo y Juan Carlos Gentina (eds.). *Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras*. 25-43.
  19. Haghshena, D. F., Keshavarz, A. E., Amouei, T., Bonakdarpour, B., Nasernejad, B. 2009a. Adaptation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate. *Minerals Engineering*, 22:

1299-1306.

20. Harvey P. I. and Krundwell F. K.. Growth of Thiobacillus ferrooxidans: a Novel Experimental Design for Batch Growth and Bacterial Leaching Studies. Applied and Environmental Microbiology, July 1997, p. 2586–2592 Vol. 63, No. 7
21. Hossain S. M, Das M. Bioleaching of Zinc Sulphide (ZnS) Ore using Thiobacillus ferrooxidans. IE (I) Journal.CH. Vol 85, 2004
22. Hsuan-Liang Liu, Chun-Hsiung Teng, Yang-Chu Cheng. A semiempirical model for bacterial growth and bioleaching of Acidithiobacillus spp. Chemical Engineering Journal. (2004) 99. 77–87
23. Hsuan-Liang Liu\*, Yann-Wen Lan, Yang-Chu Cheng. Optimal production of sulphuric acid by Thiobacillus thiooxidans using response surface methodology. 2004. Process Biochemistry 39
24. Katrina Edwards; Bond Philip L; Banfield, Jillian F. Characteristics of attachment and growth of Thiobacillus caldus on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals? Environmental Microbiology, Volume 2, Number 3, June 2000 , pp. 324-332
25. Kelly, D. P., and C. A. Jones. 1978. Factors affecting metabolism and ferrous iron oxidation in suspensions and batch cultures of Thiobacillus ferrooxidans. In L.E. Murr (ed.), Metallurgical applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena. Academic Press Inc. New York.
26. Kelly, D. P., M. Eccleston, and C. A. Jones. 1977. Evaluation of continuous chemostat cultivation of Thiobacillus ferrooxidans on ferrous iron or tetrathionate, p. 1-7. In W. Schwartz (ed.), Gesellschaft für Biotechnologische Forschung conference-bacterial leaching. Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
27. Klein David P. and Charles A. Michael Media effects on the growth of Thiobacillus novellus Volume 15, Number 2 / marzo de 1987

28. Konishi Y, Asai S. and Yoshida N. Growth Kinetics of Thiobacillus thiooxidans on the Surface of Elemental Sulfur. Appl. Environ. Microbiol., Oct 1995, 3617-3622, Vol 61, No. 10
29. Marhual N.P., Pradhan N., Kar R.N., Sukla L.B., Mishra B.K. 2008. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. Bioresource Technology. 99: 8331–8336.
30. Mason L.J., Rice N.M. 2002. The adaptation of Thiobacillus ferrooxidans for the treatment of nickel–iron sulphide concentrates. Minerals Engineering. 15: 795–808.
31. Matin A. , Kahan F. J. and Leefeldt R. H. Growth factor requirement of Thiobacillus novellas Volume 124, Number 1 / enero de 1980
32. Matsumoto Norio, Nakasono Satoshi, Ohmura Naoya, Saiki Hiroshi. Extension of logarithmic growth of Thiobacillus ferrooxidans by potential controlled electrochemical reduction of Fe(III). Biotechnology and Bioengineering. 2008 Volume 64 Issue 6, Pages 716 – 721
33. Meruane, G., Vargas, T. 2003. Bacterial oxidation of ferrous iron by Acidithiobacillus ferrooxidans in the pH range 2,5-7,0. Hydrometallurgy, 71 (1-2): 149-158.
34. Mousavi S.M., Yaghmaei S., Vossoughi M., Jafari A., Roostaazad R., Turunen I. 2007. Bacterial leaching of low-grade ZnS concentrate using indigenous mesophilic and thermophilic strains. Hydrometallurgy. 85: 59–65.
35. Murali Krishna and Philip Ligy. Thiobacillus denitrificans immobilized biotrickling filter for NO<sub>2</sub> removal. Clean Techn Environ Policy (2005) 7: 285–293
36. Novo M. ,Maria Teresa; Da Silva Alba C. ; Moreto Ronaldo. Thiobacillus ferrooxidans response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation Antonie van Leeuwenhoek Volume 77, Number 2 /



febrero de 2000

37. Pokorna Blanka, Mandl Martin, Borilova Sarka. Kinetic Constant Variability in Bacterial Oxidation of Elemental Sulfur Applied and Environmental Microbiology, June 2007, p. 3752-3754, Vol. 73, No. 11
38. Pronk J. T., Meijer W. M., W and J. G. Kuenen. Growth of Thiobacillus ferrooxidans on Formic Acid. Applied and Environmental Microbiology, July 1991, p. 2057-2062 Vol. 57, No. 7
39. Rodriguez Luna Weny . Estudio de la remoción vía bacteriana de Ni y V presente en catalizadores gastados. 2009. Tesis Maestria Instituto politécnico Nacional Querátaro Mexico. Pag 42-43.
40. Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K., Sand W. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Appl Microbiol Biotechnol (2003) 63: 239–248
41. Salas G. Eliminación de sulfuros por oxidación en el tratamiento del agua residual de una curtiembre. 2005. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. Vol. 8 N.º 1,
42. Sand W, Gehrke T (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. Research in Microbiology 157:49-56.
43. Shrihari, S. R. Bhavaraju, Jayant M. Modak, R. Kumar,\*+ and K. S. Gandhi. Dissolution of Sulphur Particles by Thiobaci//us ferrooxidans: Substrate for Unattached Cells Biotechnology and Bioengineering, 2001. Vol. 41, Pp. 612-616
44. Silverman M., Rogoff M. y Wender I. (1961). Bacterial oxidation of pyritic materials in coal. Appl. Microbiol. 9, 491-496.
45. Silverman, M., Rogoff, M., Wender, I. 1961. Bacterial oxidation of pyritic materials in coal. Appl. Microbiol., 9 (6): 491-496.

46. Temple, K. L., and Colmer A. R.. 1951. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 62:605-611.
47. Tsuyoshi Sugio, Tatsuo Tano and Kazutami Imai. Isolation and Some Properties of Silver Ion-resistant Iron-oxidizing Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* *Agric. Biol. Chem.*, 45 (9), 2037-2051, 2004
48. Tuovinen, O. H., and D. P. Kelly. 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in relation to the microbiological leaching of sulphide ores. *Z. Allg. Mikrobiol.* 12:311-346.
49. Vidyalakshmi Rajagopal. Sridar R.. Isolation and characterization of sulphur oxidizing bacteria *Journal of Culture Collections.* 2007, Volume 5, pp. 73-77
50. Vogler, K.G. and W.W. Umbreit., 1941. The necessity for direct contact in sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Soil Sci.*, 51: 331-337.
51. Wynn, Isaac. Heat Tolerance of *Thiobacillus Denitrificans*. *Physics* Vol 2 p. 124-128, 2005
52. Xia L., Liu J., Xiao L., Zeng J., Li B., Geng M. and Qiu G. Single and cooperative bioleaching of sphalerite by two kinds of bacteria *A. ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. 2008. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 12: 190–195.
53. Zafar M. Khalid, Kauser A. Malik. Leaching of chalcopyrite by *Thiobacillus thiooxidans* and oxidized copper ore by *Thiobacillus ferrooxidans* isolated from local environments *journal of applied microbiology and biotechnology.* 1988, Volume 4, Issue 4, pp 447-453
54. Zeballos Fernando, Barbosa Olavo, De Carvalho Roberto Jose, Zumarán Juan Raúl Jesús . Modelamiento Matemático de la Lixiviación Química y Bacteriana de Minerales de Cobre en Pila. *Rev.Ciencia de los Materiales y Metalúrgia.* 2004 Vol 3 N° 8 pag.

143-155

55. Zhi-guo He, Yue-hua Hu, Hui Zhong, Wei-xin Hu, Jin Xu Preliminary proteomic analysis of *Thiobacillus ferrooxidans* growing on elemental sulphur and Fe<sup>2+</sup> separately. *J Biochem Mol Biol.* 2005 May 31;38 (3):307-13.

## **IX. APENDICE**

**TABLA N° 4.1**  
**PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE THIOBACILLUS**  
**THIOXIDANS EN EL MEDIO DE STARKEY**

Parámetros	Curva Experimental	Ajuste Modelo de Gompertz
A (ufc/mL)	2.89	3.02
B (ufc/mL/h)	0.0595	0.0404
C (ufc/mL)	3.56	4.18
D (h)	77.00	76.04
$\lambda$ (h)	49.70	63.81
Tg (h)	16.80	24.87
R <sup>2</sup>	0.992	0.998

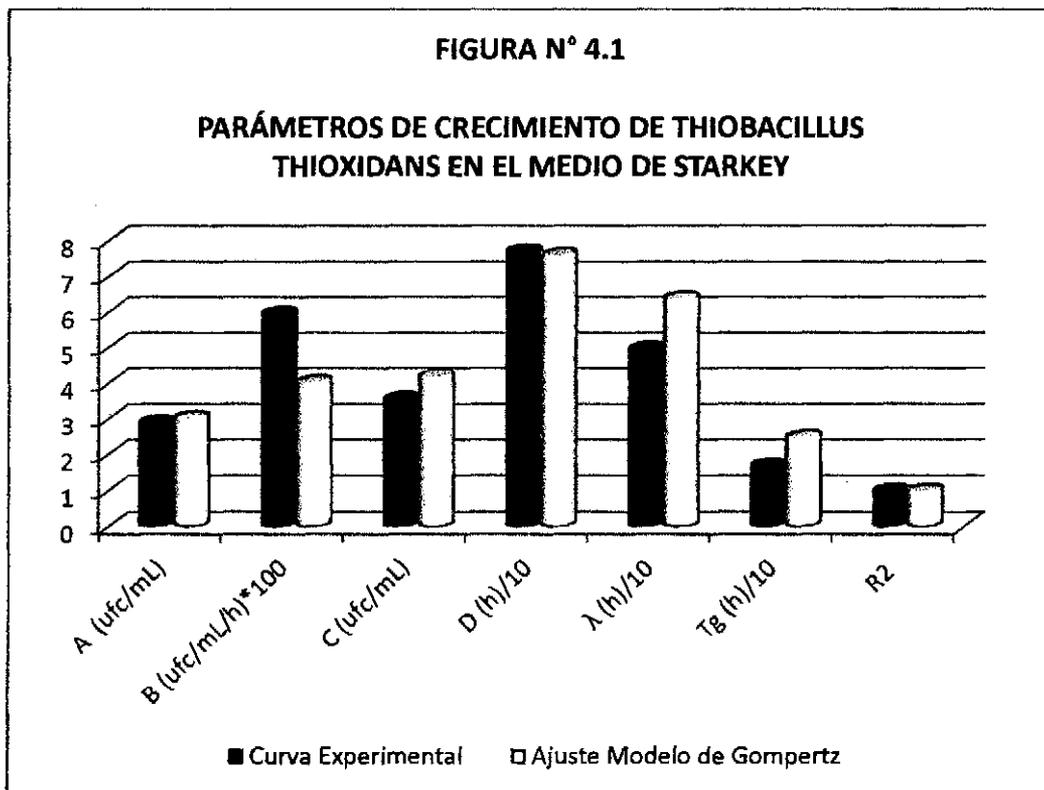


FIGURA N° 4.2

CRECIMIENTO DE *Thiobacillus thiooxidans* EN EL MEDIO DE STARKEY (LOG. UFC/ML)

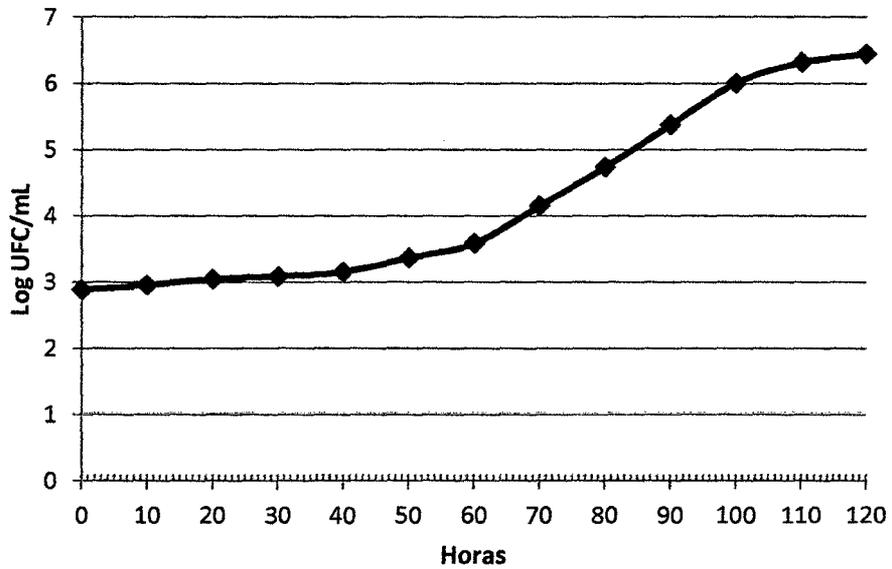
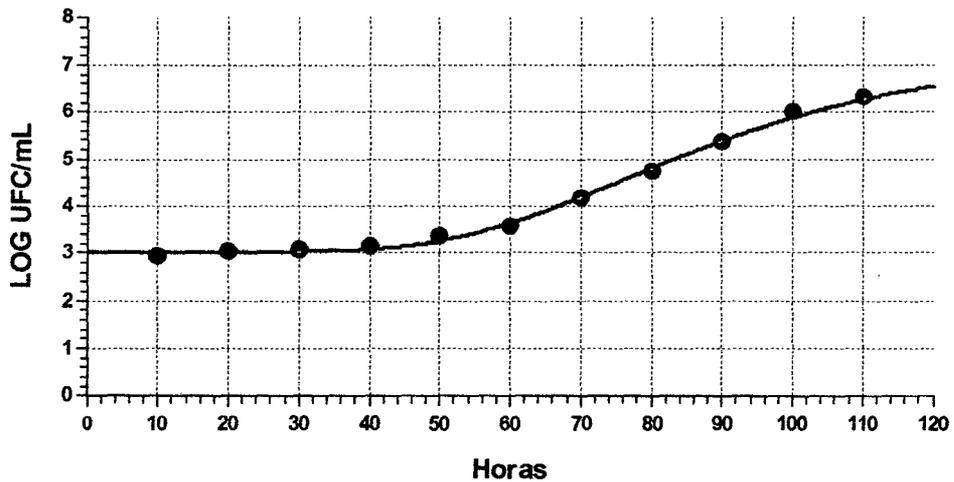


FIGURA N° 4.3

Crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* (log UFC/mL) según modelo de Gompertz en medio de cultivo de Starkey

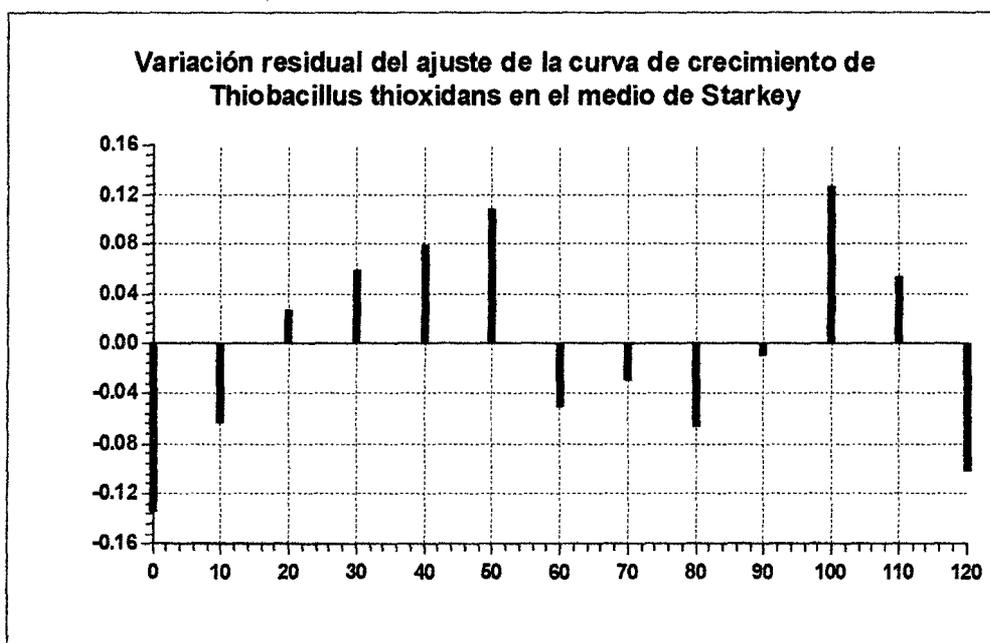


**TABLA N° 4.2**

**VARIACIÓN RESIDUAL DEL AJUSTE DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Thiobacillus thiooxidans* EN EL MEDIO DE STARKEY SEGÚN EL MODELO DE GOMPERTZ ( $y=a+c*\exp(-\exp(-b*(x-d)))$ )**

Horas	Residuales
0	-0.1333927961
10	-0.06339502568
20	0.02633509172
30	0.05989150721
40	0.07954564816
50	0.1086331562
60	-0.05061800904
70	-0.02937304463
80	-0.06601643355
90	-0.009899567561
100	0.1275000566
110	0.05291703916
120	-0.1021275666

**Figura N° 4. 4**



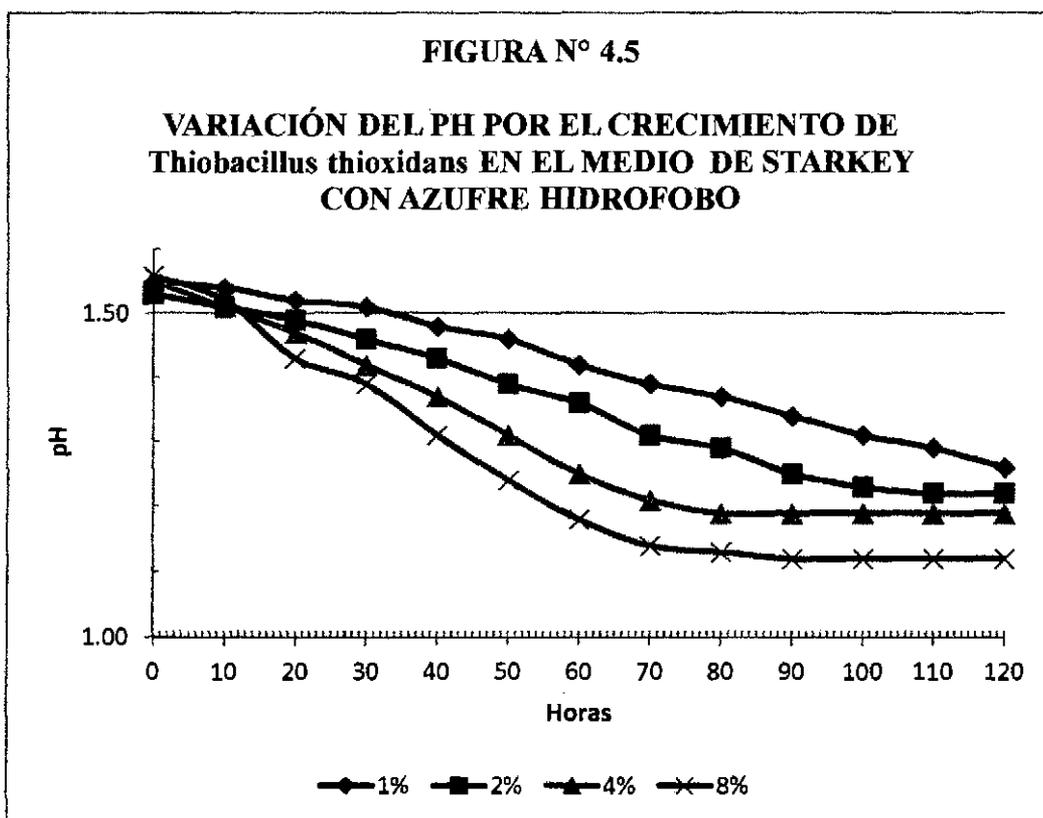
**TABLA N° 4.3**

**VARIACIÓN DE PH EN EL MEDIO DE STARKEY CON ADICIÓN DE AZUFRE HIDROFOBO**

Característica	Concentración de azufre hidrofobo			
	1%	2%	4%	8%
pH inicial	1.55	1.53	1.55	1.56
pH final	1.26	1.22	1.19	1.12
Variación pH (unidades pH)	0.24	0.31	0.36	0.44
Tiempo Variación pH (horas)	120	101	74	69
Tendencia Variación pH	0.0025	0.0031	0.0048	0.0058
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0.9900	0.9906	0.9927	0.9947

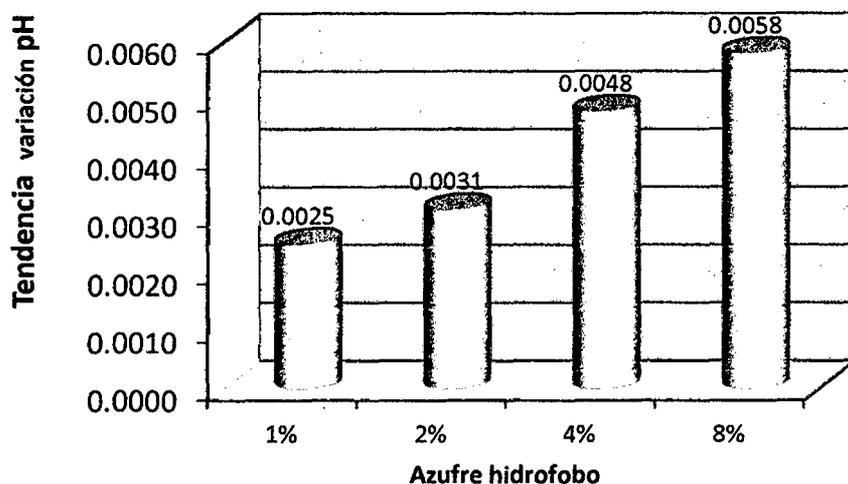
**FIGURA N° 4.5**

**VARIACIÓN DEL PH POR EL CRECIMIENTO DE Thiobacillus thioxidans EN EL MEDIO DE STARKEY CON AZUFRE HIDROFOBO**



**FIGURA N° 4.6**

**TENDENCIA DE LA VARIACIÓN DE PH Y LA  
CONCENTRACIÓN DE AZUFRE HIDROFOBO DURANTE EL  
CRECIMIENTO DE Thiobacillus thiooxidans**



**TABLA N° 4.4**

**PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE THIOBACILLUS THIOXIDANS  
EN EL MEDIO DE STARKEY**

PARAMETRO	Concentración de Azufre hidrofobo			
	1%	2%	4%	8%
$N_0 = \text{LogUFC/mL}$	3.07	3.24	3.12	3.02
$\mu_{\text{max}} = \text{LogUFC/mL/h}$	0.117	0.102	0.089	0.074
$\lambda = \text{Fase de latencia (horas)}$	19.82	25.79	33.17	36.63
Incremento LogUFC/ml (C)	8.04	5.61	3.94	2.82
Tasa Máxima Crecimiento (M) horas	39.82	42.64	45.67	47.75
Tiempo generacional (Tg) horas	8.547	12.67	14.50	18.11
Coef. De determinación ( $R^2$ )	0.997	0.999	0.998	0.997
D.E.	0.196	0.115	0.092	0.100

FIGURA N° 4.7

EFFECTO DEL PH SOBRE LOS PARÁMETROS DE  
CRECIMIENTO DE *Thiobacillus thiooxidans*  
EN EL MEDIO DE STARKEY

