

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**

**Facultad de Ingeniería**

**Escuela Académico Profesional de Ingeniería Metalúrgica**

**“PRE - TRATAMIENTO PARA OXIDAR UN MINERAL  
REFRACTARIO DE ORO MEDIANTE BACTERIAS  
THIOBACILLUS FERROOXIDANS”**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. Said Julián Jarro Villegas**

**Para optar el Título Profesional de:**

**INGENIERO METALURGISTA**

**TACNA - PERÚ**

**2014**

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA  
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA METALÚRGICA

“PRE –TRATAMIENTO PARA OXIDAR UN MINERAL REFRACTARIO  
DE ORO MEDIANTE BACTERIAS THIOBACILLUS FERROOXIDANS”

Tesis sustentada y aprobada el día 20 de enero de 2012, estando  
integrado el Jurado Calificador por:

PRESIDENTE



.....

Mgr. Carlos Gutiérrez Delgado.

SECRETARIO



.....

Ing. Julián Nieto Quispe.

VOCAL



.....

Ing. Daniel Zevallos Ramos

ASESOR



.....

Ing. Zoilo Valdivia Infantas



## **DEDICATORIA**

A Dios, a mis padres Julián y Juana,  
a mi hermana, por su apoyo  
constante.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los docentes de la Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ing. Zoilo Valdivia Infantas de la Facultad de Metalurgia, de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por el asesoramiento en la ejecución del presente trabajo de investigación además por su aporte científico y acertados consejos que sirvieron de mucho en la elaboración del presente informe de Tesis.

Al Ingeniero Raúl Soto Pérez por sus consejos en la realización de la tesis, gracias por darme a conocer esta magnífica área de la biominería.

A todos, muchísimas gracias.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I.....	3
1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.2 OBJETIVOS.....	4
1.2.1 Objetivo general .....	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
1.3 HIPÓTESIS .....	5
1.4 JUSTIFICACION E IMPORTANCIA.....	5
1.5 ANTECEDENTES .....	8
CAPITULO II.....	13
2.1 LA MICROBIOLOGIA .....	13
2.1.1 Microorganismo.....	13
2.1.2. La célula bacteriana. ....	14
2.1.3. Genética bacterial.....	44

2.1.4. La influencia del oxígeno sobre el crecimiento de las bacterias.....	46
2.1.5. El crecimiento de las poblaciones de bacterias.....	47
2.1.6. VARIABLES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD MICROBIANA ..	62
2.1.6.1. TEMPERATURA.....	62
2.1.6.2. CONTAMINANTES .....	63
2.1.7. BALANCE DE CELULAS .....	64
2.1.8. CUANTIFICACION DE BACTERIAS .....	66
2.1.9. IDENTIFICACION DE BACTERIAS .....	72
2.1.9.1. Coloración de Gram .....	72
2.1.9.2. Coloración de Ziehl-Neelsen .....	74
<b>CAPITULO III .....</b>	<b>75</b>
<b>3.1 LA LIXIVIACION BACTERIAL Y MECANISMO .....</b>	<b>75</b>
3.1.1. BIOLIXIVIACIÓN / BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS .....	75
3.1.2. EXTRACCIÓN DE ORO EN MINERALES REFRACTARIOS ..	78
3.1.3. MECANISMOS DE BIOOXIDACIÓN BACTERIANA DE SULFUROS .....	81
3.1.4. VENTAJAS DE LA BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS .....	91

3.1.5. FACTORES QUE AFECTAN LA CINÉTICA DE BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS .....	93
CAPITULO IV.....	105
4.1 LA CIANURACION.....	105
4.1.1. Introducción.....	105
4.1.2. Teorías y Conceptos .....	110
CAPITULO V.....	124
5.1 INTRODUCCIÓN .....	124
5.2 MATERIA PRIMA .....	124
5.3 CARACTERIZACIÓN MINERALÓGICA .....	125
5.4 EQUIPOS Y MATERIALES.....	125
5.5 PRUEBAS EXPERIMENTALES .....	126
5.5.1 Pruebas Aislamiento, cultivo y conservación .....	126
5.5.2 Pruebas de cianuración .....	138
CAPITULO VI.....	150
6.1 Resultados de la biooxidación .....	150
6.2 Lixiviación con cianuro sin y con pre tratamiento de biooxidación .....	153



<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>156</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>158</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>162</b>

## INDICE DE TABLAS

TABLA I.	Composición de una bacteria típica.	21
TABLA II.	Reductores y Oxidantes en Respiraciones Bacterianas	36
TABLA III.	Clasificación de las bacterias de acuerdo a su resistencia a la temperatura.	63
TABLA IV.	Niveles de Toxicidad Inhibitorios del Crecimiento de Thiobacillus ferrooxidans	64
TABLA V.	Medio Nutriente para el Cultivo de Thiobacillus Ferrooxidans,	69
TABLA VI.	Concentración crítica de oxígeno para el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i>	98
TABLA VII	Niveles de toxicidad de cationes y aniones para el <i>A. ferrooxidans</i>	102
TABLA VIII	Ley del mineral refractario	125
TABLA IX	Configuración de parámetros para la biooxidación de minerales refractarios con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .	136

TABLA X	Evaluación del crecimiento bacteriano (Cuadro N° 9).	137
TABLA XI	Efecto del pH en la biooxidación del mineral refractario	137
TABLA XII	Influencia de la concentración $Fe^{+3}$ por <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> ,	138
TABLA XIII	Influencia de la concentración $Fe^{+2}$	138
TABLA XIV	Resultados de prueba sin tratamiento bacterial	140
TABLA XV	Resultados de la prueba N° 1	154
TABLA XVI	Resultados de la prueba N° 2	146
TABLA XVII	Resultados de la prueba N° 3	147
TABLA XVIII	Resultados de la prueba N° 4	148
TABLA XIX	Resultados de la prueba N° 5	149
TABLA XX	Cinética de disolución del oro a diferentes condiciones de tratamiento,	154

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Modelo del mecanismo “indirecto de contacto”. Bacteria rodeada por su capa de exopolímeros (EPS) y adherida a la superficie de una pirita. MC: Membrana citoplasmática. EP: Espacio periplásmico. ME: Membrana externa.	84
Figura 2	Esquema de los distintos tipos de lixiviación de un sulfuro según Tributsch (2001).,	91
Figura 3	Crecimiento bacterial con respecto al tiempo,	150
Figura 4	Efecto del pH con respecto al tiempo y su relación con la biooxidación del mineral.	151
Figura 5	Biooxidación de hierro con Thiobacillus ferrooxidans M-UNJBG 1,	152
Figura 6	Biooxidación de hierro con Thiobacillus ferrooxidans M-UNJBG 1,	153
Figura 7	Cinética de disolución del oro a diferentes condiciones de tratamiento,	154

## INDICE DE ANEXOS

- ANEXO 01 Tabla de Mc. Grady para recuento de 162  
Acidithiobacillus ferroxidans M - UNJBG 1,
- ANEXO 02 Fotos de los diferentes pasos realizados para 163  
efectuar la experimentación de la biooxidación de  
mineral refractario de oro en frascos de vidrio,
- ANEXO 03 Fotos de los diferentes pasos realizados para 164  
efectuar la experimentación de la biooxidación de  
mineral refractario de oro en columna de lecho fijo  
de pre - colación

## RESUMEN

En este trabajo se analiza la eficacia de la biooxidación en el pre tratamiento de minerales auríferos en los que la refractariedad viene provocada por la presencia de sulfuros metálicos. Se estudian un tipo de matriz: arsenopirita. Se concluye que la biooxidación es un pre tratamiento eficaz para este tipo de mineral refractario de oro. En el caso de minerales en matriz de sulfuros de arsénico, la biooxidación puede realizarse por un mecanismo de contacto indirecto, lo que permite alcanzar una cinética mucho más rápida que la de los procesos convencionales de biolixiviación.

El propósito de esta investigación fue evaluar a escala de laboratorio la acción de microorganismos *Acidithiobacillus ferrooxidans* aislado del mismo mineral en estudio sobre la oxidación de sulfuros donde predominan arsenopirita, variando las concentraciones de sustrato (10 % y 15 %), y la aireación. Los resultados de las mediciones diarias de pH y potencial redox realizadas por un tiempo de 25 días, demuestran que hubo una actividad de oxidación eficiente y se llegó a valores de pH de 1,5 y potencial redox de 600 mv, además se logró recuperaciones de oro del 87,67 % a las 46 horas de lixiviación.

**Palabras clave:** bacteria, biolixiviación, arsenopirita, mineralogía aplicada.

## INTRODUCCION

En el Perú la Industria Minera-Metalúrgica, es fuente de riqueza de mayor importancia dentro del contexto socio-económico. Dicha actividad se desarrolla en forma acelerada, gracias a las tecnologías limpias que son cada vez más diversificadas y acondicionadas a los procesos tradicionales.

Muchos depósitos minerales sulfurados de Oro y Plata, que contienen Pirita, Pirrotita, Calcopirita, Arsenopirita, etc. considerados no económicamente factibles por las bajas recuperaciones por el proceso de cianuración convencional y por el alto consumo de cianuro de sodio. En estos momentos pueden ser económicamente rentables aplicando el Proceso de Pre-Aireación en la lixiviación de estos minerales.

A partir del siglo XVIII, se utilizó el método de Lixiviación para la recuperación de minerales de cobre, posteriormente se avanzó y se aplicó en la recuperación de oro y plata, primeramente para minerales oxidados y después para sulfurados.

Las dificultades en el tratamiento por cianuración se presentan principalmente cuando el oro está finamente encapsulado y diseminado en los minerales sulfurados, donde se encuentra en un alto porcentaje en tamaños menores de 20 micras, inclusive se tiene la presencia de oro sub-microscópico, entonces la sola presencia de sulfuros de hierro y metales base de minerales de arsénico, antimonio, bismuto, etc., hacen difícil su tratamiento por cianuración convencional.



## **CAPITULO I**

### **GENERALIDADES**

#### **1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Minerales refractarios o más apropiadamente, minerales problema, se presentan en diferentes formas. Estas incluyen al oro químicamente combinado (teluros), oro encapsulado o finamente diseminado en minerales sulfurados: pirita y principalmente arsenopirita; y el oro lixiviable pero que es reabsorbido en materiales carbonosos que contiene el mineral.

El oro encapsulado o finamente diseminado en minerales sulfurados es el mas común existiendo numerosos depósitos alrededor del mundo con esta problemática: Campbell Red Lake Mines, The Giant Yellowknife Mines, Dickenson Joint Venture y The Kerr Addison Mines en Canadá, otros depósitos incluyen Cortez, Getchell, y McLaughlin, Carlin, Bald Mountain, Jardine y Mercur Mines en U.S.A., Dacasun, Mindyak y Kazakhstan en U.S.S.R., Barberton,

Eastern Transval y Witwatersrand en South Africa, Pórgera en Pagua New Guinea, y otros depósitos en Australia, Brasil y Perú.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo general**

Mejorar el rendimiento en la recuperación de oro de minerales refractarios utilizando el tratamiento microbiológico o biolixiviación como una nueva alternativa de pre tratamiento a la cianuración.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Someter la muestra mineral a tratamiento microbiológico a diferentes concentraciones de inóculo microbiano y aireación.
- Cianurar las muestras pre tratadas por biooxidación a condiciones estándar de operación.
- Determinar el consumo de cianuro y cal durante el proceso de cianuración.
- Determinar el porcentaje de recuperación de oro.

### **1.3 HIPÓTESIS**

La inoculación microbiana y aireación en proceso biolixiviación inciden en la recuperación de oro; y el consumo de cianuro y cal en la cianuración.

### **1.4 JUSTIFICACION E IMPORTANCIA**

Desde el punto de vista técnico-económico, la variación de la inóculo microbiano y aireación en el mineral mejorara la cinética de cianuración de los minerales y por lo tanto disminuir los ciclos lixiviación. Con relación al beneficio económico, se tratara minerales refractarios donde es difícil su extracción de oro.

Las empresas mineras que procesan minerales sulfurados auríferos, en la actualidad tienen problemas en la recuperación de oro por cianuración, debido a que en el medio están presentes muchos compuestos cianógenos consumidores de cianuro, dificultando la extracción del oro, por lo que se desarrolló el presente estudio a fin de dar una solución viable.

La aplicación de la Etapa de Pre-Aireación a la Cianuración es con la finalidad de optimizar el Proceso, debiendo de implementarse

entre la remolienda y la cianuración del circuito de la Empresa Minera Aurífera Calpa S.A.

Si bien el método de extracción de oro más importante y empleado en la actualidad es la cianuración, no siempre es posible aplicarlo exitosamente en forma directa si no se tiene en cuenta las características del mineral o concentrado.

Las dificultades en el tratamiento por cianuración se presentan principalmente en minerales en que el oro está finamente diseminado en minerales sulfurados, sea que este se presente como oro libre o como oro encapsulado. La sola presencia de sulfuros de hierro y de metales base, de minerales de arsénico, antimonio, bismuto, etc. hacen difícil su tratamiento por cianuración convencional.

El problema de la cianuración de minerales sulfurados es que estos o los productos de su descomposición pueden reaccionar con el cianuro causando un excesivo consumo del citado reactivo o pueden reaccionar con el oxígeno de la solución de cianuro y desde luego reducir la velocidad de disolución de los minerales de oro.

Nagy, establece que para que el oro se disuelva completamente en soluciones alcalinas de cianuro, se deben satisfacer ciertos requerimientos, tales como que:

- El oro debe estar como partículas discretas y limpias.
- Deben estar ausentes de impurezas que puedan inhibir la reacción.
- Se debe disponer de un adecuado suministro de oxígeno.
- Hasta donde concierne al segundo requerimiento, muchas minas de oro poseen constituyentes que se descomponen en soluciones de cianuro lo que ocasiona la aparición de compuestos, en solución, que pueden inhibir la reacción de disolución del oro.

Demopoulus , Macassi , Ponciano, nos dice que la refractariedad de las menas o concentrados es determinada por la resistencia que ofrecen estos materiales a la extracción directa de los metales preciosos por técnicas convencionales de cianuración alcalina. Esta refractariedad puede ser causada por:

- Diseminación fina o encapsulamiento de oro fino en pirita o arsenopirita,
- Presencia de elementos carbonaceos (que reprecipitan al oro disuelto),
- Presencia de cianicidas (consumidores de cianuro); y

- Presencia de agentes consumidores de oxígeno.

Las técnicas convencionales de extracción directa de los metales preciosos mediante soluciones alcalinas de cianuro resultan insatisfactorias, debido a la refractariedad arriba mencionada, razón por la cual se ha presentado como alternativa para solucionarlas los llamados pre tratamientos. Estos han sido revisados por Nagy, quién los adapta a cada familia de minerales de oro.

## 1.5 ANTECEDENTES

A finales del siglo XIX S. Winogradsky describió un grupo de bacterias de diversos ambientes: suelo, agua y mina, que crecen por oxidación de minerales con azufre, hierro, cobre, cobalto, níquel y otros metales, lo que además asimilan el  $\text{CO}_2$  y/o carbonatos como fuente de carbono. Por este tipo de metabolismo bioquímico les definió como "bacterias quimiolitotróficas y postuló que la energía derivada de la oxidación del ión ferroso a férrico sirve para su crecimiento y asimilación de  $\text{CO}_2$ " (Sánchez-Yáñez et al., 2000; Harvey y Crundwell, 1997). A finales de 1979 se les conocían como bacterias autotróficas del hierro, entonces sólo se

describían dos géneros: *Ferrobacillus* y las especies *F. ferrooxidans* y *F. sulfooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*, esta última se aisló de un suelo pobre en materia orgánica y en agua de mina; (Lindstrom et al., 1992; Olson, 1991). La lixiviación bacteriana (LB) es una estrategia biológica que se emplea para la concentración y extracción de metales de minerales sulfurados refractarios de baja ley ó SMBL (Álvarez y Jerez, 1990; Janssrn et al., 1996).

En hidrometalurgia la LB es sencilla, barata y ecológica, sus productos no contaminan el ambiente (Navarrete, et al., 2001). Una de sus principales ventajas es la económica, al aprovechar menas de minerales sulfurados metálicos de baja ley (SMBL), considerados así porque la concentración del metal de interés es mínima (10mg/ton del mineral) y porque la extracción por métodos químicos tradicionales no es rentable, por ello no se explotan a pesar de que contienen oro, plata, cobre y metales radiactivos: uranio, radio, etc. (Ballesteros et al., 2001; Fowler y Crundwell, 1998).

El primer informe sobre la LB de SMBL, se publicó en 1922 con una bacteria quimiolitotrofica desconocida, esta investigación

describió una forma biológica de extracción de metales como alternativa barata para la explotación de SML, durante 30 años este informe se ignoró hasta el redescubrimiento *T. ferrooxidans* tolerante a alta concentración de metales pesados (g L<sup>-1</sup>): 10 de zinc, 72 de níquel, 30 de cobalto, 55 de cobre y hasta 160 de hierro fundamental en el incremento del costo de fundición de minerales, la que obliga a que concentrados de oro y plata se exploten por LB (Lindstrom et al., 1992).

En general se describen tres métodos para la extracción de metales a partir de minerales: lixiviación química en autoclave, tostación de sulfuros y LB. En base al mineral que se trata se sabe que el reto es extraer el metal unido al azufre, ya que éste es la causa de la refracción o resistencia del mineral a la separación de estos metales.

La lixiviación de sulfuros en autoclave (proceso Sherrit-Gordón), se realiza a elevada temperatura y presión del oxígeno para la oxidación y solubilización del azufre y su eliminación, como la variante de Homestake en Nevada, E.U.A. Por esta técnica el producto de autoclave, es una solución ácida en la que los metales



del mineral son solubles. En tanto un lodo atrapa las especies inertes como arcillas y sílice, en la siguiente etapa; la cianuración se aplica para separar: plomo, cobre y zinc, la técnica se usa en yacimientos de minas de oro con o sin concentración de sulfuros, la desventaja de este tratamiento es el alto consumo de oxígeno proporcional a la concentración de azufre en el mineral además los metales de los minerales deben ser resistentes a la corrosión (Sand et al., 1993; Sugio et al., 1990).

La tostación es un proceso industrial para la conversión de sulfuros en sulfatos solubles en solución ácida acuosa, que permite cianuración normal, después del lavado de residuos. No obstante la tostación genera dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), no recuperable en pequeña o mediana escala, que contamina el ambiente por ello normas de protección ambiental restringen su utilización.

La Lixiviación Bacteriana es una actividad biológica conocida desde la antigüedad por fenicios, romanos, árabes y españoles, que la reportaron en la extracción de cobre en agua de minas. En 1947 cuando *T. ferrooxidans* se aisló por primera vez del drenaje de una mina de carbón bituminoso (Kashefi et al., 2001; Olson,

1991). En España en 1950 se reportó la Lixiviación Bacteriana de minerales de cobre en una mina del Río Tinto, hasta 1970 se confirmó que esto fue derivado de la actividad de *Thiobacillus* sobre el SMBL (Lindstrom et al., 1993; 1992; Suzuki et al., 1990). Cuando la microbiología avanzó, se reportó que *Thiobacillus* como es clave en la recuperación de metales de valor comercial a partir de SMBL. Por ello existen patentes de este proceso, incluso para minerales con metales radioactivos (Ahonen y Touvinen, 1992).

## **CAPITULO II**

### **FUNDAMENTOS DE LA MICROBIOLOGIA**

#### **2.1 LA MICROBIOLOGIA**

##### **2.1.1 Microorganismo**

Hay muchos objetos de interés biológico que son pequeños: las células de las plantas y animales son los ejemplos más obvios. Sin embargo, éstos no son organismos sino solamente partes de organismos. Un microorganismo es pequeño, pero es también un individuo.

El más obvio resultado de ser pequeño es una relación o razón muy grande de área de superficie a volumen. Por ejemplo, un volumen de bacterias igual al volumen de una sola célula vegetal, tiene un área de superficie aproximada de 10 veces mayor. Esto es importante, porque es a través de su superficie que un organismo intercambia material con su medio ambiente. A su vez, un mayor intercambio de material, lleva asociado un metabolismo más intenso dentro del organismo y un alto grado de reproducción.

Los seres vivos se dividen en: animales, vegetales y protistos. El reino protisto incluye todos los organismos que no tienen algún desarrollo extensivo de tejido, esto es, sistemas de tipos de células distintivas para realizar diferentes funciones. Los protistos incluyen organismos unicelulares y microscópicos, así como también pluricelulares, estando conformado por algas, hongos, protozoarios y bacterias. Los protistos se subdividen en protistos superiores e inferiores (bacterias y algas verde azuladas).

En las células de todos los organismos, excepto en las bacterias y algas verdeazuladas, el núcleo está rodeado durante la mayor parte de la vida de la célula, por una membrana. Esta membrana no se encuentra en los protistos inferiores; en estos organismos, el núcleo está simplemente metido en el citoplasma. Las bacterias y las algas verde azuladas son todas microscópicas.

### **2.1.2. La célula bacteriana.**

Casi la única función de la célula bacteriana es producir otra célula. Todo lo que hace un bacterio es crecer. No produce

células de diferentes tipos, ni realiza mucho trabajo mecánico; no produce semillas ni flores, ni camina ni habla.

### **Formas de las bacterias.**

Hay tres formas de células entre los bacterios verdaderos: bastones, esferas y hélices. La forma de bastón es probablemente la más común. Los bastones pueden tener extremos redondeados o romos; algunos son tan cortos que casi no se distinguen de una esfera y otros son muy largos y angostos. Las bacterias esféricas se llaman cocos. Los cocos frecuentemente se presentan en cadenas o racimos; estos racimos pueden ser de tamaño variable y forma irregular o en algunos casos, paquetes de formas muy regulares. Las formas helicoidales se llaman vibriones o espirilos. Un espirilo tiene más de una vuelta de hélice; un vibrión tiene menos de una vuelta completa y superficialmente parece un bastón romo.

Las formas y tamaños de un bacterio particular pueden variar dentro de límites más bien amplios, en medios ambientes diferentes. Aunque la mayoría de las células procariotas son pequeñas, existe una gran variación de tamaños entre los

diferentes organismos. Las células procariotas más pequeñas pertenecen al grupo de los micoplasmas y son demasiado pequeñas para verse con el microscopio óptico. Las mayores células procarióticas las cianofíceas, tienen un diámetro que es de más de 500 veces el de micoplasma y casi podrían observarse a simple vista.

La medición de la longitud de un objeto microscópico es en esencia lo mismo que la medición de cualquier otro objeto; éste se coloca al lado de una regla de longitud conocida leyéndose directamente su dimensión. La regla utilizada en microscopía es el micrómetro ocular, un pequeño disco de vidrio con una regla grabada. Las líneas del micrómetro ocular serán equivalentes a micrómetros (micras) o a partes de micrómetro. El tamaño se mide ahora moviendo la célula de tal modo que quede ópticamente al lado de la regla del ocular, leyéndose su tamaño directamente. En las células esféricas sólo se necesita medir el diámetro, pero en las que no lo son, debe medirse tanto la longitud como el ancho.

**La reacción de Gram.**

Uno de los caracteres citológicos más importantes de los bacterios es su reacción ante un procedimiento de coloración simple llamado, en homenaje a su descubridor, la coloración de Gram. Este procedimiento consiste en colorear las células con el colorante cristal violeta; todos los bacterios tomarán el color azul. Los bacterios son seguidamente tratados con una solución de yodo y luego decolorados con alcohol.; las bacterias Gram positivas (ó Gram(+)) retienen el cristal violeta; los bacterios Gram negativos (ó Gram(-)), son decolorados. La base química de esta reacción diferencial no está bien entendida y el procedimiento parece ser totalmente arbitrario. Sin embargo, la división de bacterios en las formas Gram (+) y Gram (-) se correlaciona sorprendentemente bien con muchas otras características. Por ejemplo, todos los bacterios que forman esporas son Gram positivos; todas las formas con flagelos en los polos son Gram negativos. Las Gram (-) poseen pared celular delgada, en tanto que las Gram (+) presentan paredes gruesas.

## **Flagelos Bacterianos**

Muchas bacterias pueden nadar valiéndose de pequeños apéndices en forma de látigos llamados flagelos. Los flagelos de los bacterios móviles están distribuidos sobre la superficie de la célula en formas características: pueden estar restringidos a uno o ambos extremos de la célula (flagelos polares), o pueden encontrarse sobre toda la superficie celular (flagelos peritricos). La duración de los movimientos de avance en relación a los de giro, está asociada a receptores presentes en la membrana bacteriana; estas variaciones permiten a la bacteria acercarse a determinadas sustancias, como partículas alimenticias, y alejarse de aquellas condiciones ambientales adversas. En algunas bacterias acuáticas, que contienen partículas ricas en hierro, el movimiento se orienta según el campo magnético.

Los cocos, al ser redondos, se distorsionan menos y por tanto resultan más resistentes a la desecación que los bacilos o los espirilos. Los bacilos por otra parte, tienen expuesta más superficie por unidad de volumen que por tanto pueden tomar más rápidamente nutrientes de las soluciones diluidas. Las



formas espirales son habitualmente móviles, y se desplazan por un movimiento de sacacorchos, lo que significa que encuentran menos resistencia por parte del agua que las rodea que los bacilos móviles.

### **Las Endosporas.**

Muchos otros microorganismos producen tipos de células resistentes que pueden mantenerse vivas bajo condiciones que matarían a las células vegetativas. Ninguna de estas es el equivalente de la espora bacteriana que resiste condiciones extremas, tanto químicas como físicas.

Algunas endosporas pueden germinar aún después de varias horas de inmersión en agua hirviendo.

Una endospora tiene una apariencia muy característica cuando se examina al microscopio. A causa de su bajo contenido de agua, es muy densa y altamente refractaria.

Con sólo unas pocas excepciones, las esporas están restringidas a dos géneros de bacterias en forma de bastón: bacillus y clostridium. Estos géneros se distinguen por una

condición fisiológica: los clostridios son estrictamente anaeróbicos, mientras que los bacilos son aerobios.

La germinación de una espora tiene lugar cuando se coloca en un medio ambiente adecuado.

### **Arquitectura molecular de una célula bacteriana**

Como en todos los seres vivos el agua constituye el grueso de una célula bacteriana: del 70 al 80 % del peso de una célula es agua. Un bacterio típico pesa  $5 \times 10^{-6}$  ug y tiene una masa seca de más o menos  $1 \times 10^{-6}$ . ¿Cuál es la composición química de este trillonésimo de un gramo? Su composición no es extraordinaria: los elementos comunes carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, junto con menores cantidades de fósforo y azufre, comprenden por lo menos el 99 % de la masa seca total. Hay cantidades más pequeñas de hierro, potasio, magnesio y algunos otros elementos. Ver TABLA I.

**TABLA I. Composición de una bacteria típica.**

ELEMENTO	PESO SECO (%)
Carbono	50
Oxígeno	20
Nitrógeno	15
Hidrógeno	08
Azufre	03
Fósforo	01

Fuente: **JUNAC, 1989**

### **Estructura del flagelo bacteriano**

Un flagelo bacteriano típico mide más o menos 120 Å (unidades Angstrom) de grueso y tal vez 4 ó 5 micrones de largo. El flagelo está adherido a un pequeño granulo basal en el interior de la célula y emerge a través de la pared celular. El flagelo es de origen citoplasmático y no es un apéndice de la pared celular. Es de forma helicoidal, con radio y paso constantes para un tipo de bacterio dado.

Los flagelos conducen el bacterio hacia adelante de un modo muy similar al de una hélice que impulsa a un barco. Sin

embargo, a diferencia de un propulsor de un barco, los flagelos no giran; en lugar de esto, olas, en forma de tornillo, se mueven por debajo de ellos, en la misma forma en que pasaría una ola debajo de una cuerda atada en un extremo y hecha girar en el otro.

### **La pared celular y la membrana celular**

Analicemos primeramente el concepto de ósmosis. Consideremos una solución de sacarosa en agua. Tanto las moléculas de agua como de sacarosa se mueven violentamente y al azar por toda la solución. Si la molécula se coloca en un saco a través del cual el agua puede pasar pero no la sacarosa (se dice que el saco es permeable al agua pero impermeable a la sacarosa) y el saco es colocado en agua pura, ¿qué pasará? Las moléculas de agua van a pasar a través del saco en ambas direcciones, pero en promedio van a ser más las que entran que las que salen. Esto es porque para un número total dado de moléculas, hay menos moléculas de agua dentro del saco que afuera, puesto que algunas moléculas de adentro son de sacarosa. En un saco cerrado lleno, la solución estará bajo una presión; está es llamada

presión osmótica y es una medida de la tendencia del agua a pasar dentro del saco. Si el saco es elástico, se hinchará y eventualmente reventará si la presión osmótica se hace mayor que la resistencia mecánica del saco. Por el contrario, si un saco lleno de agua pura es colocado en una solución de sacarosa, se encogerá a medida que el agua fluye hacia afuera.

La misma clase de comportamiento se observa en bacterias bajo circunstancias similares. Así, si una célula bacteriana se coloca en una solución muy concentrada de sacarosa, se verá que el contenido de la célula (el protoplasma) se encoge, pero la envoltura limitante por afuera no se encoge, es rígida. Esto demuestra dos propiedades importantes de la superficie de la célula bacteriana:

- Hay una membrana semi-permeable alrededor de la célula, puesto que el contenido de la célula responde a un cambio en la presión osmótica del medio de cultivo.
- En el exterior de la membrana hay una pared celular rígida. Una idea de la rigidez de esta pared se puede obtener

considerando la presión osmótica ejercida contra la pared cuando un bacterio se coloca en agua (procedimiento que generalmente no causa mayor daño o cambio visible). Se sabe que la presión osmótica es aproximadamente 20 atmósferas. La membrana responsable del comportamiento osmótico se llama membrana plasmática y la estructura rígida que resiste la presión osmótica, pared celular.

### **Estructura de la pared celular bacteriana**

Bajo el análisis anterior, cabe preguntarse ¿cuál es la naturaleza química y estructura de esta pared celular rígida?

La pared celular de un bacterio es fácilmente vista en el microscopio electrónico. Generalmente aparece como una envoltura de 50-100 Å de grueso.

Los polisacáridos constituyen una gran parte de la pared celular. Están compuestos de un número de diferentes azúcares simples, tal como glucosa, galactosa y manosa. Los azúcares que se encuentren dependen del tipo de bacterio. En muchos casos se presentan amino-azúcares en lugar de los correspondientes azúcares simples. La diferencia entre estos

puede verse comparando las estructuras de la galactosa y la galactosamina.

Un componente de los polisacáridos de las paredes de las células bacterianas, presente casi universalmente, es el compuesto ácido murámico, el que está relacionado con la galactosamina.

La pared de los bacterios contiene sólo trazas de lípidos, mientras que la pared de las Gram (+) pueden contener hasta 20.% de lípidos. La pared tiene una amplia variedad de aminoácidos; ciertamente, todos los aminoácidos que se presentan en las proteínas se encuentran en las paredes celulares de los bacterios Gram (-). La pared de los Gram (+) por el contrario, se caracterizan por la sorprendente simplicidad de la composición de aminoácidos. El ácido glutámico y la alanina generalmente se presentan en grandes cantidades, acompañadas de uno o dos aminoácidos distintos en menores cantidades, los cuales varían con los diferentes bacterios. El ácido diaminopimélico es un aminoácido que se presenta en las paredes de bacterios, tanto Gram (+) como

Gram (-). Este último se encuentra sólo en los protistos más bajos.

### **La membrana plasmática**

Esta contiene grandes cantidades de fosfolípidos junto con proteínas y algunos polisacáridos. Por lo que muestra una microfotografía electrónica, no parece tener más de 20-40 Å de grueso, indicando así que sus moléculas de proteínas están ordenadas en una sola capa.

Las enzimas respiratorias de la célula están asociadas con ella. En el estudio de la estructura de células de otros organismos, aprendimos que las enzimas respiratorias están limitadas a los organelos llamados mitocondrios, que no aparecen a nivel de bacterias. Los bacterias que tienen más o menos el mismo tamaño que los mitocondrios no necesitan “micromitocondrios” dentro de ellos.

### **El citoplasma y el núcleo**



El hecho de que la célula bacteriana posea una estructura simple no significa que la complejidad de las células de organismos más elevados es esencial para el crecimiento. Se conoce muy poco en lo que concierne a la división de la región nuclear bacteriana; en apariencia simplemente se estrangula hasta dividirse en dos mitades.

El espacio comprendido entre la región nuclear y la membrana plasmática está lleno con un citoplasma uniforme y granulado. Inmersos en él, se observan innumerables partículas muy pequeñas, llamadas ribosomas, los que miden aproximadamente 11 A de diámetro. Los ribosomas de los bacterios están aparentemente libres en el citoplasma y no están asociados con ningún componente de la membrana como lo están a menudo en otras células. Los ribosomas están compuestos de más o menos la misma cantidad de proteínas y ácido ribonucleico. El ARN de los ribosomas representa del 80 al 85 % de todo el ARN de la célula. El 15 a 20 % restante está disuelto en el citoplasma. Este corresponde al ARN soluble. La proteína de los ribosomas es parte del aparato encargado de

hacer otras proteínas. Una gran cantidad de evidencia sugiere que los ribosomas son el asiento de la síntesis de proteínas.

### **Mecánica de la división celular**

Los bacterios se reproducen dividiéndose por la mitad; la división es perpendicular al eje más largo de la célula en los bastones y espirilos. Este proceso es llamado fisión binaria simple. La división del citoplasma se realiza en varias etapas. Primero, es tendida una membrana plasmática transversa. Esta membrana es luego separada en la mitad por el crecimiento centrípeto de la pared celular. Muy a menudo esta pared celular transversa permanecerá incompleta, con las dos células hijas conectadas en la membrana transversa. Las dos células hijas pueden permanecer juntas y la división continua conduce a una cadena o racimo de células. En los bacterios esféricos (cocos) los planos de división sucesiva pueden ser paralelos produciendo cadenas, o perpendiculares unos con otros, produciendo láminas o paquetes de células.

## **Metabolismo energético**

Al igual que cualquier organismo, un bacterio existe sólo para hacer una copia de sí mismo; en otras palabras, una célula bacteriana es una unidad “auto-duplicante”. Si analizamos el significado de éste término, vemos que en realidad abarca dos ideas. En primer lugar, está la noción de un aumento en el número de una clase específica de unidad. Esto naturalmente, es lo que significa duplicación en cualquier contexto. Cuando llegamos a la idea de autoduplicación, es cuando nos acercamos a problemas biológicos peculiares.

¿Por qué necesita energía una célula simplemente para crecer? Cuando está creciendo la célula, no se mueve, no levanta peso, etc. En efecto, no está realizando ninguna de las cosas que uno puede intuitivamente asociar con trabajo. Una célula en crecimiento necesita energía porque está haciendo orden a partir de desorden; está haciendo la compleja y altamente ordenada estructura de una célula a partir del desorden del medio ambiente. “Debe gastarse energía para formar un sistema ordenado”.

La clase de orden que hace una célula para duplicarse a sí misma, es de naturaleza química.

Los componentes macromoleculares de la célula (proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos) son moléculas ordenadas de manera muy precisa y son asimismo parte de una estructura ordenada.

Además, los elementos básicos que contienen estas grandes moléculas deben ser fabricados por la célula u obtenidos ya hechos del medio ambiente. Estos procesos necesitan el gasto de energía química.

Durante el crecimiento de una célula podemos distinguir dos metabolismos, sobre la base de sus funciones. Uno es biosintético, e incluye todas las reacciones por las cuales el material del medio ambiente es transformado en sustancias básicas y componentes macromoleculares específicos de la célula. El segundo metabolismo, suministra la energía consumida en el primero. No debe suponerse que estos dos metabolismos están realmente separados. Por el contrario, muchas reacciones y productos intermedios son comunes a

ambos. De ese modo, las funciones son separables, pero los mecanismos están estrechamente ligados.

El eslabón entre las reacciones que consumen energía y las que la proveen, está representado por el Adenosín Trifosfato (ATP). Las funciones de todos estos importantes compuestos, se describen más adelante. La formación de ATP es el mecanismo por el cual puede capturarse la energía disponible de cualquier reacción metabólica, y desviarla para conducir, cualquier reacción que necesite energía. Brevemente, la manera como trabaja el ATP es como sigue: la formación del ATP a partir de Adenosin Difosfato y Acido Fosfórico es una reacción endogónica; esto es, consume energía. Esta reacción puede continuar sólo si está acoplada a una reacción exogónica, o productora de energía. En esta forma, la energía de varias reacciones exogónicas, que de otra manera sólo producen calor, es capturada en un sólo compuesto. La energía almacenada en el ATP puede ser usada para dirigir la multitud de reacciones endogónicas biosintéticas necesarias para el crecimiento. En el transcurso de su evolución, los bacterios han desarrollado una enorme variedad de

matabolismos energéticos. El propósito de todos estos es suministrar a la célula energía en forma de ATP.

### **Las oxidaciones como fuente de energía**

En esencia sólo dos fuentes de energía están disponibles para los seres vivos: luz solar y oxidación química. Los organismos que usan la luz solar se denominan FOTOTROFOS; los que utilizan energía química se llaman QUIMOTROFOS. Los bacterios fototrópicos serán tratados más adelante.

Hagamos algunos comentarios breves para considerar los rasgos más destacados de las reacciones óxido-reducción. La oxidación es la pérdida de electrones de un átomo o molécula; reducción es la adición de electrones. La oxidación del hierro es un ejemplo de la clase más simple de oxidación en la que un sólo electrón se elimina:



La oxidación de compuestos orgánicos, especialmente los de importancia biológica, lo más frecuentemente es que involucra no sólo la pérdida de electrones libres sino de átomos de hidrógeno, generalmente en pares. Esto se denomina deshidrogenación. La oxidación del ácido succínico en ácido fumárico es un ejemplo.

Ni los electrones ni los átomos de hidrógeno pueden acumularse como tales; por eso, cada oxidación es acompañada por una reducción. De esta manera, la oxidación del ácido succínico recién ilustrada, no puede producirse a menos que esté presente otro compuesto que pueda aceptar los átomos de hidrógeno. El aceptor de hidrógeno es así reducido. Cualquier oxidación puede representarse por la reacción general:



Y una reducción por:



La suma de las dos reacciones representa la oxidación de  $\text{AH}_2$  por B:



En esta reacción  $\text{AH}_2$  es el reductor (o donador de hidrógeno) y B es el oxidante (o aceptor de hidrógeno).

Todas las reacciones que producen energía en los bacterios quimiotróficos son óxido-reducciones, e implican la transferencia de átomos de hidrógeno (o electrones) de un compuesto a otro.

La máxima cantidad de energía que la célula puede obtener de la transferencia de átomos de hidrógeno de un compuesto a otro, no puede exceder de la cantidad de energía liberada cuando la misma transferencia se produce en el exterior de la célula viva.

Una reacción particular, para que sea usada por un organismo como fuente de energía, debe involucrar la presencia en el medio ambiente, de un oxidante y un reductor en cantidades suficientemente grandes. Hay en efecto, un gran número de estas reacciones, y es destacable que los bacterios



como grupo, han desarrollado mecanismos para hacer uso de casi todas ellas como fuentes de energía.

Las oxidaciones productoras de energía de los bacterios pueden ser clasificadas de acuerdo a la naturaleza orgánica o inorgánica del oxidante y del reductor.

Litótrofo, que sólo se encuentran en los bacterios, son organismos que obtienen su energía de la oxidación de reductores inorgánicos, tales como azufre y hierro, por acción de oxidantes inorgánicos. Los organotrofos, en contraste, oxidan donadores orgánicos de hidrógeno, usando tanto oxidantes orgánicos como inorgánicos. Todos los animales, los hongos y la mayoría de las bacterias son organótrofos.

Definiremos la respiración como cualquier oxidación productora de energía, en la cual el oxidante es un compuesto inorgánico; el oxígeno no necesita estar implicado. De manera similar, la fermentación es definida como cualquier oxidación productora de energía en la cual el oxidante es orgánico.

## Respiración

La respiración es una reacción de óxido-reducción productora de energía, en la cual el oxidante es inorgánico. En el curso de su evolución, los bacterios han desarrollado una amplia variedad de diferentes clases de respiración que pueden ser caracterizadas sobre la base de la naturaleza del reductor y el oxidante. Ver TABLA II

TABLA II. Reductores y Oxidantes en Respiraciones Bacterianas

REDUCTOR	OXIDANTE	PRODUCTOS	ORGANISMOS
H <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	bacterios del hidrógeno
H <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	H <sub>2</sub> O + S <sup>=</sup>	desulfovibrio
Compuestos Orgánicos	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	muchos bacterios, todas las plantas y animales
NH <sub>3</sub>	O <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	bacterios nitrificantes
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	O <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	bacterios nitrificantes
Compuestos Orgánicos	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>2</sub> + N <sub>2</sub>	bacterios denitrificantes
Fe <sup>2+</sup>	O <sub>2</sub>	Fe <sup>3+</sup>	ferrobacillus
S <sup>=</sup>	O <sub>2</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup> + H <sub>2</sub> O	thiobacillus

Fuente: JUNAC, 1989

### **Respiración Aeróbica con reductores orgánicos**

Corresponde a la oxidación de compuestos orgánicos por el oxígeno, o más brevemente, respiración aeróbica.

La respiración celular abarca dos fases diferentes. La primera incluye reacciones por las cuales el substrato es oxidado a  $\text{CO}_2$  con eliminación sucesiva de pares de átomos de hidrógeno. La serie de reacciones conocidas como el CICLO DE KREBS, juegan un rol indispensable en esta fase. La segunda fase es la oxidación de estos átomos de hidrógeno por oxígeno, con formación de ATP. Las dos fases conducen la oxidación del substrato a  $\text{CO}_2$  y agua, y a la formación de energía biológicamente útil (ATP).

La mayoría del ATP es producido durante la transferencia de los átomos de hidrógeno del substrato del oxígeno. Los átomos de hidrógeno provienen de las deshidrogenaciones del ciclo de Krebs; y además la secuencia de las reacciones por las cuales se forman ciclos de Krebs intermedios a partir de diferentes substratos, generalmente incluyen dos hidrogenaciones. Tres moléculas de ATP se forman por cada par de átomos de hidrógeno oxidado.

### **Respiración Anaeróbica**

Los bacterios del género *Desulfovibrio* oxidan compuestos orgánicos usando sulfato como oxidante, siendo el sulfato reducido a sulfuro. Los reductores del sulfato no pueden usar oxígeno. El nitrato se usa como oxidante en la respiración, por muchos bacterios. Los bacterios denominados denitrificantes, también pueden usar oxígeno como oxidante. Estos bacterios reducen nitrato sólo en ausencia de oxígeno. El nitrato es reducido a gas nitrógeno o amoníaco u óxido nitroso, dependiendo del bacterio.

### **Respiración con reductores inorgánicos**

Los organismos litotróficos se distinguen de los organotrofos, por su capacidad de obtener todo su carbono celular a partir del  $\text{CO}_2$ . Los organismos que pueden crecer en ausencia de cualquier carbono orgánico, se llaman autotróficos.

### **Oxidación del hidrógeno**

La oxidación del hidrógeno gaseoso es empleada por un grupo de bacterias conocidos como bacterias del hidrógeno. Su respiración está representada por:



En contraste con otras bacterias litotróficas, las bacterias de hidrógeno son también capaces de respirar compuestos orgánicos.

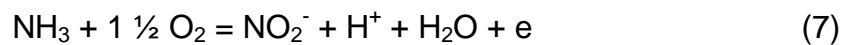
La oxidación clave en la respiración del hidrógeno es la activación del hidrógeno. En esta reacción una molécula de hidrógeno es desdoblada para dar dos átomos de hidrógeno:



Esta reacción que no es peculiar en las bacterias del hidrógeno, se encuentra en muchas bacterias autotróficas. La oxidación de los átomos del hidrógeno; así formados es esencialmente la misma que en la respiración de compuestos orgánicos.

### **Bacterios Nitrificantes**

La oxidación del amoníaco a nitrato es un paso importante en la economía del nitrógeno en la naturaleza. Este proceso de nitrificación ocurre en dos pasos, cada uno realizado por un grupo de bacterias muy especializados. El primer paso es la oxidación del amoníaco a nitrito:



Los bacterias del género nitrosoma pueden usar esta oxidación como su única fuente de energía; el CO<sub>2</sub> sirve como fuente de carbono. Estos bacterias son incapaces de cualquier otra forma de crecimiento.

La segunda etapa en la nitrificación es la oxidación de nitrito a nitrato:



Aquí los agentes importantes incluyen en el género nitrobacter; la oxidación del nitrito es la única fuente de energía que estos bacterios pueden usar.

### **Bacterios del Azufre**

La oxidación de los compuestos del azufre reducido, es la fuente de energía para varios bacterios. Una de éstas, el Thiobacillus Thiooxidans, oxida azufre elemental a ácido sulfúrico.



Este organismo es único por su capacidad de crecer en medios ambientes extremadamente ácidos, como por cierto debe ser, si se hace uso de la formación de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como una fuente de energía.

Otro grupo de bacterios oxidantes de azufre está estrechamente relacionado morfológicamente con las algas

verde-azuladas. Este grupo incluye las Beggiatoa, que oxidan hidrógeno sulfurado a azufre elemental:



Los largos filamentos de la Beggiatoa se atestan de diminutos gránulos de azufre, que dan un aspecto muy característico bajo el microscopio.

### **Bacterios del hierro**

El último ejemplo de metabolismo litotrófico, es tal vez el más interesante de todos; es la oxidación del hierro llevada a cabo por Ferrobacillus. La oxidación productora de energía es:



El hierro férrico es depositado como hidróxido férrico insoluble. Algunos otros bacterios oxidan hierro con formación de hidróxido férrico, pero no es seguro si estos pueden usar la oxidación como fuente de energía.



No se conoce bastante acerca del transporte de hidrógeno y formación de ATP en los litótrofos. Sin embargo, es muy probable que aquí también, los pigmentos citocromas desempeñen un rol central.

### **Thiobacillus Ferrooxidans:**

Bacteria típica con forma de bastoncillo, tiene un tamaño de célula de 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1,0 a 1,7  $\mu\text{m}$  de longitud. Sus fuentes de energía son el hierro ferroso y el azufre reducido; oxida prácticamente todos los minerales sulfurados conocidos. Crece en un intervalo de pH de 1,0 a 6,0 siendo el pH óptimo para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento entre 2,0 y 2,5. De modo análogo, sobrevive en un intervalo de temperatura de 2 a 40 C, pero el más favorable es el intervalo de 28 a 35 C. Curiosamente, mientras el T. Ferrooxidans crece en un medio de bajo pH, su pH citoplasmático interno está próximo al punto neutro y el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática del T. Ferrooxidans es uno de los mayores de todos los organismos vivientes.

El *T. Ferrooxidans* prolifera, en cuestión de horas, dividiéndose en dos bastoncillos idénticos. Estos, a su vez, aumentan de tamaño y vuelven a dividirse y así continúa la proliferación en forma exponencial. Normalmente, en un sistema en actividad, las poblaciones bacterianas alcanzan cifras de  $10^9$  a  $10^{10}$  por mililitro de pulpa. Sin embargo, incluso con esta elevada densidad no hay pruebas de su presencia a simple vista.

Generalmente estas bacterias trabajan en ambientes de calor y acidez tan hostiles que no se produce contaminación por otros organismos.

### **2.1.3. Genética bacterial**

El material genético de la célula bacteriana está formado por una hebra doble de ADN circular. Muchas bacterias poseen también pequeños ADNs circulares llamados plásmidos, que llevan información genética pero, la mayoría de las veces, no resultan esenciales en la reproducción. Muchos de estos plásmidos pueden transferirse de una bacteria a otra mediante un mecanismo de intercambio genético denominado

conjugación. Otros mecanismos por los cuales la bacteria puede intercambiar información genética son la transducción, en la que se transfiere ADN por virus bacterianos, y la transformación, en la que el ADN pasa al interior de la célula bacteriana directamente desde el medio. Las células bacterianas se dividen por fisión; el material genético se duplica y la bacteria alargada se estrecha por la mitad y tiene lugar la división completa, formándose dos células hijas idénticas a la célula madre. Así, al igual que ocurre en los organismos superiores, una especie de bacteria origina al reproducirse sólo células de la misma especie. Algunas bacterias se dividen cada cierto tiempo (entre 20 y 40 minutos). En condiciones favorables, si se dividen una vez cada 30 minutos, transcurridas 15 horas, una sola célula, habrá dado lugar a unos mil millones de descendientes. Estas agrupaciones, llamadas colonias, son observables a simple vista. En condiciones adversas, algunas bacterias pueden formar esporas, que son formas en estado latente de la célula que permiten a ésta resistir las condiciones extremas de temperatura y humedad.

#### **2.1.4. La influencia del oxígeno sobre el crecimiento de las bacterias.**

El tipo de metabolismo energético que un bacterio posee, determina en gran medida el medio en el cual puede vivir. Desde el punto de vista del metabolismo energético, el factor individual más importante en el medio ambiente, es la presencia o ausencia de oxígeno. Por su respuesta a la presencia de oxígeno, los bacterios caen dentro de tres grupos: aerobios obligados, anaerobios obligados y anaerobios facultativos.

Los aerobios obligados, sólo pueden crecer en presencia de oxígeno. El oxígeno es necesario para estos bacterios porque la respiración aeróbica es la única clase de metabolismo energético que poseen.

Los anaerobios obligados, sólo pueden crecer en ausencia de oxígeno. El crecimiento de estos organismos es inhibido por el oxígeno; ciertamente, algunos de ellos son tan sensibles a la presencia de oxígeno, que una breve exposición de aire los mata. La base para esta sensibilidad al oxígeno no está totalmente clara; pero puede explicarse por lo menos en

parte, por la destrucción por oxidación de ciertas enzimas indispensables. Es obvio que los anaerobios obligados deben ser capaces de obtener energía a partir de procesos que no requieren oxígeno, tales como la fermentación o la respiración anaeróbica.

Los anaerobios facultativos, pueden crecer sea en presencia o ausencia de oxígeno. Los anaerobios facultativos incluyen tres clases de bacterios con fisiologías muy diferentes. La primera clase incluye los bacterios que tienen un metabolismo energético puramente fermentativo; y por lo tanto son indiferentes al oxígeno. El segundo tipo de anaerobios facultativos son los bacterios denitrificantes. La tercera clase de bacterios y la más grande, incluye los bacterios y hongos que obtienen energía para el crecimiento sea por fermentación o respiración aeróbica.

#### **2.1.5. El crecimiento de las poblaciones de bacterias**

El crecimiento se define como un aumento de la masa de los bacterios por unidad de volumen del medio, acompañada generalmente de un aumento en el número de células. Todos

los constituyentes de la masa bacteriana deben provenir del medio.

Es característico del crecimiento de unidades que se autoduplican, que en un medio ambiente constante y después de un período inicial de adaptación, la proporción de crecimiento específico tienda a hacerse constante.

El aumento en la masa de cualquier sistema de autoduplicación, es autocatalítico. En otras palabras el grado de aumento de nuevos bacterios es proporcional a la masa de nuevos bacterios (puede señalarse que no todos los procesos autocatalíticos son de duplicación; un buen ejemplo, es una reacción explosiva en cadena). Este concepto puede expresarse en términos que son tal vez más familiares. La tasa de nacimiento de una población humana, esto es, la rapidez de formación de nuevos individuos, es proporcional al número de individuos en la población. Por ejemplo, si en una ciudad de 1 millón de habitantes la tasa de nacimiento es de 10 000 por año, entonces la tasa específica de nacimientos es de 10 000 por año por millón o  $1/10.000$  por año. En forma similar

podemos definir la proporción de crecimiento específico de una población bacteriana. Si la proporción total de síntesis de nuevo material celular en cualquier momento es, digamos, 100 ug por ml por minuto (100 ug = diez milésimas de un gramo) y si la masa total en ese tiempo es 1000 ug por ml, entonces la proporción de crecimiento específico es de 100 ug por ml por minuto dividida por 1000 ug por ml o 0,1 por minuto. Naturalmente podríamos haber expresado el crecimiento en términos de número de células; la proporción del crecimiento hubiera sido la misma. Usaremos el símbolo  $\mu$  para denotar la proporción de crecimiento específico. Obsérvese (y pondérese) que está dado en unidades de tiempo recíproco, por ejemplo, por hora o por minuto.

Durante el período de adaptación la proporción de crecimiento específico está aumentando. Cuando esta proporción es constante, la velocidad con que se está formando nuevo material celular en cualquier momento, es simplemente la masa de material celular presente multiplicada por la proporción de crecimiento específico. Esto se deduce obviamente de la definición de proporción de crecimiento

específico;  $\alpha$  = proporción total de aumento por unidad de masa de material celular. En otras palabras, la población aumentará según un factor constante, en iguales intervalos de tiempo. Este factor es simplemente la proporción de crecimiento específico multiplicado por la longitud del intervalo de tiempo (debe tenerse cuidado de emplear las mismas unidades de tiempo). Si inicialmente la masa bacteriana es  $B_0$ , entonces después de un intervalo de tiempo, la masa será  $B_0\alpha t = B_1$ . Después de un segundo intervalo igual, será  $B_1 \alpha t = B_2$ ; en términos de masa inicial,  $B_2 = B_0\alpha t \alpha t = B_0 (\alpha t)^2$ . De igual modo, después del tercer intervalo,  $B_3 = B_0 (\alpha t)^3$  y así sucesivamente. Al considerar el crecimiento de un sistema que se autoduplica es razonable tomar como intervalo de unidad de tiempo, el tiempo que requiere la masa para duplicarse, o en otras palabras, el tiempo que necesita el sistema para autoduplicarse una vez. Este tiempo es llamado el tiempo de duplicación de la masa. Si nosotros usamos el tiempo de duplicación como nuestra unidad de tiempo, el factor de aumento  $\alpha t$ , es claramente 2. Por lo tanto, las simples ecuaciones desarrolladas arriba se hacen  $B_1 = B_0 \times 2$ ,  $B_2 = B_0 \times 2^2$  y  $B_3 = B_0 \times 2^3$ . Ahora, la potencia a la cual debe ser elevado



el número dos para igualar cualquier número, es llamado el logaritmo en base 2 de ese número (Si  $x = 2^y$  entonces  $\log_2 x = y$ ). Nuestras ecuaciones pueden ser expresadas en forma logarítmica como sigue:  $\log_2 B_1 = 1 + \log_2 B_0$ ,  $\log_2 B_2 = 2 + \log_2 B_0$  y  $\log_2 B_3 = 3 + \log_2 B_0$ . Después de cualquier número N de duplicaciones, podemos calcular la masa bacteriana por la fórmula:  $\log_2 B_N = N + \log_2 B_0$ . Si el logaritmo de la base 2 de la masa bacteriana es graficado contra el tiempo (todavía expresado en unidades de tiempo de duplicación) veríamos claramente que resultaría una línea recta. Una mirada a esta gráfica aclarará los puntos que siguen. Es obvio que la pendiente de la recta es igual al incremento por unidad de tiempo del logaritmo de la masa bacteriana. Si el tiempo está en unidades de tiempo de duplicación y se usa logaritmo base 2, la pendiente será la unidad, puesto que la masa se duplica en una unidad de tiempo. La pendiente de la recta es sólo otra forma de expresar la constante de proporcionalidad de crecimiento específico  $\alpha$ , en términos de duplicación por unidad de tiempo. Si se usan minutos como unidad de tiempo, entonces la pendiente de esta recta es claramente 0,01 y  $\alpha$  es 0,01 duplicaciones por minuto.

La aritmética es un poco menos evidente si se usan logaritmo base 10. Una duplicación de la masa incrementa el logaritmo en sólo 0,3 esto es,  $\log_{10} 2$  y ésta es la pendiente de la recta con el tiempo expresado en unidades de tiempo de duplicación. La pendiente es evidentemente 0,003 cuando el tiempo es dado en minutos. Estas pendientes dan el valor de  $\alpha$  en las ecuaciones cuando se usan logaritmos comunes:

$$\log_{10} B_N = \alpha t + \log_{10} B_0 \quad (12)$$

Es fácil obtener el valor de  $\alpha$  en duplicaciones por unidad de tiempo dividiendo por  $\log_{10} 2$ , que es 0,3.

En general, si la proporción de crecimiento específico es constante, el logaritmo (en cualquier base) de la masa bacteriana se incrementará linealmente con el tiempo. La pendiente de esta recta es igual a  $\alpha$ , y el valor numérico de  $\alpha$  depende de la unidad de tiempo usada y de la base del logaritmo.

La proporción de incremento de la masa bacteriana, está dada por:

$$dB/dt = \alpha B \quad (13)$$

Si  $\alpha$  es constante, la ecuación puede integrarse para dar:

$$B_t = B_0 \exp(\alpha t) \quad (14)$$

En forma logarítmica:

$$\ln B_t = \ln B_0 + \alpha t \quad (15)$$

Se ha dicho que la proporción de crecimiento específico puede permanecer constante sólo en un medio ambiente que no cambie; pensando un poco se ve que esta condición no se puede cumplir nunca en la naturaleza. El medio ambiente se va transformando, por el crecimiento en bacterias; cualquier medio ambiente limitado debe cambiar, y cambia más rápidamente cuanto más crecimiento se realiza. Puede esperarse por lo tanto, que la proporción de crecimiento específico comenzará eventualmente a declinar y que finalmente el crecimiento cesará, ya sea porque se han acumulado productos tóxicos o porque el medio de cultivo se ha agotado.

## **LA CURVA DE CRECIMIENTO**

Veamos que sucede cuando se le inocula a una cierta cantidad de medio ambiente de cultivo, una cantidad conocida de bacterios y es luego incubada bajo condiciones físicas constantes.

Al principio, hay un período durante el cual se realiza poco crecimiento o ninguno. Este se llama la fase estacionaria. Tarde o temprano los bacterios empiezan a aumentar, al principio lentamente pero con una proporción de crecimiento específico en aumento, la que eventualmente se vuelve constante. La fase estacionaria y el período de proporción de crecimiento específico en aumento representa un tiempo de adaptación de las células al nuevo medio ambiente. Durante la fase estacionaria la masa celular generalmente, aumenta algo, mientras que el número de células permanece constante; en otras palabras las células se hacen más grandes. La duración de esta fase es extremadamente variable.

La fase siguiente se caracteriza por una proporción de crecimiento específico. Esta se llama la fase de crecimiento

exponencial o logarítmico. El valor de la constante de crecimiento específico depende, tanto del bacterio como del medio de cultivo; es una constante sólo para un bacterio particular creciendo bajo un conjunto de condiciones particulares. Entre la fase estacionaria y la exponencial hay un período (generalmente corto) de crecimiento específico en aumento.

Durante el crecimiento exponencial en un medio ambiente constante, las propiedades fisiológicas de los bacterios son constantes. Una de las más importantes de estas propiedades constantes es la proporción de masa a área. Las células se hacen grandes durante la fase estacionaria, alcanzan su tamaño máximo al final de esta fase y permanecen del mismo tamaño durante la fase exponencial.

La división celular no es la causa del crecimiento exponencial. Sin embargo, es necesaria para un crecimiento exponencial continuo, puesto que ésta es la forma en que los bacterios mantienen una proporción constante de masa a área. De igual importancia para un crecimiento exponencial continuo,

es el mantenimiento de una composición celular constante. Esto significa que las cantidades relativas de enzimas, metabolitos y otros constituyentes no cambian durante el crecimiento exponencial. Para denotar esta constancia de características fisiológicas se usa el término crecimiento balanceado.

Si el medio ambiente cambia, el estado fisiológico de las células cambiará. Generalmente este cambio será simplemente una transición a un estado fisiológico constante diferente. Si el cambio en el medio ambiente es tal que la célula no puede alcanzar un nuevo estado de equilibrio, el crecimiento se vuelve permanentemente no balanceado. Si esta condición se prolonga suficientemente las células mueren.

Es imposible que el crecimiento exponencial se prolongue indefinidamente en un volumen finito de medio de cultivo; el medio ambiente debe cambiar y con él la constante de crecimiento. El crecimiento eventualmente se detiene; no hay aumento de masa. El cultivo ha entrado en la fase estacionaria de la curva de crecimiento. La fase estacionaria está precedida por un período de proporción de crecimiento específico en

disminución. En la fase estacionaria la proporcionalidad entre la masa bacteriana y el número celular puede romperse otra vez. Algunos bacterios simplemente dejan de crecer y el número de células vivas permanecen más o menos constante por un tiempo más bien largo, mucho más largo que el tiempo de duplicación de las células en crecimiento. El tamaño de las células, por el contrario, decrecen algo. Algunos bacterios empiezan a morir cuando cesa el crecimiento.

La fase estacionaria no es el resultado de ninguna clase de envejecimiento intrínseco de los bacterios. Este hecho se puede demostrar fácilmente transfiriendo una porción de un cultivo en la fase exponencial de crecimiento a un medio de cultivo fresco; el cultivo diluido continua creciendo exponencialmente. Esto se puede repetir en forma indefinida. Solamente el medio de cultivo envejece, no las células.

El medio de cultivo puede cambiar en dos formas. En primer lugar el metabolismo invariablemente resulta en la excreción de productos de desechos y a medida que éstos se acumulan, el medio de cultivo puede volverse tóxico,

reduciendo de tal modo la proporción de crecimiento; eventualmente el crecimiento se detiene. La segunda forma en que el medio puede cambiar y limitar la cantidad de crecimiento es cuando en el medio de cultivo se agota algún nutriente esencial. Por ejemplo, puesto que el nitrógeno constituye aproximadamente el 10 % de peso seco del bacterio, un medio de cultivo que contiene 100  $\mu\text{g}$  de nitrógeno por ml no puede rendir más de 1000  $\mu\text{g}$  de bacterios por ml. Si el contenido de nitrógeno del medio de cultivo fuese solamente 50  $\mu\text{g}$  por ml, solamente podrían ser producidos 500  $\mu\text{g}$  por ml de bacterias. Una situación similar se tiene con un nutriente que sirve al mismo tiempo como  $\text{CO}_2$  o como fuente de energía.

La concentración de un nutriente limitante debe influir no solamente sobre la cantidad de crecimiento sino también sobre la proporción de crecimiento. La proporción de crecimiento es máxima e independiente de la concentración a lo largo de una amplia escala de concentraciones. Empieza a disminuir solamente cuando la concentración de nutrientes limitantes es muy baja. Generalmente la concentración inicial del nutriente será mucho mayor que aquella a la cual la proporción de



crecimiento empieza a declinar. La proporción de crecimiento no disminuye hasta que casi la cantidad máxima de crecimiento se alcanza. Así, el período de proporción de crecimiento en disminución es muy corto.

### **Ciclo del crecimiento celular**

Hasta ahora la discusión se ha centrado sobre el crecimiento de poblaciones de bacterios, en lugar de hacerlo sobre el crecimiento y división de células individuales. Por lo que aquí respecta, el conocimiento acerca del crecimiento de poblaciones de bacterios es de interés limitado; su valor es en cierto modo el que puede decirnos algo acerca del crecimiento de la célula individual.

Desafortunadamente, el crecimiento de un sólo bacterio no puede estudiarse en detalle por la simple razón de que es demasiado pequeño. Queremos averiguar cuanto tarda una sola célula en dividirse observándola bajo el microscopio, pero esta es la observación más directa que nosotros podemos hacer de ella, el microbiólogo es entonces forzado a usar poblaciones para averiguar acerca de individuos. Claramente hay alguna relación entre la forma en que crece una población

de muchas células similares, pero ésta relación no es necesariamente simple. Por ejemplo, el crecimiento exponencial de una población no implica que el crecimiento de una célula individual sea exponencial.

### **Heterogeneidad de las Poblaciones de Bacterios**

¿Cuánto tarda en duplicar su tamaño y dividirse? Esta pregunta se contesta fácilmente observando células en crecimiento bajo el microscopio.

Se encuentra que las células en una población no tardan lo mismo en dividirse, pero que los tiempos de división están distribuidos alrededor de un promedio en la conocida curva de distribución normal en forma de campana.

El valor del tiempo de división promedio es el mismo para ambas poblaciones, pero la “distribución” de los tiempos de división individual es muy diferente en las dos. Las dos poblaciones tendrían el mismo tiempo de duplicación de la masa (30 minutos) si éste fuese calculado de una curva de crecimiento de acuerdo con la ecuación exponencial. Estudiando la población como un todo podemos averiguar cual

es el tiempo de división promedio, pero no podemos averiguar nada acerca de los tiempos de generación individuales o como están distribuidos éstos.

La heterogeneidad de los tiempos de división explica por qué una población descendiente de una sola célula no crece en forma escalonada. En el desarrollo de una población proveniente de una sola célula, las primeras pocas divisiones son sincrónicas o aproximadamente sincrónicas; ósea que todas las células se dividen más o menos al mismo tiempo. Pero después de unas pocas generaciones, las divisiones comenzarán a estar desfasadas unas con otras. Cuando la población es suficientemente grande para ser estudiada fácilmente, la división es completamente al azar. Así, en cualquier momento todas las etapas del ciclo de la división celular, están representadas en la población.

Durante la fase exponencial, el crecimiento de una población está equilibrado, o en otras palabras, la composición química y las propiedades fisiológicas de la población son constantes.

Sin embargo, puesto que el crecimiento es al azar no puede inferirse que el crecimiento de una célula individual está equilibrado.

## **2.1.6. VARIABLES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD MICROBIANA**

### **2.1.6.1. TEMPERATURA**

La temperatura óptima de crecimiento bacteriano es entre 301 y 308 K, aunque la *Thiobacillus Ferrooxidans* puede mantener cierta actividad en el rango de 278 a 318 K. Ha sido reportado que cada 6 grados que la temperatura disminuye la actividad bacteriana decrece a la mitad. Hay especies de bacterias que se desarrollan mejor en determinados intervalos característicos de temperatura. Algunas, las crisófilas, en frío (menos de 293 K). Las mesófilas, en caliente (293 - 313 K); otras (las mesófilas moderadas) en un medio más caliente (313 - 328 K) y algunas (las termófilas extremas) necesitan un ambiente muy caliente (más de 328 K). Ninguna de las bacterias criófilas participa en la oxidación de minerales. Ver TABLA.III.

**TABLA III. Clasificación de las bacterias de acuerdo a su resistencia a la temperatura.**

CLASIFICACION	RANGO TEMPERATURA	ESPECIE/(T OPTIMA, K)
Criofilas	0	
Mesófilas	238 – 323	thiobacillus ferrooxidans (293 - 308) thiobacillus thiooxidans (293 - 308) leptospirillum
Termófilas	313 – 393	sulfolobus acido caldarius (328 - 358) sulfolobus like termófila (318 - 353) sulfobacillus termosulfiooxidans (323 - 393) thiobacillus like TH3 (318 - 343) archaebacteria (358 - 383) pirodictum accultum (343 - 383) metallosphaera acidanus sulfurococcus

Fuente: JUNAC, 1989

### 2.1.6.2. CONTAMINANTES

Existen una variedad de especies inhibitorias del crecimiento de las bacterias. Ver TABLA IV.

TABLA IV. Niveles de Toxicidad Inhibitorios del Crecimiento de Thiobacillus ferrooxidans

Componente	Concentración Mínima Inhibitoria
Ag	6,4 ppm
Al	4,8 gpl
As	0,64 gpl
Hg	4,6 ppm
Mg	12,0 gpl
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	2,0 gpl
SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	80,0 gpl
Cl <sup>-</sup>	5,0 gpl
Cu	12,0 gpl
Reactivos SX	16,0 ppm

Fuente: JUNAC, 1989

### 2.1.7. BALANCE DE CELULAS

Para controlar la actividad de los microorganismos, la mayoría de los estudios con sistemas continuos, se llevan a cabo usando un substrato limitante al crecimiento. Es posible establecer un crecimiento microbiológico en situación continua, en un reactor simple. Un balance de materia para el crecimiento bacterial en un reactor de etapa simple está dado por:

$$(Células Entrada) - (Células Salida) + (Células Crecimiento) - (Células Muertas) = (Acumulación de Células)$$

$$(F/V) X_0 - (F/V) X + \mu X - \alpha X = dX/dt \quad (16)$$

Donde:

F: Velocidad de flujo de nutrientes

$\mu$  : Velocidad específica de crecimiento

$\alpha$  : Velocidad específica de muerte

V: Volumen de líquido en el reactor

$S_0$ : Substrato inicial

$X_0$ : Concentración inicial de células

En un cultivo continuo, la velocidad específica de crecimiento es mucho mayor que la velocidad específica de muerte:

$\mu \gg \alpha$ , Así la ecuación anterior podemos escribirla:

$$(-F/V) X + \mu X = dX/dt \quad (17)$$

Como una consecuencia de la condición continua:  $dX/dt = 0$  y por consiguiente:  $\mu = (F/V)$

La velocidad específica de crecimiento está determinada por la velocidad de flujo del medio nutriente dividido por el volumen de cultivo. Esta razón es definida como la velocidad de dilución:  $D = (F/V) = \mu$ , y en un sistema continuo la velocidad específica de crecimiento es igual a la velocidad de dilución, D.

#### **2.1.8. CUANTIFICACION DE BACTERIAS**

Para la estandarización de las pruebas a nivel de laboratorio en este campo de la biohidrometalurgia es necesario, especialmente durante el inicio de una prueba de lixiviación bacteriana en suspensiones (inoculación), conocer la cantidad de bacterias presentes en un mililitro de cultivo, o sea su población.

Curvas de crecimiento de los microorganismos que caracterizan por ejemplo los bioreactores, describen las poblaciones versus tiempo y demandan métodos rápidos para las determinaciones correspondientes.



El método más exacto para la determinación de la población es el método del número más probable (MPN: Most Probable Number). Un método más rápido resulta por el conteo de las bacterias con la cámara de “Neubauer” o “Thoma”, facilitado por el contraste de fases como accesorio de un microscopio.

### **Número Más Probable**

El grado de dilución, una tabla estadística y una comprobación visual son las necesidades e informaciones para averiguar el número más probable de la cantidad de células o bacterias en un cultivo o en una dilución.

McGrady ha desarrollado tablas estadísticas, por ejemplo para tres o cinco pruebas paralelas que sirven para encontrar el MPN de la cantidad de bacterias por mililitro; es necesario una secuencia de diluciones del cultivo en investigación hasta que resulten pruebas que no contengan bacterias. La bacteria *Thiobacillus Ferrooxidans* utiliza la oxidación de ferroso a férrico como fuente de energía para su metabolismo. Esta

oxidación se muestra en un cambio de color de la solución nutriente y comprueba de éste modo el límite de la concentración para la dilución de un cultivo.

La determinación del “título de gérmenes” se realiza rutinariamente de igual forma como el método para el MPN, con una secuencia de diluciones; pero el resultado lleva una gran desviación estándar. Unas tres o cinco pruebas (tubos) para cada dilución, permite reducir éste error notablemente y con tres diferentes grados de diluciones se encuentra el MPN (Tabla de McGrady) de las bacterias por mililitro en la solución de cultivo, es decir la población respectiva. La influencia de la casualidad que juega el rol decisivo en el “título de gérmenes” no domina tanto el método del número más probable.

TABLA V. Medio Nutriente para el Cultivo de Thiobacillus Ferrooxidans

Constituyente	Leadhen et al.(1951)	Medio 9K (1959) Silverman&Lundgren	Mihaylov et al. (1991)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,15 g	3,0 g	-----
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	-----	-----	3,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 g	0,5 g	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5 g	0,5 g	0,5 g
H <sub>2</sub> O			
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,01 g	0,01 g	0,01 g
KCl	0,05 g	0,10 g	0,10 g
agua destilada	1000 ml	700 ml	700 ml
10 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-----	1,0 ml	1,0 ml
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	10 ml de solución al 10 % p/v	300 ml de solución al 14,47.% p/v	300 ml de solución al 14,47 % p/v

Fuente: JUNAC, 1989

### Procedimiento

1. Se prepara una secuencia de diluciones de la solución del cultivo con la solución nutriente 9K (sin sulfato ferroso). Ver TABLA V.
2. De cada dilución se preparan cinco tubos con solución nutriente 9K (10 g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O/litro en vez de 44,22 g/l); pH= 2,5.

3. Se incuban los tubos con las diferentes diluciones hasta que se muestran por coloración el desarrollo de bacterias (hasta el límite de la dilución); temperatura 303 - 308 K.
4. Se evalúa el crecimiento de *Thiobacillus Ferrooxidans* por medio de la oxidación de ferroso a férrico, ósea por el cambio de color de la solución nutritiva a amarillo o marrón (efecto de concentración).
5. Los resultados en los límites de las diluciones que se recibe después de la incubación, se utilizan para la búsqueda del MPN según las Tablas respectivas de McGrady.

Ejemplo:

- Se tienen 5 tubos paralelos de cada dilución ( $1:10^6=10^{-6}$  del cultivo original;  $1:10^7=10^{-7}$  del cultivo original;  $1:10^8=10^{-8}$  del cultivo original).
- Incubados durante un tiempo con 308 K, muestran los resultados siguientes:

- \* 5 tubos positivos de la dilución  $10^{-6}$
- \* 2 tubos positivos de la dilución  $10^{-7}$
- \* 0 tubos positivos de la dilución  $10^{-8}$

El agrupamiento de los números de los resultados es [5 2 0].  
Con éste número compuesto se entra en la tabla correspondiente de McGrady y se encuentra el número más probable: 5,0.

- Podemos interpretar que en la dilución  $10^{-6}$  del cultivo original se encuentran como número más probable 5,0 bacterias por mililitro. El cálculo del MPN para el cultivo original se realiza por la división por el factor de la dilución, es decir,  $10^{-6}$ :

$$\text{MPN} = 5,0/10^{-6} = 10^6 \text{ bacterias/ml}$$

## **2.1.9. IDENTIFICACION DE BACTERIAS**

Para realizar la identificación de bacterias es importante hacer uso de coloraciones del cuerpo del microorganismo para observar su estructura interna o externa, puesto que las bacterias son incoloras.

Las coloraciones pueden ser simples, cuando sólo interviene un colorante o bien compuesta, cuando intervienen dos o más colorantes y se efectúan en varios tiempos.

### **2.1.9.1. Coloración de Gram**

Es una coloración indispensable en bacteriología, la que es diferencial para los microorganismos.

**Gram Positivas:** Son aquellas bacterias que retienen el colorante violeta de genciana y no se decoloran por el alcohol, toman un color violeta.

**Gram Negativas:** Son aquellas bacterias que pierden el colorante violeta de genciana por decoloración con alcohol y necesitan ser teñidas por un

colorante de contraste que es la safranina: adquieren una coloración roja.

Mediante esta técnica, es posible diferenciar en dos grupos a las bacterias de acuerdo a la constitución de su cubierta o membrana celular.

### **Procedimiento**

1. Preparar un frotis
2. Fijar la preparación a la llama
3. Hacer actuar violeta de genciana más cinco gotas de bicarbonato de sodio en solución durante unos minutos.
4. Lavar con agua corriente y cubrir la preparación con lugol por tres minutos
5. Lavar con agua corriente y decolorar con alcohol de 95 grados durante 8 segundos.
6. Cubrir el frotis con safranina, 3 minutos
7. Lavar con agua corriente, secar y observar al microscopio.

### 2.1.9.2. Coloración de Ziehl-Neelsen

Hay bacterias que luego de colorearse forman un complejo difícil de decolorar, ya sea con alcohol e incluso con alcohol ácido, por lo que se les denomina “ácidos resistentes”, toda la cubierta externa de la bacteria adquiere una coloración roja.

#### Procedimiento

1. Preparación del frotis
2. Fijar al calor.
3. Cubrir la preparación con colorante de Ziehl-Neelsen (fucsina fenicada) y calentar hasta la aparición de vapores, durante 5 minutos.
4. Lavar con agua de caño.
5. Decolorar con alcohol ácido (alcohol de 95 grados al 3.% en Hcl)
6. Lavar con agua y añadir azul de metileno por un minuto
7. Lavar, secar y observar al microscopio.



## **CAPITULO III**

### **FUNDAMENTO DE LA LIXIVIACION BACTERIAL Y MECANISMO**

#### **3.1 LA LIXIVIACION BACTERIAL Y MECANISMO**

##### **3.1.1. BIOLIXIVIACIÓN / BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS**

La lixiviación bacteriana, también conocida como biolixiviación, biohidrometalurgia, puede ser definida como un proceso natural de disolución que resulta de la acción de un grupo de bacterias con habilidad de oxidar sulfuros, permitiendo la liberación del metal contenido en el mineral. En la literatura no se presenta una distinción clara entre el termino biolixiviación y biooxidación, la mayoría de las veces ambos términos son usados indistintamente. La biolixiviación emplea bacterias específicas para lixiviar, disolver o extraer, un metal de valor (cobre, uranio, zinc, níquel, cobalto, etc) contenido en un mineral. El producto final de la biolixiviación es una solución ácida que contiene el metal en forma soluble. De otro lado el término biooxidación es usado cuando el elemento a recuperar no puede ser solubilizado

por los microorganismos pero su presencia beneficia la recuperación del mismo, a través de la degradación de la matriz mineral en la que está ocluido el elemento de interés . La mayor aplicación de la biooxidación es para el mejoramiento de la extracción de oro, potencialmente es aplicable a la plata (cuando se encuentra nativa e incluso como sulfuro) y posiblemente al molibdeno (cuando se encuentra bajo la forma de sulfuros como la molibdenita que es muy refractaria al ataque bacteriano).

En los últimos años la biolixiviación ha sido ampliamente aplicada a escala industrial debido a los bajos costos y a que es una tecnología ambientalmente viable, sin requerimientos estrictos de la composición del material crudo, es conveniente para la explotación y beneficio de menas complejas de bajo tenor . La biolixiviación de sulfuros ha sido aplicada en el pretratamiento de menas refractarias de oro, en la extracción de cobre y cobalto. Con el crecimiento comercial de este bioproceso, algunas investigaciones indican que los minerales que contienen zinc, níquel, molibdeno y manganeso son

metales potencialmente recuperables a través de la lixiviación bacteriana.

En la actualidad, se estima que la contribución de la biolixiviación es de aproximadamente el 15, 13 y 25 % de la producción total del mundo de cobre, uranio y oro, respectivamente.

La biooxidación de menas refractarias de oro constituidas por pirita-arsenopirita en reactores de tanque agitado o en pilas, usando bacterias mesófilas como pre tratamiento al proceso de extracción de oro por cianuración, ha demostrado ser económicamente factible y una alternativa competitiva a los procesos tradicionales de tostación y oxidación a presión. Los procesos de biooxidación aplicados a minerales refractarios a escala industrial fueron empleados por primera vez en Fairview (Sudáfrica) en 1986 para un concentrado de oro refractario. En la actualidad, la biooxidación es exitosamente empleada, a escala comercial, en países como Brasil, Perú, Australia, Ghana, Sudáfrica, India y China.

### 3.1.2. EXTRACCIÓN DE ORO EN MINERALES REFRACTARIOS

La lixiviación con cianuro es el método más empleado desde hace más de cien años para la extracción de oro. Este proceso se realiza en tanques, columnas o pilas, usando soluciones diluidas de NaCN (menores de 0,3 %) en ambiente básico. La reacción global del proceso es:



El proceso de cianuración presenta dificultades en la extracción de oro de ciertos tipos de minerales conocidos como refractarios, donde su recuperación resulta muchas veces menor del 30 %. La refractariedad en estos minerales y sus concentrados se debe principalmente a la naturaleza compleja de la forma en que se aloja el metal en el mineral, el efecto de los minerales acompañantes sobre las reacciones que ocurren en la lixiviación con cianuro y las características de la ganga.

El oro se encuentra en la naturaleza como oro nativo, aleado, en compuestos y en solución sólida principalmente en

sulfuros (frecuentemente denominado como oro invisible). La refractariedad de los minerales auríferos puede ser distinguida por su naturaleza física y/o química. La refractariedad química se debe a tres condiciones:

- Teluros de oro insolubles.
- Presencia de minerales que puedan descomponerse y reaccionar con el NaCN (cianicidas).
- Presencia de minerales que consuman oxígeno.

La refractariedad de los minerales auroargentíferos es principalmente de naturaleza física. Estos minerales refractarios se clasifican en:

- Minerales que contengan oro fino encapsulado o unido a materia carbonosa, pirita, arsenopirita y sílice.
- Minerales que contengan oro con: Sb, Pb, Ag, Pd, As, etc.
- Minerales que contengan oro recubierto con películas finas de óxidos de hierro, cloruro de plata, compuestos de antimonio, manganeso o plomo.

- Minerales que presenten especies que estén en proceso de transformación, tales como, los sulfuros que se descomponen y forman cianicidas, tiosulfitos, arsenitos e iones ferrosos; que son consumidores de oxígeno.
- Minerales que presenten el fenómeno de *preg-robbing* durante el proceso de cianuración, esto ocurre cuando el oro lixiviado es adsorbido por ciertos componentes de la mena (carbono, arcillas), haciendo la extracción de oro menos eficiente. Menas con altos contenidos de carbono (>.5 %) resultan en reducciones significativas en la extracción de oro y en algunos casos cantidades tan pequeñas como 0,1 % pueden producir efectos de *preg-robbing*.

Es por eso que cada depósito puede presentar un tipo especial de refractariedad, que depende de los minerales asociados, sus texturas y tamaño, tamaño de los granos de oro, etc. Por esta razón, es importante realizar una buena caracterización mineralógica para definir los posibles problemas a ser enfrentados.

### 3.1.3 MECANISMOS DE BIOOXIDACIÓN BACTERIANA DE SULFUROS

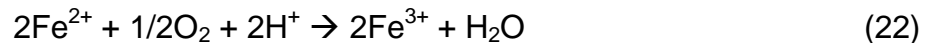
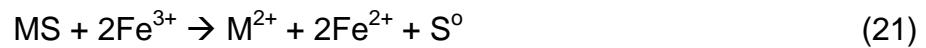
El papel de los microorganismos en la biooxidación de los sulfuros ha sido, es, y probablemente estará sometida a controversia. Aunque diferentes autores están de acuerdo en varios aspectos relacionados al fenómeno, ninguna teoría unificada ha sido aceptada hasta el momento.

Se han propuesto dos posibles mecanismos para la lixiviación bacteriana de sulfuros, directo e indirecto. En el mecanismo directo, las reacciones son directamente catalizadas por el ataque de la bacteria a la superficie del mineral. La bacteria es capaz de interactuar directa y físicamente con el mineral oxidando continuamente los compuestos reducidos o parcialmente reducidos de azufre tales como, sulfuros y azufre elemental a sulfato. El mecanismo de biooxidación directa puede ser descrito por las siguientes reacciones:



Donde M es un metal divalente.

En el mecanismo indirecto, el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), producto de la oxidación del hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), se convierte en un fuerte oxidante capaz de oxidar los sulfuros. En este mecanismo el papel fundamental de la bacteria es oxidar el ión ferroso, y la lixiviación química del mineral es realizada por el ión férrico. El mecanismo de biooxidación indirecto puede ser descrito por las siguientes reacciones:



Según lo citado por, pese a la evidencia presentada a favor de los microorganismos adheridos a la pirita por algunos autores, y la importancia de la oxidación directa de la pirita por los microorganismos durante las primeras fases de la lixiviación, hay todavía dudas de la contribución del mecanismo directo de los microorganismos adheridos en los procesos de disolución de la pirita. En algunos casos, el mecanismo de disolución directo de la pirita ha sido rechazado. Recientes

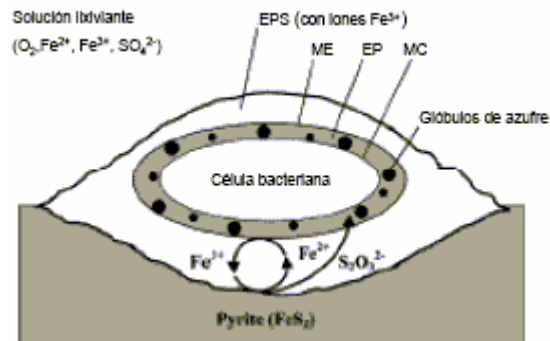


estudios apuntan a que el mecanismo de biooxidación indirecto como único modo de disolución del mineral. En contraste, afirma , varios autores han demostrado que la cinética de biolixiviación de la pirita puede ser aumentada mejorando el contacto entre los microorganismos y la superficie del mineral.

Todas estas contribuciones son en parte contradictorias, y esta es la principal razón para que ambos mecanismos estén hasta ahora en controversia .

Según, el “mecanismo directo” no existe. El “mecanismo indirecto” permanece y ahora comprende dos sub-mecanismos. El mecanismo “indirecto de contacto” y el “indirecto de no contacto”. En el curso del mecanismo “indirecto de no contacto”, el ión ferroso es oxidado por la bacteria a férrico, el cual, oxida la superficie del sulfuro, donde es reducido a ferroso para nuevamente entrar en el ciclo. En el mecanismo “indirecto de contacto”, los procesos de adhesión de los microorganismos son mediados por la capa polimérica extracelular que rodea a las células, en esta capa ocurre la regeneración del ión férrico por acción de la bacteria y la reducción a hierro ferroso por la

reacción del ión férrico con el sulfuro. La disolución de los sulfuros toma lugar en la interfase entre la pared celular de la bacteria y la superficie del mineral (Figura 1).



**Figura 1.** Modelo del mecanismo “indirecto de contacto”. Bacteria rodeada por su capa de exopolímeros (EPS) y adherida a la superficie de una pirita. MC: Membrana citoplasmática. EP: Espacio periplásmico. ME: Membrana externa.

Fuente: ACEVEDO, 2005

### 3.1.3.1. Camino de las reacciones

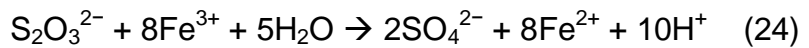
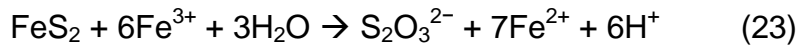
Resultados experimentales indican que las reacciones de disolución de los sulfuros son

determinadas por la reactividad de los minerales con los protones. Por ejemplo, el ácido no soluble de minerales como pirita ( $\text{FeS}_2$ ), molibdenita ( $\text{M}^\circ\text{S}_2$ ) y tungestenita ( $\text{WS}_2$ ), disulfuros, son degradados por un mecanismo diferente que el de ácidos solubles provenientes de minerales como la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), galena ( $\text{PbS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), monosulfuros. En estos dos grupos se pueden definir dos mecanismos diferentes para la oxidación bacteriana de sulfuros, “mecanismo vía tiosulfatos” y “mecanismo vía polisulfuro”, descritos a continuación:

### **Mecanismo vía tiosulfato**

Sand *et al.* (1995, 1999) propusieron el mecanismo indirecto vía tiosulfato, que describe el mecanismo de degradación de ácidos no solubles de disulfuros como la pirita, la molibdenita y la tungestenita. En este mecanismo el ión férrico hexa-hidratado comienza el ataque indirecto a los sulfuros. La pirita es disuelta vía la extracción de electrones por los iones

hidratados de hierro (III) de acuerdo a las siguientes reacciones:

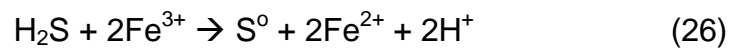
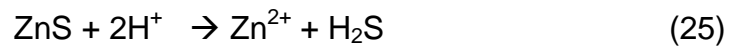


En estas reacciones, el tiosulfato se supone es formado a partir del di-sulfuro contenido en el cristal de la pirita ( $\text{Fe-S-S} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{S-SO}_3^{2-}$ ). En este mecanismo los sulfuros no generan azufre como principal producto en la oxidación sino tiosulfato, que es el primer intermediario liberado por el sulfuro luego de la oxidación.

### **Mecanismo vía polisulfuro**

El mecanismo para la degradación de sulfuros con el intermediario principal polisulfuro es válido para ácidos solubles de monosulfuros como la esfalerita, galena, calcopirita y arsenopirita. El ataque sobre el mineral es llevado a cabo por la acción combinada de protones y hierro (III). Los protones inducen la

polarización del ión sulfuro superficial y la liberación del sulfuro es reforzada por la transferencia de electrones al ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La esfalerita puede disociarse en ácido de acuerdo a las siguientes reacciones:



El  $\text{H}_2\text{S}$  puede ser oxidado fácilmente por el  $\text{Fe}^{3+}$  a sulfuro con posible formación intermedia de polisulfuro.

Tributsch (1999) también reconoce que la oxidación del mineral por parte de la bacteria depende del tipo de sulfuro, debido a que estos presentan reacciones diferentes. Así, la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ),  $\text{CdS}$ , galena ( $\text{PbS}$ ), covelina ( $\text{CuS}$ ), oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ), haverita ( $\text{MnS}_2$ ) son más fácilmente solubilizadas, mientras la molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), tungestenita ( $\text{WS}_2$ ), pirita ( $\text{FeS}_2$ ) no lo son. Lo anterior, puede ser explicado sobre la base de que los minerales con sulfuros con estado de oxidación S-2, como el  $\text{ZnS}$ ,  $\text{CuS}$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{PbS}$ ,

$\text{As}_2\text{S}_3$ ,  $\text{MnS}_2$  tienen un nivel de mayor energía debido a un estado de mayor oxidación, donde la extracción de electrones de la banda de valencia por el ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y los protones ( $\text{H}^+$ ) provoca la disolución del sulfuro. Mientras que en minerales con sulfuros con estado de oxidación S-1, como la  $\text{FeS}_2$ ,  $\text{RuS}_2$ ,  $\text{MoS}_2$ ,  $\text{WS}_2$ , la extracción de electrones provoca un aumento en el estado de oxidación del metal (aumento en el nivel de energía sin la dilución del sulfuro).

Por lo anterior, los mecanismos tiosulfato y polisulfuro actúan de acuerdo a la capacidad de los sulfuros a ser disueltos por ácidos, lo que está relacionado con las bandas de valencia de las que son extraídos los electrones durante el ataque. Los sulfuros que sólo pueden ceder electrones desde las bandas de valencia del metal (sin afectar, en principio, el enlace azufre-metal) son denominados no solubles en ácido y en ellos actúa el mecanismo vía tiosulfato, mientras que los sulfuros que son solubles en ácido, y en el que procede el mecanismo vía polisulfuro el ataque del

hierro férrico o protones produce la transferencia de electrones desde el sulfuro provocando de esta forma la ruptura del enlace azufre-metal.

Adicionalmente, Tributsch (2001) propuso tres estrategias para la biolixiviación del mineral (ver Figura.2):

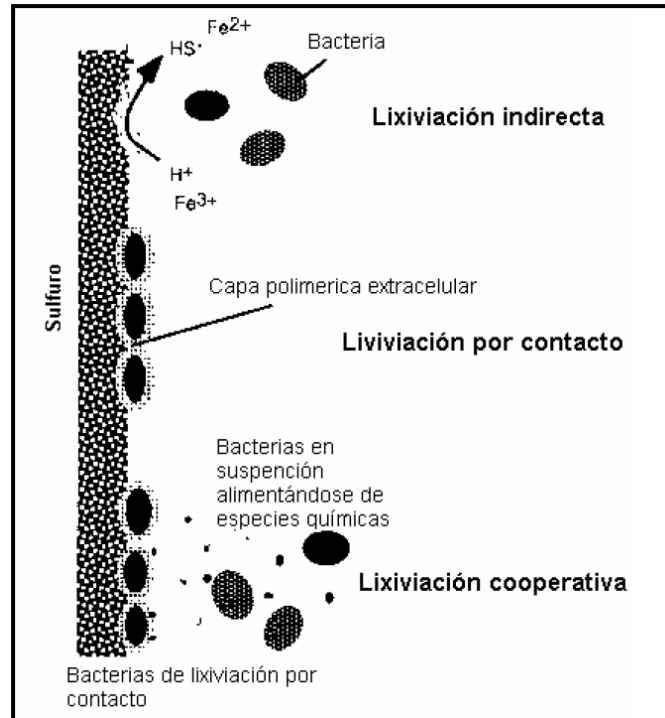
- Biolixiviación indirecta: los microorganismos no son adheridos a la superficie del mineral y su acción es regenerar el agente oxidante, ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ).
- Biolixiviación de contacto: los microorganismos adheridos a la superficie del mineral a través de la capa polimérica extracelular facilitan el ataque al mineral por la disolución electroquímica y el hierro férrico.
- Biolixiviación cooperativa: los microorganismos adheridos a la superficie del mineral cooperan con las células que están libres en la solución. La bacteria adherida libera especies oxidables, las cuales son

fuerza de energía para los microorganismos en solución.

Rodríguez *et al.* (2003) llegaron a una conclusión similar a la de Tributsch (2001), donde el proceso de biolixiviación de la pirita se lleva a través de la biolixiviación cooperativa, con participación simultánea de la biolixiviación de contacto y la biolixiviación indirecta, probablemente a través del mecanismo vía tiosulfato (Rodríguez *et al.*, 2003).

La contribución relativa de cada uno de los procesos en la oxidación de sulfuros todavía no ha sido totalmente aclarada, sin embargo, se sabe que el principal mecanismo catalítico de la bacteria consiste en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , manteniendo de este modo una adecuada (alta) razón  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , lo que acelera la oxidación de los sulfuros, ya que, el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) es uno de los principales agentes oxidantes de los sulfuros a casi cualquier pH.





**Figura 2.** Esquema de los distintos tipos de lixiviación de un sulfuro según Tributsch (2001).

Fuente: ACEVEDO, 2005

### 3.1.4. VENTAJAS DE LA BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS

La oxidación biológica de sulfuros metálicos se ha convertido en una alternativa importante y eficiente para el manejo de minerales auroargentíferos de carácter refractario, ya que cuenta con ventajas significativas sobre las otras tecnologías, de las cuales las más importantes son:

- La simplicidad y versatilidad del diseño y las operaciones, hacen esta tecnología apropiada para el uso en locaciones remotas. No se requiere de mano de obra muy calificada.
- La puesta en marcha es corta y los costos de capital y operación son bajos comparados con las técnicas de tostación y oxidación a presión.
- Es flexible y puede utilizarse para tratar una diversidad de sulfuros metálicos individuales o mezclas de minerales.
- La forma en que se puede aplicar varía desde un simple lecho fijo de percolación hasta sistemas de lixiviación en tanques de agitación.
- No requiere temperaturas ni presiones altas para su operación.
- Es autogeneradora de solventes en forma de solución de sulfato férrico, lo cual reduce de una forma apreciable las necesidades de este reactivo en el ataque de los minerales.
- Ausencia de polución por gases sulfurosos, ya que cualquier efluente líquido que produce está en una forma acuosa, que puede ser convenientemente neutralizada y no da lugar a la formación de subproductos gaseosos nocivos.

### **3.1.5. FACTORES QUE AFECTAN LA CINÉTICA DE BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS**

La actividad que presentan los microorganismos en el proceso de biooxidación depende, en gran medida, de las condiciones ambientales a las que son sometidos . Dentro de estos factores, los más importantes son: pH, potencial redox, concentración de oxígeno disuelto y transferencia de oxígeno, nutrientes, concentración de iones metálicos, densidad de pulpa, tamaño de partícula e interacciones galvánicas.

#### **A. PH**

El pH influye de forma significativa en la velocidad de crecimiento de los microorganismos, debido a que afecta a los grupos ionizables presentes en las enzimas situadas en el citoplasma y periplasma de la célula. Dichos grupos deben encontrarse en la forma iónica más adecuada para mantener la conformación del centro activo de la célula y así enlazarse a los sustratos y catalizar la reacción.

Los microorganismos que participan en la lixiviación bacteriana de sulfuros son acidófilos, ya que son activos a pH

por debajo de 3,0 con un pH óptimo para el *Acidithiodacillus ferrooxidans* en el intervalo de 1,5 a 2,5. Valores de pH cercanos a 1,0 presentan una fuerte inhibición del crecimiento del *A. ferrooxidans*, lo que no ocurre con el *A. thiooxidans*, que presenta caídas en el pH de sus cultivos incluso hasta menos de 1,0 debido a la producción de ácido sulfúrico y a su capacidad de tolerar una mayor acidez.

La formación de precipitados en la biooxidación de sulfuros depende del valor de pH de la solución. A valores de pH por encima de 2,5 el hierro férrico tiene una baja solubilidad, ocasionando la formación de hidroxisulfatos básicos de Fe(III) con fórmula general  $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ , donde M es  $K^+$  (jarosita),  $Na^+$  (natrojarosita),  $NH_4^+$  (amoniojarosita),  $H_3O^+$  (hidroniojarosita),  $Ag^+$  (argentojarosita),  $Pb^{2+}$  (plumbojarosita), entre otros. Esta precipitación depende fundamentalmente del pH, la composición iónica y la concentración del medio.

La precipitación de Fe(III) ocurre incluso a bajos valores de pH, sin embargo, se observa que medios con valores de pH

menores de 1,8 son efectivos para limitar la extensión de la precipitación de estos compuestos recomiendan que para mantener la actividad bacteriana en un proceso de biooxidación de sulfuros en reactores de tanque agitado el pH de operación debe mantenerse en el intervalo de 1,6 – 1,8.

### **B. Potencial redox (Eh)**

El potencial redox de la solución es un indicador del metabolismo energético o actividad de la bacteria en el proceso de biooxidación, debido a que es una medida de la tendencia de la solución a ser oxidada o reducida. Durante la fase de crecimiento exponencial, el Eh de *A. ferrooxidans* se caracteriza por estar entre 320 – 580 mV. Normalmente, la extracción de los sulfuros alcanza sus mayores velocidades cuando el Eh de la solución ácida ha superado los 400 – 450 mV.

### **C. Temperatura**

La temperatura es otro parámetro que determina la actividad bacteriana. Se ha demostrado que la velocidad de la reacción es influenciada por la temperatura, con una dependencia de la constante de velocidad tipo *Arrhenius* . Los

procesos de biooxidación tienen un máximo de temperatura arriba del cual las reacciones de oxidación se inhiben o paran. Para los microorganismos del género *Acidithiobacillus*, la temperatura máxima es de alrededor 316 °K, con un intervalo óptimo entre 308 y 313 °K. Debe mantenerse la temperatura en el intervalo óptimo para lograr la máxima velocidad de reacción en el proceso.

#### **D. Concentración de oxígeno disuelto**

La disponibilidad de oxígeno disuelto en la lixiviación bacteriana de sulfuros es un factor indispensable para el desarrollo del proceso, ya que la bacteria necesita oxígeno durante la oxidación de las especies reducidas del hierro y azufre. La solubilidad del oxígeno en agua a 308 °K es 8 gr/m<sup>3</sup> y disminuye con el aumento en la concentración de iones en la solución y la temperatura. Teóricamente la reacción de oxidación del hierro necesita 0,07 gr de oxígeno por gramo de Fe (II) oxidado y esta cantidad no puede estar disponible en la solución considerando la baja solubilidad del oxígeno, por lo que éste debe ser suministrado externamente. El oxígeno debe ser suministrado a los microorganismos a una velocidad por lo

menos igual a su demanda. De no ser así, las células crecerán bajo limitación de oxígeno, el crecimiento será lineal en vez de exponencial y podrían dañarse sus sistemas de transporte de electrones y fosforilación oxidativa.

En la TABLA VI. se aprecia la concentración crítica de oxígeno para el crecimiento *Acidithiobacillus ferrooxidans* para distintos valores de temperatura y para un pH de 2,5.

TABLA VI. Concentración crítica de oxígeno para el crecimiento de *A. ferrooxidans*

Temperatura (K)	Concetracion critica de oxigeno (mg/l)
298	0,877
301	0,390
304	0,368
307	0,345

Fuente: JUNAC, 1989

## E. Nutrientes

La mayoría de los microorganismos que participan en la lixiviación bacteriana de sulfuros son quimioautotróficos, es

decir, obtienen el carbono necesario para su desarrollo del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y la energía de la oxidación de un compuesto inorgánico ( $\text{Fe}^{2+}$  ó  $\text{S}^{2-}$ ). Los otros elementos básicos para la nutrición de estos microorganismos deben estar en cantidades proporcionales a su composición celular en el medio de cultivo en forma de sales. Los más importantes cuantitativamente, son el nitrógeno, generalmente como sal de amonio, el magnesio (sulfato de magnesio), el fósforo (fosfato ácido de potasio) e iones metálicos pesados en menor cantidad. Si un nutriente está presente en bajas concentraciones o es suministrado a bajas velocidades, el crecimiento celular ocurrirá a una menor velocidad. El medio de cultivo "9K" y "T&K", son los medios más empleado para el crecimiento de los *Acidithiobacillus*.

#### **F. Densidad de pulpa**

La biooxidación de sulfuros con densidades de pulpa mayores de 20 % en reactores de tanque agitado no ha tenido buenos resultados. Esto se debe básicamente a que al aumentar la concentración de sólidos aumenta la fricción entre las partículas en el interior de la suspensión, lo que causa el



daño celular. Las altas concentraciones de sólidos también limitan las velocidades de transferencia de oxígeno, por lo que se deben suministrar grandes cantidades de éste para oxidar a los sulfuros. Los intentos para mejorar la aireación resultan inevitablemente en aumentos en la velocidad de agitación, lo que genera una mayor fricción entre las partículas dentro de la suspensión. Altas densidades de pulpa generalmente limitan la velocidad de transferencia de oxígeno requiriendo mayor tiempo de biooxidación.

Según Deveci (2002, 2004) la magnitud de los efectos adversos en un reactor de tanque agitado dependen del tipo y diseño del impulsor, concentración de sólidos e intensidad de agitación; presentando un aumento significativo en la pérdida de viabilidad de la población bacteriana cuando la concentración de sólidos es mayor o igual al 20 % W/W.

### **Actividad de los microorganismos y concentración bacteriana**

La bacteria tiene la habilidad de adaptarse a condiciones cambiantes. Cuando un cultivo de bacterias es introducido a un

nuevo tipo de alimento, como los sulfuros, la bacteria necesita tiempo para adaptarse al nuevo material. Los *Acidithiobacillus* y otros microorganismos acidófilos tienen la capacidad de crecer en presencia de varios tipos de iones metálicos después de la adaptación. La etapa de adaptación ayuda a reducir la fase *lag*, aumentar la actividad bacteriana, y reforzar de esta forma, la cinética global de lixiviación.

Otro factor que afecta la biooxidación a altas densidades de pulpa en reactores de tanque agitado es la baja relación microorganismo/sólido.

Según lo citado por Deveci (2004), durante los procesos de mezcla en un reactor de tanque agitado, el daño a las bacterias es causado predominantemente por la acción de las partículas del sólido sobre las células, resultando en la pérdida de viabilidad de la bacteria. La velocidad y magnitud de la conversión del sustrato en la biooxidación podría ser controlada por el número inicial de células, donde el uso de una población bacteriana activa grande como inóculo, mitigaría de alguna forma los efectos adversos. En reactores continuos de tanque

agitado, la concentración de la población bacteriana varía entre  $10^3$  a  $10^9$ .

### **Concentración de iones metálicos**

La presencia de compuestos tóxicos o inhibitorios en el mineral puede causar serios problemas en la biooxidación. En el TABLA.VII. se presentan algunos niveles de toxicidad por cationes y aniones para el *Acidithiodacillus ferrooxidans*. Una solución atractiva a este problema es la selección de cepas con cierta resistencia a estos iones, aisladas en los sitios donde se extrae el mineral a tratar, o bien la construcción artificial de cepas con estas características.

TABLA VII. Niveles de toxicidad de cationes y aniones para el *A. ferrooxidans*

Metal	Nivel inhibitorio (mg/l)	Tolerancias reportadas (mg/l)
Zn <sup>2+</sup>	> 10000	15000 – 72000
Ni <sup>2+</sup>	> 10000	12000 - 50000
Cu <sup>2+</sup>	> 10000	15000
Mn <sup>2+</sup>	> 10000	---
Co <sup>2+</sup>	> 10000	3000
Al <sup>3+</sup>	> 10000	6000
Ag <sup>+</sup>	< 50	1ppb
UO <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	< 700	200 – 500
AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	< 200	---
MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	< 5	90
SeO <sub>2</sub>	< 100	---

Fuente: Acevedo y Gentina, 2005

### Tamaño de partícula

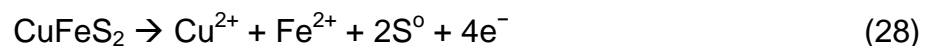
El área específica superficial es uno de los factores importantes que afectan el proceso de oxidación bacteriana. Generalmente en los minerales refractarios, la fracción del área superficial ocupada por el sulfuro de interés es pequeña, y se podría esperar que la velocidad de lixiviación sea proporcional a los pocos sitios activos de dicho sulfuro. A medida que el tamaño de partícula decrece, aumenta el área superficial y por ende el número de sitios activos.

### Interacción galvánica

Los sulfuros son materiales semiconductores que presentan interacciones galvánicas cuando se encuentran en contacto eléctrico, lo que es común en menas naturales. En la interacción, el mineral con el más alto potencial de electrodo actúa como cátodo, por lo que, en el medio, se corroe (oxida) el mineral con menor potencial, el cual se convierte en el ánodo. Un ejemplo de interacción galvánica es la lixiviación acelerada del cobre de la calcopirita en contacto con la pirita. La pirita, con un potencial más alto, actúa como un cátodo:



Mientras que la calcopirita, con un menor potencial, es anodinamente disuelta:



La pirita también puede facilitar la corrosión de la esfalerita, porque tiene un potencial de electrodo menor. La interacción galvánica afecta la lixiviación bacteriana de

minerales ya que retarda la cinética de oxidación de algunos minerales debido a la disolución preferencial de los sulfuros

## CAPITULO IV

### FUNDAMENTOS DE LA CIANURACION

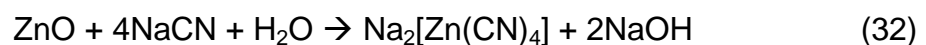
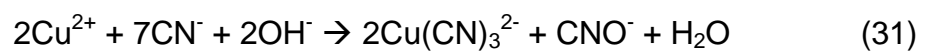
#### 4.1 LA CIANURACION

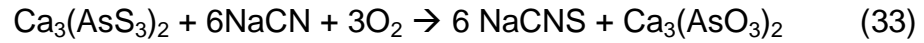
##### 4.1.1. Introducción

Después de haber desarrollado múltiples investigaciones sobre la disolución del oro en medio cianurado, se determinó que este está controlado por la difusión del mismo. A nivel industrial los minerales, el cianuro y sustancias consumidoras de oxígeno afectan la velocidad de extracción del oro.



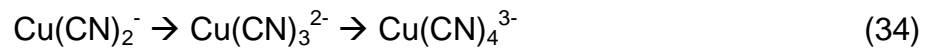
La Pirrotita, Cobre, Cinc, Arsénico y minerales antimoniados consumen cianuro. Algunas reacciones de cianicidas son:





Los iones metálicos comunes  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  forman con el cianuro complejos estables, consumiéndolo, de esta manera la actividad del cianuro es retardada.

En el estado monovalente el cobre Cu (I), forma una serie de complejos solubles en el medio cianurado:



La cinética de disolución del oro no es afectada por la presencia de estos iones, siempre y cuando se mantenga un exceso de cianuro en el medio lixivante, siendo la relación:

$$\frac{\text{CN}_{total \text{ en lixiviación}}}{\text{Cu}_{total \text{ en medio}}} > 4 \quad (35)$$

Si en el mineral existen grandes cantidades de cobre que no pueden ser eliminados previo a la cianuración, se debe



agregar cianuro en exceso. Cuando en el medio lixiviado existe más de 0,03 % de cobre, ocurre lo siguiente:



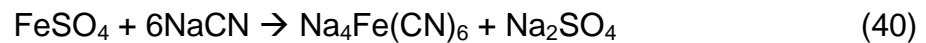
Este compuesto debe ser precipitado. A nivel industrial, es permitido que el contenido de cobre en el medio lixiviado no sobrepase de 0,03 %, impidiéndose que la disolución del oro sea óptimo. La recuperación de oro a partir de soluciones que contiene cobre, se lleva a cabo por el proceso CIP, debido a que la precipitación del oro con cinc es deficiente en presencia de altos niveles de cobre.

La presencia de minerales sulfurados, estas reaccionan con el cianuro y el oxígeno para formar tiocianatos:

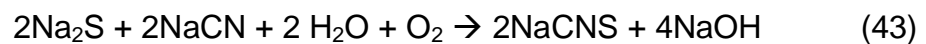
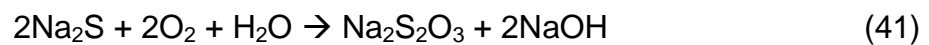


La marcasita se descompone más que la pirita y forma cianicidas, es menos estable que la pirrotita. Este es un cianicida dañino en el medio cianurado, la velocidad de

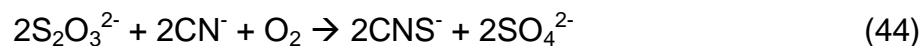
descomposición es más rápida que otros minerales piríticos. La pirrotita se oxida fácilmente formando sulfatos ferrosos y férricos, además, es consumidor de oxígeno:



El ion sulfuro es veneno para el proceso de cianuración del oro. Se han reportado que cantidades menores a 0,05 ppm del ion sulfuro, disminuyen la cinética de disolución. El sulfuro alcalino debe ser oxidado en presencia de oxígeno a tiosulfato, sulfato o tiocianato:

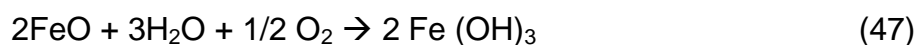
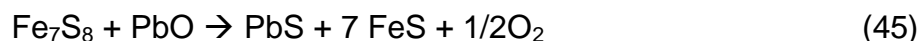


De esta manera, al descomponerse el mineral sulfurado da iones tiosulfatos y politiocianatos que consumen el cianuro y el oxígeno disuelto en el medio lixivante:



El tiocianato se forma por la reacción del cianuro con sulfuros, oxisulfuros, iones arsénico-sulfuro y azufre elemental.

Si en el mineral existe arsenopirita, este puede causar pérdida de cianuro y oxígeno disuelto en el medio a través de su descomposición. Bajo este aspecto, la estibina resulta ser peor que la arsenopirita, en referencia al oxígeno disuelto. Cuando la pirrotita y sulfato ferroso están presentes en el mineral, algunas veces se añade litargirio en la molienda:



El litargirio conduce a la oxidación de la pirrotita sin la formación de ferrocianuro indeseable. La elevada adición de lechada de cal es perjudicial para la disolución del oro, ya que además de disminuir la concentración de cianuro, acelera la

descomposición de la pirrotita y reduce el efecto de las sales de plomo.

#### **4.1.2. Teorías y Conceptos**

El proceso de lixiviación es una práctica universal para la recuperación de oro, existen diversas técnicas para ejecutar dicho proceso, mediante la adición de cianuros, tioúrea, cloruración, tiosulfato y sales oxidantes. En este caso trataremos la lixiviación con cianuro.

La concentración óptima de la solución de cianuro depende de las características de la mena y deben ser determinadas experimentalmente. Los niveles comunes de cianuro son: de 0,05 a 0,20 % de NaCN. El cianuro es añadido en el molino y en los primeros tanques de lixiviación. Se debe añadir cal para mantener el pH entre 10,5 a 11,5. El exceso de cal incrementa el consumo de cianuro. Se recomienda el uso de bajas concentraciones de cianuro, por sus ventajas económicas y técnicas.

El proceso de cianuración, esta influido por la concentración de oxígeno en el medio. La solubilidad del oxígeno en la solución cianurada depende de la presión parcial del oxígeno, la temperatura y la fuerza iónica en condiciones hidrodinámicas.



Otros factores que afectan el proceso son el pH, el potencial de reducción de la pulpa, la concentración de cianuro y la presencia de cianicidas.

El nivel de pH de la pulpa y la adición de pequeñas cantidades de nitrato de plomo, son factores importantes para desechar otras reacciones en el circuito de lixiviación. Concentraciones pequeñas de iones plomo aceleran grandemente la lixiviación del oro.

El hidróxido de calcio tiende a disminuir la lixiviación del oro en el medio de manera mas significativa que el hidróxido de sodio, pero en la práctica se usa universalmente debido a su bajo costo. Si se incrementa el nivel del pH de 10,5 a 12 se

disminuye la disolución de oro en presencia de hidróxido de calcio, debiendo estar el pH aproximadamente en 10,5. La adición de cal regula adecuadamente el pH previniendo la pérdida de cianuro por hidrólisis o por reacciones secundarias con sustancias presentes en el medio como el dióxido de carbono, bicarbonatos, ácidos contaminantes del agua y la mena.

El proceso de lixiviación deberá contar con las siguientes etapas:

- Circuito de lixiviación
- Circuito de separación sólido-líquido
- Área de fusión y refinación
- Zona de acarreo de colas

Es necesaria una Pre-Aireación de la pulpa, ya que muchas menas contienen cantidades excesivas de consumidores de oxígeno. Deben trabajarse con pulpas de 44 a 48 % de sólidos y aireada a un pH de 10,5 a 11 en Pachucas o tanques de agitación. La pulpa aireada es filtrada – para evitar la formación de cianicidas – el residuo formado es

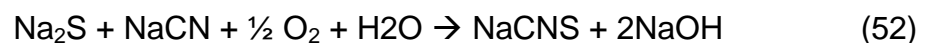
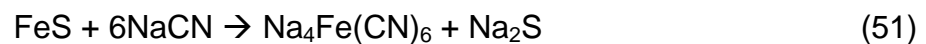
mezclado con la solución estéril (producto de la cementación y/o electrólisis del oro y elementos nobles que acompañan a este).

### **Comportamiento de los sulfuros de Hierro y su relación con la Pre-Aireación alcalina**

Diez Canseco, nos dice que el cambio que sufre la pirita es la pérdida de un átomo de azufre convirtiéndose en sulfuro de la forma FeS. El sulfuro ferroso se produce no sólo por la separación de un átomo de azufre sino también por la acción del hierro de los equipos del circuito de molienda.



El sulfuro ferroso actúa como sigue:



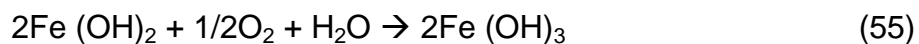
El sulfuro ferroso tiene una cinética de reacción lenta por oxidación convirtiéndose en sulfato y consumiendo oxígeno del circuito.

El hidróxido ferroso es muy rápidamente disuelto en cianuro:



Al incrementarse el poder de oxidación del medio, dicho compuesto se transforma en hidróxido férrico.

En presencia de oxígeno el hidróxido ferroso se pre-oxida así:



El hidróxido férrico resultante es un compuesto altamente estable, no tiene acción sobre el cianuro.



### **Acción de la cal y aire sobre una pulpa pirítica**

Fue investigado por Ralston, en este proceso se formaron sulfuros solubles, tiosulfatos y una menor cantidad de azufre coloidal. El oxígeno disuelto reacciona con los sulfuros solubles para producir tiosulfato e iones sulfato. En presencia de pirita, el oxígeno disuelto oxidó el tiosulfato a ión sulfato (57). Una oxidación prolongada de pirita fina; suspendida en una solución con cal muestra que la alcalinidad de la solución decrece rápidamente al inicio del experimento y más lentamente a medida que prosigue la prueba. Además, se estableció que la máxima cantidad de los agentes reductores solubles, sulfuro de calcio y tiosulfato de calcio.

Así, la pirita es oxidada pero los iones hidroxilo son retenidos o absorbidos sobre la superficie de la pirita, inhibiendo de ese modo cualquier reacción posterior. Acondicionando adecuadamente la pirita antes de la cianuración, se logra una disminución apreciable de la cantidad de cianuro perdido.

**La Pirrotita es más reactiva que la Pirita.**

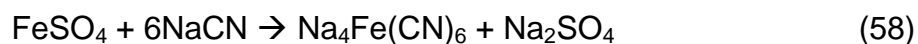
Fue estudiado por Gardiner y Lemmon , teniendo en cuenta la estructura de la pirrotita. Gardiner establece que la pirrotita es estable cuando está seca, pero se descompone rápidamente en presencia de agua y aire formando ácido sulfúrico, sulfato ferroso, sulfatos básicos de hierro, carbonatos e hidratos ferrosos. La velocidad de descomposición es significativamente mayor que para la pirita.

En soluciones alcalinas, precipita el hidróxido ferroso siendo subsiguientemente oxidado a hidróxido férrico. El alto consumo de oxígeno resultante de la reacción perjudica la eficiencia de la solución de cianuro para disolver oro.

De acuerdo con Lemmon, la pirrotita tiene un enlace suelto del átomo de azufre, que reacciona rápidamente con el cianuro para formar el ión tiocianato, según la siguiente ecuación:

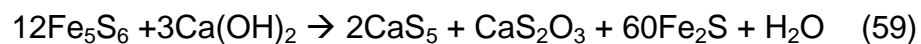


El sulfuro ferroso se oxida rápidamente a sulfato, el que a su vez reacciona con el cianuro para formar iones ferrocianuros, tal como sigue:



Con dicha reacción establecemos objetivamente que la pirrotita no solo es un cianicida, sino un alto consumidor de oxígeno del medio lixivante.

Según Gardiner y Lemmon, una solución altamente concentrada en álcali puede atacar directamente a los sulfuros según las reacciones:



La disolución de oro a partir de una mena pirrotítica es usualmente muy dependiente del valor del pH del medio

cianurado. Por lo tanto, la alcalinidad de la pulpa debe ser controlada muy de cerca y cuidadosamente.

### **Relación del comportamiento de los sulfuros de hierro con la adición de sales de plomo.**

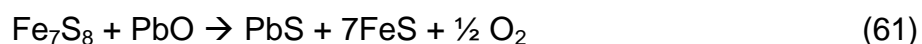
Diez Canseco, afirma que un porcentaje de un sulfuro soluble que está presente en la solución de cianuro, retarda la disolución del oro y la plata. Esto se debe en parte, a que el sulfuro consume oxígeno de la solución, y por otra parte a la formación de películas casi insolubles. La dificultad desaparece si los sulfuros son eliminados, sea por precipitación con sales de plomo o por la acción de ciertas sustancias oxidantes.

Los sulfuros solubles,  $\text{Na}_2\text{S}$ , reaccionan de acuerdo a la reacción (64). Estos sulfuros alcalinos también pueden ser eliminados por la acción de sales de plomo. La adición de las sales de plomo (nitrato de plomo, litargirio o acetato) precipitan los sulfuros solubles, el sulfuro de plomo precipitado es posteriormente oxidado a tiocianato (sulfucianuro). Se ha observado que los sulfuros solubles se oxidan fácilmente; pero que las sales de plomo ofrecen, además, la ventaja de que

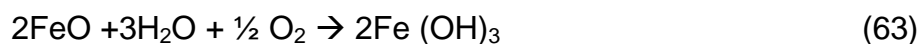
remueven los iones de azufre y retardan la formación de sulfucianuro y la separación de azufre libre.

Los diversos compuestos de plomo formado como hidróxidos, cianuros, plumbitos, etc. son ligeramente solubles en soluciones alcalinas de cianuro, permitiendo adicionalmente precipitar más sulfuros, y descomponer más tioarsenitos. Las soluciones de lixiviación quedan finalmente exentas de los iones nocivos de arsénico y antimonio.

Cuando está presente la pirrotita, se suele agregar litargirio en los circuitos de molienda, el cual reacciona así:



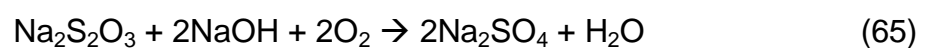
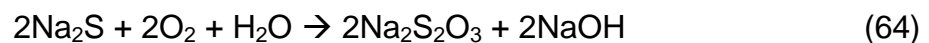
El sulfuro ferroso se convierte en sulfato ferroso en la forma que ya se conoce, reacción (61), y si la alcalinidad es bien controlada reacciona con el litargirio en la siguiente forma:



Como ya se ha visto anteriormente este hidróxido férrico tiene poca acción sobre el cianuro.

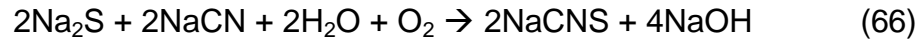
### **Formación de sulfatos y tiocianatos en concentrados piríticos**

En el proceso de flotación de minerales piríticos auríferos se utilizan diferentes reactivos, algunos de ellos contienen sodio que reacciona fácilmente con el ión azufre, para formar tiosulfatos y estos en medio alcalinos a sulfatos, como podemos observar en las siguientes reacciones:



Es importante aclarar que estos iones de azufre, se produce como consecuencia de que los concentrados de flotación, pasan a la siguiente etapa de remolienda para asegurar la liberación de las partículas de oro.

Los sulfuros de sodio en contacto con cianuro, forman los tiocianatos que reacciona de la siguiente forma:



### **Principio fundamental de la Pre-Aireación**

La Pre-Aireación con cal como etapa previa al circuito de cianuración, consiste en oxidar la Pirita, Pirrotita y otros minerales o concentrados auríferos sulfurados. Para formar fundamentalmente Sulfatos de calcio, Sulfatos de sodio, Hidróxido férrico, Tiofulfato de sodio, Tiosulfato de calcio, Sulfato ferroso, Hidróxido ferroso, etc. como nos indican las ecuaciones químicas N° (58), (59), (60), (61), (62), (63), (64), (65) y (66). En esta etapa es necesario realizar una oxidación, manejando los parámetros principales como: tiempo de Pre-Aireación, pH de Pre-Aireación y concentración de oxígeno. En caso contrario tendremos formaciones de Ferrocianuros, Tiocianatos, etc, que consumen innecesariamente cianuro y también producen interferencias en la disolución del oro.

En el Perú, específicamente en Minera Aurífera Calpa, Villanueva, en 1988 introdujeron algunos de estos Pre-Tratamientos tales como el lavado, el Pre-Aireado con cal, y la

adición de sales de plomo llevando esto incluso con éxito a escala inicial. Asimismo se corrió una serie de pruebas para introducir el lavado ácido del cobre, adición de agentes aceleradores y otros tratamientos pirometalúrgicos, como el tratamiento de las calcinas, quedando esto sólo a escala de laboratorio. Esta investigación se realizó a solicitud de la gerencia de operaciones debido a que con el cambio en la zona de minado la recuperación en la planta de cianuración había bajado de 90 % a 79.25 % (Set. 1987) por la presencia de cianicidas y por el gasto excesivo de cianuro que aumentó de 6 kg/t a 13 kg/t de concentrado en promedio. Debido a esto se corrió una etapa de múltiples pruebas a nivel laboratorio y en la misma planta. Se logró aumentar la recuperación en el circuito de cianuración a 87 % y disminuir el consumo de cianuro de sodio a 5 kg/t.

Tremolada, presentó en Junio de 1993 un trabajo sobre la aplicación de algunas variantes hidrometalúrgicas tales como el uso de agentes oxidantes (peróxido de calcio y peróxido de hidrógeno), agentes acomplejantes (hidróxido de amonio) para el Pre-Tratamiento de concentrados sulfurados de Mina Calpa.



Asimismo incluyó en este trabajo la aplicación del lavado y la Pre-Aireación alcalina, variantes que se habían introducido por Villanueva desde 1988 en esa misma empresa.

La mayoría de las plantas en el Perú atacan la refractariedad de los minerales sólo desde el punto de vista de la remolienda. En este aspecto han presentado trabajos Pérez, y Barrios, A excepción de Minera Calpa, no se conocen otras plantas en las que se estén aplicado Pre-Tratamientos hidrometalúrgicos económicos.

## **CAPITULO V**

### **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

#### **5.1 INTRODUCCIÓN**

La muestra que es materia de estudio, es un mineral refractario que contienen una ley promedio de 19,3 g Au/t, fundamentalmente de arsenopirita y pirita, proveniente de la Mina Cerro Extraña, zona de Calientes, provincia de Candarave, departamento de Tacna. Las pruebas metalúrgicas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Metalurgia de la UNJBG.

#### **5.2 MATERIA PRIMA**

El mineral es muy duro, peso específico alto, debido a su contenido metálico es muy complejo, tiene abundante presencia de sulfuros principalmente arsenopirita y pirita, en menor proporción pirrotita, calcopirita y esfalerita, probablemente tenga sulfosales del grupo de la

tetraedrita, no se aprecia oro libre, el cual debe estar asociado a la pirita y arsenopirita, la ganga no metálica lo constituye el cuarzo e insolubles.

## LEYES

TABLA VIII. Ley del mineral refractario

<b>Leyes</b>		
Au	Ag	Ar
g/t	Oz/t	%
19,30	0,40	0,80

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

### 5.3 CARACTERIZACIÓN MINERALÓGICA

El mineral es refractario, presenta abundante contenido de sulfuros: arsenopirita, pirita y pirrotita, en menores proporciones: calcopirita, esfalerita y probablemente sulfosales que aportan: plata, arsénico y antimonio, no se aprecia oro libre.

### 5.4 EQUIPOS Y MATERIALES

- Chancadora
- Molino de bolas
- Mallas y reactivos químicos

- Agitadores ovalados
- Incubadora
- Microscopio
- Balanzas electrónicas
- Potenciómetro digital
- Agitadores magnéticos con variación de Temperatura y velocidad (RPM)

## **5.5 PRUEBAS EXPERIMENTALES**

### **5.5.1 Pruebas Aislamiento, cultivo y conservación**

Las cepas fueron activadas del mismo mineral refractario, después se aislaron las cepas de *Thiobacillus ferrooxidans*, las que se cultivo y se inoculo para la oxidación del mineral.

El cultivo sólido se realizó en cajas petri, utilizando un volumen de 25 ml. de medio FeTSB (1) y se ajustó el pH a 2 con ácido sulfúrico concentrado.

En los cultivos líquidos se utilizó matraces Erlenmeyers de 125 ml, se colocó un volumen de 50 ml de medio 9K (1) y se ajustó el pH a 2 igualmente con ácido sulfúrico concentrado, se

agitó a 150 rpm, en un agitador orbital (THERMOLYNE) durante 15 días.

La siembra en los dos casos se realizó en condiciones asépticas utilizando cámara de flujo laminar (ESCO) y los materiales fueron previamente autoclavados (394 °K, 20 min) y sometidos a 20 min. de radiación UV antes de la inoculación.

La conservación de muestras seleccionadas congeladas se realiza en criotubos. Se prepara una solución crioprotectora de glicerol al 10 % filtroesterilizada más una solución de medio 9K , la solución glicerolmedio 9K se esteriliza en autoclave (394 °K, 15 min.), los microorganismos a congelarse se siembran en tubos de agar inclinado. La solución crioprotectora es añadida a los tubos de agar y medio líquido, el cultivo es resuspendido por raspado de las colonias y agitación respectivamente, luego se coloca 1,5 ml. de la suspensión a cada criotubo y se guarda a -353 °K en congelador o en nitrógeno líquido.

## **Determinación Crecimiento Bacteriano**

Para determinar la transformación del  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  se prepara una solución de permanganato de potasio 0,1N y se titula sobre 5 ml. de solución extraída de las pruebas en experimentación.

El crecimiento bacteriano se determina tomando 15  $\mu\text{l}$ . de cultivo, se adiciona 5  $\mu\text{l}$ . de azul de lactofenol, se mezclan en un microtubo, la solución se coloca en una cámara de recuento (NEUBAUER) y se cuantifica el número de bacterias contenidas en 5 campos, el valor resultante y recalculado nos da el número aproximado de bacterias por mililitro de cultivo.

## **PROCEDIMIENTO**

### **A. Mineral y Muestreo**

El mineral refractario fue muestreado de la mina “ Cerro Extraña”. Se realizó tres muestreos de 8 a 10 kilos de mineral, se tomó minerales de tamaño promedio de 9 cm, para su fácil transporte y procesamiento en el laboratorio de la Escuela de Metalurgia y Laboratorio de Microbiología -UNJBG – Tacna.

## **B. Aislamiento e identificación del microorganismo**

### **lixivante (Iy, 2007):**

- Se realizó siguiendo la secuencia siguiente:
- Cultivo de enriquecimiento.
- Cultivo de aislamiento de microorganismos lixiviantes.
- Identificación de microbios lixiviantes aislados.

#### **B.1. Cultivo de enriquecimiento**

Se tomó aproximadamente 1 kilogramos del mineral triturado mecánicamente en el laboratorio de FAME para ser sumergido en 3 litros de medio 9K líquido, a pH 2,0, en un recipiente de 5 litros de capacidad, no fue necesaria la esterilización. Se incubó el recipiente 15 días a Temperatura ambiente.

## **B.2. Cultivo de Aislamiento de los microbios lixiviantes**

Se preparó medio 9K sólido modificado, este medio se vertió 15 ml en placas Petri, se dejó solidificar, luego se incorporó 0,1 ml del cultivo de enriquecimiento y sembrado con ayuda de una asa de Drigalsky por extensión, las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 a 20 días, tiempo en que aparecieron colonias bacterianas y fúngicas a las cuales se le observó en el microscopio y coloreó con Gram. Las colonias microbianas aisladas cada 15 días se les preservó mediante subcultivos en placas Petri manteniéndolos a temperatura ambiente, ya que estos cultivos no pueden ser preservados a 278.°K como ciertas bacterias ya que pierden su acción biolixivante (Acevedo, 2005).

## **B.3. Identificación de los microbios lixiviantes Aislados**

Del medio 9K sólido se obtuvo colonias pequeñas de 0,1 – 0,4 mm de diámetro de color rojizo por la biooxidación de hierro que ejercen, característica que lo diferencia de *A. thiooxidans* (bacteria similar a *A. ferrooxidans* al microscopio). En el microscopio con el objetivo a inmersión se observó que algunas colonias eran bacilos Gram negativos, estas



características son suficientes para su identificación por la selectividad del medio: es por ello que se concluyó que las colonias aislada son compatibles a *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Bergey, 2005). Del medio 9K sólido también se obtuvo colonias de mohos filamentosos que para su identificación se preparó microcultivos, para su identificación se tuvo en cuenta las claves de identificación de Barnett y Hunter, 1998; en el cual lo caracteriza como moho de conidióforo presenta prolongaciones <sup>140</sup> divergentes que *Penicillium*, presenta conidios (fialosporas) en cadenas, hialino, con cadenas sueltas, no como *Penicillium* en forma de cepillo, la identificación como microorganismo biolixivante se evidencio por su capacidad biooxidante de hierro al presentar colonias de color rojizo, por los que las características descritas son compatibles a *Paecilomyces*.

### **Preparación de Inóculo microbiano para las pruebas de biolixiviación. (Nuñoz, 1993)**

La preparación de inóculos microbianos se realizaron para las pruebas de biolixiviación en matraces de 500 ml con

agitación constante. Se realizó de la siguiente manera (Anexo 02 por 1):

Preparación de inóculo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* M-UNJBG

### **C.1. Preparación de Inóculo de *A. ferrooxidans* M-UNJBG 1**

Se tomó una azada de la colonia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* de una placa <sup>141</sup> en medio 9K sólido modificado y se le colocó en un tubo de ensayo con 10 ml de medio de cultivo 9K. Se incubó a 298 °K por 10 a 15 días, posteriormente se tomó los 10 ml de medio incubado y se le vertió en un recipiente (balde) con 250 ml de medio líquido 9K para que se incubara a 298 °K por 15 días, tiempo en el cual llegó a una concentración de  $2,5 \times 10^8$  bact/ml, que fue determinada aplicando el método de recuento en microplaca, y se le calculó su constante de crecimiento y su tiempo de generación.

#### ***Método de recuento en microplaca (JUNAC, 1989 y Juarez, 2004)***

Se tomó una muestra de 1 ml del balde con 250 ml del medio líquido 9K incubado y se le diluyó a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$

en tubos con medio líquido 9k a partir de los cuales 0,3 ml se sembraron en cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos de 0,3 ml de capacidad. Se sembró tres pocillos por dilución en total 12 pocillos.

La microplaca se incubó a temperatura ambiente por 15 días, luego se realizó la lectura de los pocillos en la microplaca considerando como positivos a aquellos donde hubo la presencia de una determinada cantidad de microorganismos con actividad oxidante del  $\text{Fe}^{+2}$  a los que se le evidenció por la presencia de un color rojizo y como negativos a aquellos en donde hubo ausencia de actividad oxidante del  $\text{Fe}^{+2}$  a los que se le evidenció ausencia de cambio de color (falta de viraje de color blanquecino a color rojizo). Se contó el número de pocillos positivos y negativos por dilución en las cuatro diluciones; luego sólo se consideró los conteos de tres diluciones consecutivas que incluyeran la más alta dilución con los más bajos conteos. Posteriormente los conteos de estas diluciones se confrontaron con los valores de la columna de grupo de

número de la Tabla de Mc Grady del NMP (Anexo 01) para determinar el valor del NMP correspondientemente presente en la misma tabla de Mc Grady. Finalmente el valor de NMP fue reemplazado en la fórmula siguiente:

$$\text{Bact/ml} = \text{NMP/Dilución}$$

Donde: NMP = valor encontrado en Tabla de Mc Grady, y Dilución= factor de dilución; esto para determinar el número de microorganismos por mililitro de la muestra.

Cuando se determinó el número de microorganismos por mililitro de muestra; si esto se obtuvo preparando un mayor número de diluciones superior a  $10^{-3}$ , el inverso de la última dilución es multiplicado al número de microorganismos por mililitro de muestra encontrado con la fórmula; si solamente se prepararon tres diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , y  $10^{-3}$ ), entonces el número de microorganismos por mililitro de muestra es encontrado sólo con la aplicación de la fórmula sin necesidad de multiplicarlo con otro valor.

#### **D. Preparación del medio fermentativo para la biolixiviación (Muñoz, 1993)**

Se realizó la molienda del mineral refractario y fue pasado por malla 43 micrones para las pruebas. El mineral tamizado luego se colocó en 250 ml de medio de cultivo líquido 9K acidificado a 2 de pH con ácido sulfúrico 10N. El medio luego fue agitado en forma intermitente durante 05 horas para un buen mezclado del medio con ayuda de un agitador mecánico BALDES INDUSTRIAL, a 200 rpm con movimientos horizontales, según (Muñoz, 1993).

#### **E. Biolixiviación en frascos de vidrio. (Muñoz, 1993)**

La biooxidación se realizó en matraces de vidrio de 500 ml a temperatura ambiente, en agitación; para *Acidithiobacillus ferrooxidans M-UNJBG 1*, con inóculos de 13,8 y 27,7 ml con una concentración de  $7,9 \times 10^6$  bact./ml; la agitación tanto para el moho como para la bacteria se realizó 6 a 7 horas diarias (Anexo 03). El proceso fue evaluado cada 24 horas durante 336 horas; para la evaluación se tomó muestras de 5 ml; se

hizo: conteo bacteriano por el método de recuento por microplaca, determinación de pH con una cinta indicadora de escala de 1 – 14 de pH, determinaciones de Fe total, Fe<sup>+2</sup> y Fe<sup>+3</sup> (método del colorímetro).

## RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EXPERIMENTALES

TABLA IX. Configuración de parámetros para la biooxidación de minerales refractarios con *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Parámetros	Ensayos				
	I	II	III	IV	V
Inóculo	0 %	10 %	10 %	15 %	15 %
Inóculo inicial	---	1,3x10 <sup>8</sup>	1,3x10 <sup>8</sup>	1,3x10 <sup>8</sup>	1,3x10 <sup>8</sup>
Sustrato (mineral)	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
Agitación	SI	SI	SI	SI	SI
Aireación	NO	NO	SI	NO	SI
Temperatura	298°K	298°K	298°K	298°K	298°K
<sup>u</sup> Volumen	250 ml	250 ml	250 ml	250 ml	250 ml
<sup>e</sup> Medio de cultivo	9K	9K	9K	9K	9K

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

TABLA X. Evaluación del crecimiento bacteriano (Cuadro N° 9).

Tiempo	E - I	E - II	E - III	E - VI	E - V
0	12,3	12,3	13,0	12,6	12,6
24	12,5	12,1	12,8	12,3	12,3
48	12,5	12,1	13,1	12,5	12,8

72	13,8	12,3	13,8	13,5	13,8
96	13,6	13,0	14,5	13,8	15,2
168	14,0	15,0	15,6	15,4	16,2
192	14,2	15,8	16,5	16,5	16,5
216	14,8	17,1	17,7	18,3	18,0
240	15,0	17,8	18,5	18,5	19,2
264	14,5	18,0	19,0	19,1	19,5
336	15,2	18,3	19,7	19,0	20,0
360	15,6	19,0	20,4	20,0	21,0

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

TABLA XI. Efecto del pH en la biooxidación del mineral refractario

Tiempo	pH I	pH II	pH III	pH IV	pH V
0	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
24	1,9	2,0	1,9	1,9	1,9
48	1,8	1,9	1,8	2,0	2,1
72	1,8	2,3	1,8	1,9	1,8
96	1,8	2,1	1,8	1,9	1,8
168	1,7	2,2	1,7	1,8	1,7
192	1,6	2,4	1,6	1,8	1,6
216	1,6	2,4	1,7	1,7	1,6
240	1,6	2,5	1,6	1,7	1,5
264	1,5	2,5	1,5	1,7	1,5
336	1,5	2,5	1,4	1,6	1,4
360	1,5	2,5	1,4	1,6	1,4

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia de UNJBG.

TABLA XII. Influencia de la concentración  $Fe^{+3}$  por *Thiobacillus ferrooxidans*

Tiempo	% $Fe^{+3}$ - I	% $Fe^{+3}$ - II	% $Fe^{+3}$ - III	% $Fe^{+3}$ - IV	% $Fe^{+3}$ - V
0	5	5	8	5	10
48	3	10	10	8	25
96	5	20	30	30	40
168	7	25	35	34	55
216	9	33	45	42	77

264	8	40	60	53	85
336	7	50	68	83	84
360	10	60	80	82	85

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

TABLA XIII. Influencia de la concentración  $Fe^{+2}$

Tiempo	% $Fe^{+2}$ - I	% $Fe^{+2}$ - II	% $Fe^{+2}$ - III	% $Fe^{+2}$ - IV	% $Fe^{+2}$ - V
0	100	100	100	100	97
48	99	95	95	95	80
96	99	80	70	68	60
168	98	70	60	62	45
216	96	60	50	54	30
264	98	50	35	45	15
336	96	40	33	21	19
360	94	38	20	20	15

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

## 5.5.2 Pruebas de cianuración

### 5.5.2.1 Lixiviación con cianuro sin pre-tratamiento

En esta etapa de cianuración directa la muestra en estudio fue procesado previo chancado, molienda, se procedió a la lixiviación del oro por agitación en botella en el Laboratorio



de Ingeniería Metalúrgica - UNJBG, bajo las siguientes condiciones operativas:

Condiciones de la prueba:

- Peso mineral (gr) : 250
- Dilución (L/s) : 3/1
- PH Cianuración : 10,5 –11.0
- Tiempo de lixiviación (h) : 6 a 48 horas
- Tamaño de partícula : 80 % -200m

### RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EXPERIMENTALES

A continuación se indica en la tabla un resumen de los resultados obtenidos durante las pruebas de cianuración realizadas a diferentes horas.

TABLA XIV. RESULTADOS DE PRUEBA SIN TRATAMINETO BACTERIAL

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	2,74	11,30	6	80	2,70	10,5 - 11
Ripios (g/t)	17,12					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	3,15	12,95	12	80	3,20	10,5 - 11
Ripios (g/t)	16,8					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	4,33	17,82	24	80	3,80	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,86					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	4,60	18,91	48	80	4,10	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,65					

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de la UNJBG.

### 5.5.2.2 Lixiviación con cianuro con pre tratamiento de biooxidación.

En esta etapa de cianuración la muestra fue sometida a un pre tratamiento de biooxidación (Ver 3.1.1), previo chancado,

molienda, se procedió a la cianuración del oro por agitación en botella en el en el Laboratorio de Ingeniería Metalúrgica - UNJBG, bajo las siguientes condiciones operativas:

Condiciones de la prueba

- Peso mineral (g) : 250
- Dilución (L/s) : 3/1
- pH Cianuración : 10.5 –11.0
- Tiempo de lixiviación (h) : 6 a 48 horas
- Tamaño de partícula : 80 % -200m

#### **Procedimientos de cianuración.**

El mineral que fue molido y secado teniendo una distribución de tamaño con un d80 de 74  $\mu\text{m}$ . Cada prueba de lixiviación se uso 250 gr de mineral más 750 ml de solución de lixiviación (25.% de sólidos en peso) en una botella de 2,5 litro y a temperatura ambiente ( $298^{\circ} \pm 275^{\circ}\text{K}$ ). La pulpa fue agitada a 65 rpm con un agitador de acero. Se consideraron 4 pruebas a diferentes tiempos de 6; 12; 24 y 48 horas de tratamiento.

### **Pruebas de cianuración**

Todas las pruebas de cianuración se efectuaron bajo idénticas variables, excepto el tiempo de lixiviación, Se tomó concentraciones de cianuro y cal de: 1,00 **g/l** y 2,0 **g/l** respectivamente. Un pH promedio de 10,5- 11,00 y un contenido de sólidos en la pulpa de 25 %. La agitación a la que se sometió

### **Procedimiento**

Todas las pruebas de cianuración se realizaron siguiendo básicamente el mismo procedimiento, el cual describimos a continuación.

1. Se coge una cantidad de material mayor de la que se va a utilizar en la prueba. Se cuartea bien y se separa unos 150.gr para calcular la ley de cabeza (Tenor). Se realiza un ensayo al fuego.

2. Se pesa la cantidad de material a utilizarse, se coloca dentro de las botellas de agitación y se agrega la cantidad necesaria de agua para obtener la densidad de pulpa que se va a utilizar.

3. Se agita la pulpa por 15 minutos y luego se mide el pH. Para la medición del pH se saca un poco de pulpa con un beaker de 40 ml y se filtra. Luego se mide el pH del filtrado mediante un pH-metro.

4. Se agrega la cantidad de cal necesaria para elevar el pH a un valor apropiado para la cianuración.

La cantidad de cal a agregarse se la determina experimentalmente. Es decir, se agrega la cal, se mide el pH, y se mide hasta que el pH este entre 10,5 y 11.

5. Se filtra un poco de pulpa, se coge 5ml de filtrado y se titula la cal; se compara la concentración de cal de la pulpa con la concentración requerida para la prueba. Si la concentración de cal en la pulpa es menor a la deseada se agrega la cantidad de cal necesaria para mantener la concentración óptima. Se devuelve la solución restante.

6. Inmediatamente se agrega el NaCN necesario para mantener la concentración del mismo, que se requiere

para la prueba. Se inicia la agitación y se da inicio a la cianuración.

7. Luego de culminada la prueba. Se deja asentar el sólido y se saca el líquido, luego se realiza un ensayo al fuego de este, con 300ml de líquido se realiza una prueba de Chiddey, se funde, se copela y se mide de la misma forma.
8. Se calcula la disolución de oro comparando la disolución con el tenor.

### RESULTADOS DE PRUEBAS EXPERIMENTALES

A continuación se indica los resultados de la prueba N° 1; 2; 3; 4 y 5 el resumen de los resultados obtenidos durante las pruebas de cianuración realizadas a diferentes horas.

TABLA XV. RESULTADOS DE LA PRUEBA N° 1:

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	2,74	11,30	6	80	2,65	10,5- 11
Ripios (g/t)	17,12					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	3,15	12,95	12	80	3,10	10,5 - 11
Ripios (g/t)	16,8					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	4,33	17,82	24	80	3,71	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,86					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	4,85	19,95	48	80	3,98	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,45					

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de la UNJBG.

TABLA XVI. RESULTADOS DE LA PRUEBA N° 2

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	3,27	13,47	6	80	2,20	10,5 - 11
Ripios (g/t)	16,7					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	5,04	20,73	12	80	2,71	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,3					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	6,30	25,91	24	80	3,21	10,5 - 11
Ripios (g/t)	14,3					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	7,14	29,38	48	80	3,30	10,5 - 11
Ripios (g/t)	13,63					

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

TABLA XVII. RESULTADOS DE LA PRUEBA N° 3

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	4,97	20,47	6	80	1,84	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,35					



Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	8,07	33,21	12	80	2,10	10,5 - 11
Ripios (g/t)	12,89					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	15,50	63,78	24	80	2,65	10,5 - 11
Ripios (g/t)	6,99					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	16,46	67,72	48	80	2,78	10,5 - 11
Ripios (g/t)	6,23					

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

TABLA XVIII. RESULTADOS DE LA PRUEBA N° 4

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	4,33	17,82	6	80	1,78	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,86					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	7,25	29,84	12	80	2,30	10,5 - 11
Ripios (g/t)	13,54					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	13,42	55,23	24	80	2,80	10,5 - 11
Ripios (g/t)	8,64					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	14,09	57,98	48	80	2,90	10,5 - 11
Ripios (g/t)	8,11					

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

TABLA XIX. RESULTADOS DE LA PRUEBA N° 5

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	5,39	22,18	6		1,95	10,5 - 11
Ripios (g/t)	15,02					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	9,25	38,08	12		2,54	10,5 - 11
Ripios (g/t)	11,95					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	18,86	77,62	24		2,97	10,5 - 11
Ripios (g/t)	4,32					

Producto	Au	% Recup.	Tiempo Cianuración (Horas)	% -m 200	Consumo NaCN Kg/t	pH
Cabeza (g/t)	19,3					
Sol. Rica (mg/l)	21,29	87,62	48		2,98	10,5 - 11
Ripios (g/t)	2,39					

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

## CAPITULO VI

### ANALISIS DE RESULTADOS

#### 6.1 Resultados de la biooxidación

En la Figura 3, se observa una clara diferencia en la velocidad de crecimiento entre los ensayos con aireación y si ellos, obteniendo un mayor crecimiento en los ensayos con aireación y mayor Inóculo.

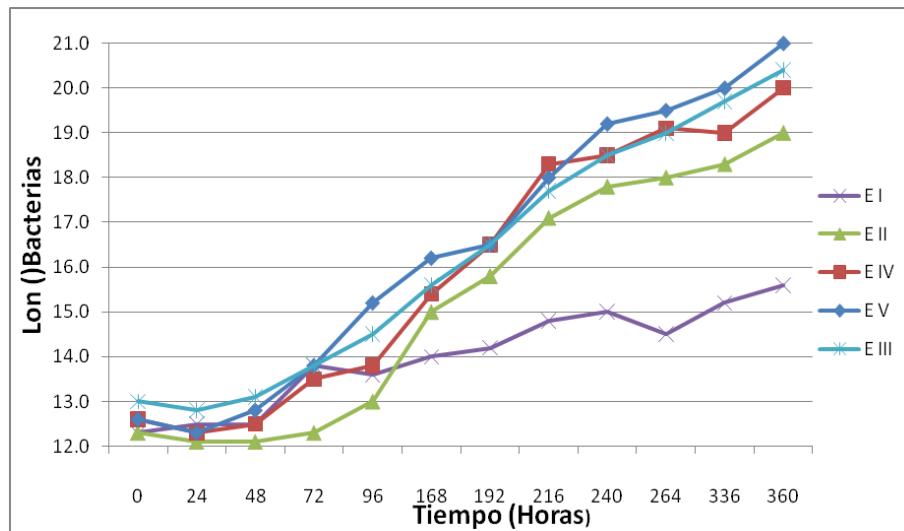


Figura 3. Crecimiento bacterial con respecto al tiempo

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

En la Figura 4, se muestra la variación de pH, en los ensayos se observó el cambio de acidez esperada, mas aun en el ensayo V, fue la que tuvo mayor cambio en la acidez y por ende mayor biooxidación.

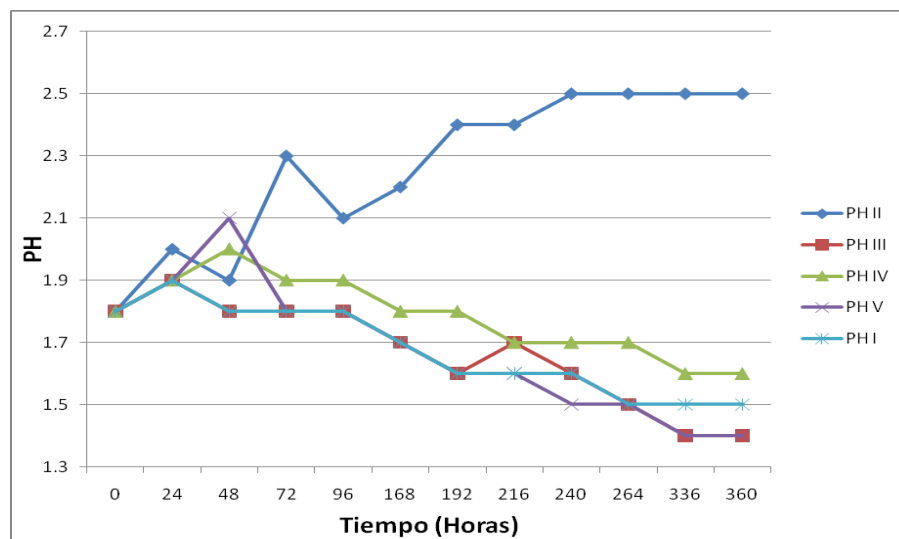


Figura 4. Efecto del pH con respecto al tiempo y su relación con la biooxidación del mineral.

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

En la Figura 5, se observa el aumento  $\text{Fe}^{+3}$  cuando hay oxidación del hierro ferroso por el consorcio bacteriano a bajos pH, la mayor oxidación se obtuvo en el ensayo V con un valor de 87,8 %, y el menor fue en el ensayo II con 36,5 %, este con respecto al  $\text{Fe}^{+2}$  del medio de cultivo.

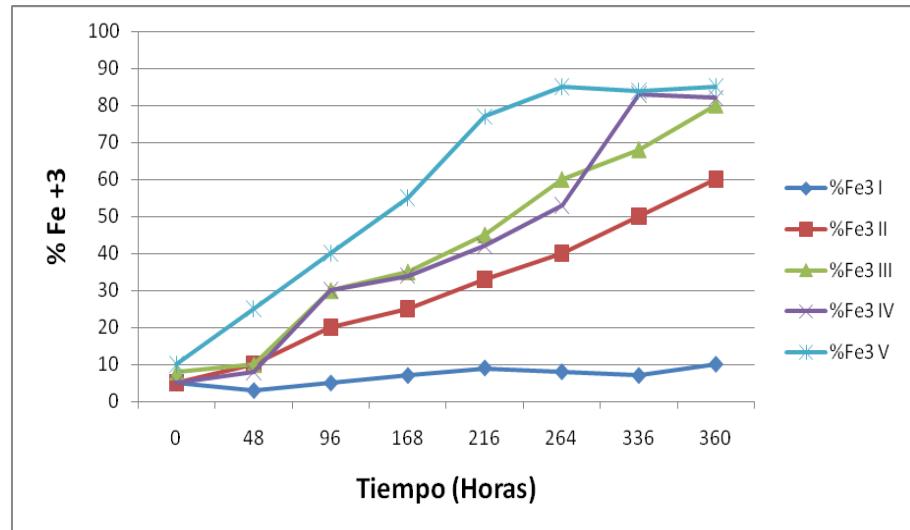


Figura 5. Biooxidación de hierro con *Thiobacillus ferrooxidans* M-UNJBG 1

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

En la figura 6, se ve la concentración de  $Fe^{+2}$  como disminuyendo mientras va aumentando la concentración de  $Fe^{+3}$ , en este caso va complementado con la grafica anterior en donde se distingue un comportamiento muy correlacionado siendo el que mas a disminuido la concentración de  $Fe^{+2}$  en el ensayo V.

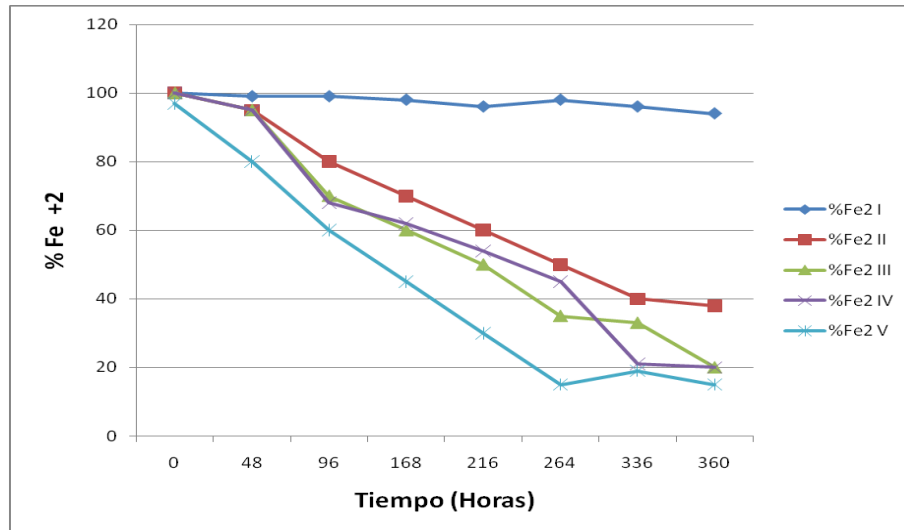


Figura 6. Biooxidación de hierro con *Thiobacillus ferrooxidans*  
M-UNJBG 1

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

## 6.2 Lixiviación con cianuro sin y con pre tratamiento de biooxidación

Seguidamente presentaremos los resultados de los ensayos con y sin tratamiento que se considero para las pruebas de cianuración y el análisis de lixiviación con y sin pre-tratamiento del mineral refractario.

TABLA XX. Cinética de disolución del oro a diferentes condiciones de tratamiento

	Prueba sin tratamiento	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5
Tiempo Horas	Recuperación (%)	Recuperación (%)	Recuperación (%)	Recuperación (%)	Recuperación (%)	Recuperación (%)
6	11,30	11,30	13,47	20,47	17,82	22,18
12	12,95	12,95	20,73	33,21	29,84	38,08
24	17,82	17,82	25,91	63,78	55,23	77,62
48	18,91	19,95	29,38	67,72	57,98	87,62

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

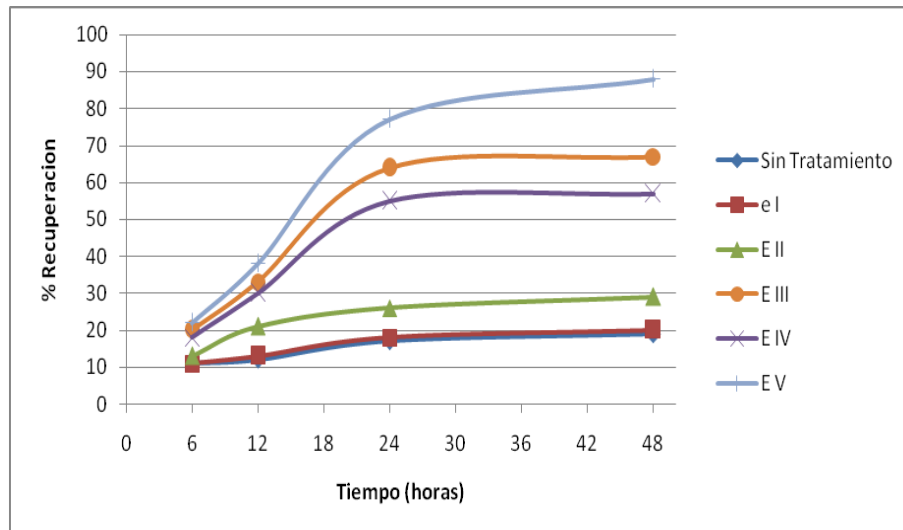


Figura 7. Cinética de disolución del oro a diferentes condiciones de tratamiento

Fuente: Datos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

Se muestra en la tabla XIV y Figura 7, la recuperación de oro en función del tiempo de cianuración, al variar la velocidad de crecimiento entre los



ensayos con aireación y si ellos; obteniendo un mayor crecimiento en los ensayos con aireación y mayor Inóculo, logrando la máxima recuperación 87,67 % para el ensayo E-V donde se considera la aireación y mayor inóculo, lo mismo ocurre para el ensayo E-III.

Además se observa que no se alcanza buenas recuperaciones de oro en casos extremos cuando no hay agitación y inoculación, recuperaciones que varían entre 18 al 29 %.

## CONCLUSIONES

Como principales conclusiones del presente trabajo de investigación, se puede indicar lo siguiente:

1. Los microorganismos reconocidos en el cultivo del biorreactor fueron: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum*, bacteria similar a *Acidithiobacillus caldus* y *Archaeobacteria* (posiblemente *Ferroplasma*). El aislado, identificado y caracterizado en el presente trabajo es *acidithiobacillus ferrooxidans*, este microorganismo actúa en la biooxidación de la arsenopirita.
2. En el crecimiento bacteriano en el mineral refractario en las diferentes condiciones de pruebas (fig. 3) se observa una relación similar hasta la segunda semana a partir de la cual se distingue mayor diferencia de crecimiento en la muestra, en la semana final existe un crecimiento acelerado hasta el día 15.
3. La variación de pH entre 2,5 a 1 se relaciona con los cambio de acidez lo que indica que la mayor biooxidación del mineral refractario se logró en las pruebas III y V (ver Figura 4).

4. En la Figura 5, se observa el aumento  $\text{Fe}^{+3}$  cuando hay oxidación del hierro ferroso por el consorcio bacteriano a bajos pH, la mayor oxidación se obtuvo en el ensayo V con un valor de 87,8 %, y el menor fue en el ensayo II con 36,5 %, este con respecto al  $\text{Fe}^{+2}$  del medio de cultivo.
5. La cinética de disolución del oro a diferentes condiciones de tratamiento son verdaderamente significativas (Figura 7).
6. En la recuperación de oro al variar los parámetros con la aireación y mayor inóculo, se logra una máxima recuperación 87,67 % a las 48 horas (Ensayo E-V), lo mismo ocurre para el ensayo E-III llegando a obtener 68 % de recuperación a las 48 horas.
7. El mineral refractario sin tratamiento tiene baja recuperación no superior al 20 % además el consumo de cianuro es mayor (4,1 kg/t) que las pruebas realizadas con pre tratamiento (2,98 kg/t).

## RECOMENDACIONES

1. Es recomendable con la experiencia de biooxidación realizada con el mineral arsenopirita refractaria de la zona de Candarave, se puede lograr mejores recuperaciones con un cultivo mixto.
2. Se recomienda que no sera necesario la inoculacion externa ya que el mineral manifiesta tener actividad bacterina, en ese sentido, esta experiencia ha dejado como linea derivada, la posibilidad de aislamiento de baterias nativas a partir del mineral de la zona de Candarave.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, Fernando; 2005, Fundamentos y Perspectivas de las tecnologías Biomineras, Edición universitaria de Valparaíso, Chile, pag.25-35.
- Bañuelos, S. y Castillo, P. (1993). Recuperación de Metales Preciosos a Partir de Sulfuros Minerales Refractarios, utilizando el proceso de Lixiviación Bacteriológica. Geomimet. Nº 184. pp. 9-18.
- Barrios G., Importancia del Control de Molienda en Minerales Auríferos. Taller de Metalurgia Extractiva. Tecsup. Lima, 1992.
- Canseco D.E., Metalurgia del oro y la plata. Editorial UNI, Lima – Perú, 1978. Pp 44 – 147
- Gardiner R.L., 1933. Trans. Am. Inst. Min. Engrs, 42 :251
- Juarez, A; 2004, Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados, Tesis Doctorado, Universidad de Colima, México.
- JUNAC, 1989; Primer seminario sobre Bio Hidro metalúrgicas, Junta de Cartagena, Sede Lima, Perú.

Lemmon, R.J. 1933. Discussion by French , J.H. and Jones, H. Reduction Works practice at Morro Velho, Brazil. Trans. Inst. Min. Met, 42 :247 – 251.

Ly, M; 2007, Microorganismos implicados en procesos bio-hidrometalurgicos, UPCH, Peru.

Macassi, J. Y Rivas, E. Nueva técnica hidrometalúrgica, para mejorar la extracción de oro en materiales piríticos. I Simposio Internacional de Metalurgia. Tecsup- Lima, 1989.

Márquez M., Muñoz A., Gaspar J.C. 2002. Oxidación bacteriana de sulfuros para el aumento en la recuperación de oro en menas refractarias. Memorias del Primer Simposio Sobre Biofábricas. Biología y Aplicaciones de la Célula Cultivada. Medellín, Universidad Nacional.

Muñoz. J, 1993, Estudio de la Biolixiviación de Mineral Español (Tesis Dr), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, España.

Nagy, I, Mrkusic, P. y Mcculloch, H.W. “Chemical Treatment of Refractory Gold Ores”. National Institute for Metallurgy, Ran burg – South Africa . 124,1966.

Ponciano, F.J., Tratamiento de materiales refractarios conteniendo metales preciosos por métodos convencionales y no convencionales. I Simposium Internacional de Metalurgia. Tepsup. Lima, 1989.

Ralston, O.C. et al, Reducing and oxing agents and lime consumption inflation pulp. Trans , Am .Inst. Min. 1930, Engrs,87 : 369 – 383.

Tremolada, J. Optimización del Proceso de Recuperación de Oro por Cianuración Mediante Variantes Hidrometalúrgicas en el Tratamiento de Concentrados Piritosos Refractarios. II Simposium de Geología, Minas y Metalurgia del oro. Lima – Perú, 1993.

Villanueva, R.; Alvarado, H. y Vitteri, J., Informes de los Estudios Realizados en la Planta de Cianuración Mina Calpa, 1988.

## ANEXOS

### ANEXO 01

Tabla de Mc. Grady para recuento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

M – UNJBG 1

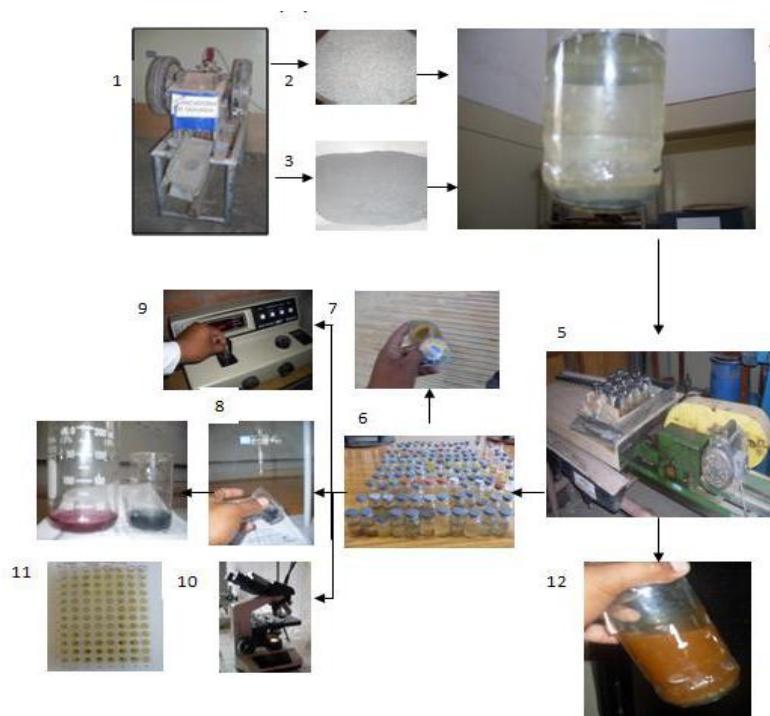
Tabla de NMP (3 TUBOS)					
Grupo de Nro.	NMP	Grupo de Nro.	NMP	Grupo de Nro.	NMP
001	0,3	201	1,4	301	4
010	0,3	202	2	302	6,5
011	0,6	210	1,5	310	4,5
020	0,6	211	2	311	7,5
100	0,4	212	3	312	11,5
101	0,7	220	2	313	16
102	1,1	221	3	320	9,5
110	0,7	222	3,5	321	15
111	1,1	223	4	322	20
120	1,1	230	3	323	30
121	1,5	231	3,5	330	25
130	1,6	232	4	331	42
200	0,9	300	2,5	332	110

Fuente: JUNAC, 1989



## ANEXO 02

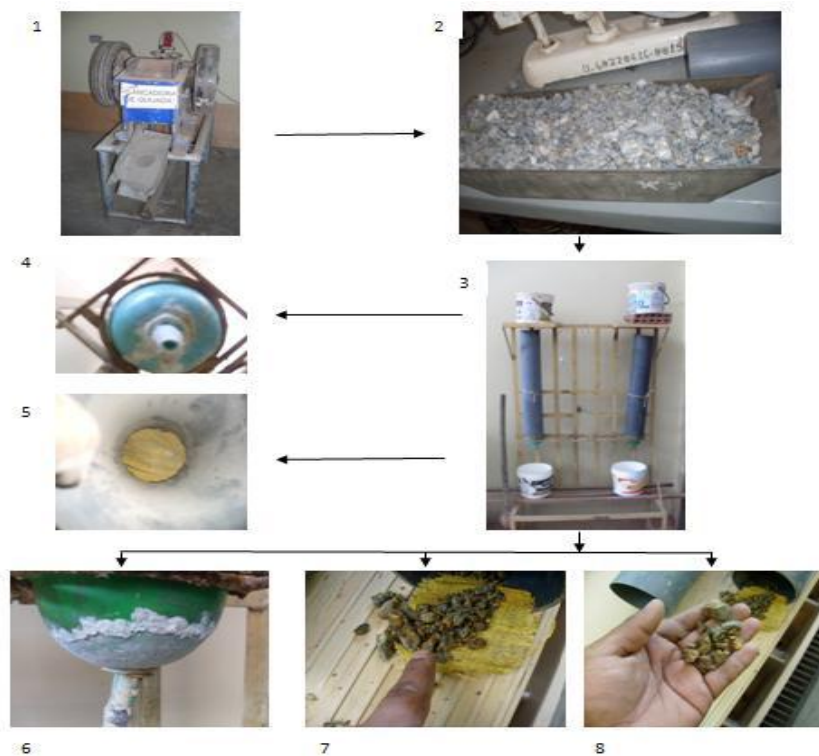
Fotos de los diferentes pasos realizados para efectuar la experimentación de la biooxidación de mineral refractario de oro en frascos de vidrio:(1) Chancado del mineral,(2) y (3) Tamaño partículas del mineral 0,5 y 0,18;(4) Pruebas con inóculo y pH ajustado; (5) Agitador mecánico; (6) Muestras tomadas; análisis: (7)pH, (8) Oro, (9) Hierro, (10) Recuento esporas de *Paecilomyces* MV-UNJBG 2, (11) recuento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* MV-UNJBG 1;(12), Final de pruebas de biolixiviación.



Fuente: Fotos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.

### ANEXO 03

Fotos de los diferentes pasos realizados para efectuar la experimentación de la biooxidación de mineral refractario de oro en columna de lecho fijo de pre colación : (1) Chancadora, (2) mineral chancado, (3) Sistema de Columna de Percolación, (4) parte anterior de la columna, (5) parte posterior de la columna, (6) Sulfato de oro en la parte anterior de la columna, (7) y (8) Mineral biooxidado después de los 15 días.



Fuente: Fotos obtenidos en Laboratorio de Metalurgia y Microbiología de UNJBG.