



Biblioteca Central  
 Fac. Cs. Exactas  
 U.N.L.P.

**Universidad Nacional de la Plata**

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

**Inmovilización y crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans* sobre diferentes soportes. Uso de bio-películas en la biolixiviación de minerales sulfurados**

TESIS  
 12/995

Tesis doctoral para optar por el título de Doctor en Ciencias Bioquímicas presentada por Pogliani Cristina María

DEDICACION.....  
 ▲.....  
 Fecha 21-08-03.....  
 Inv. B..... Inv..... B. S. 7067


**Pogliani Cristina María**

**Director: Dr. Edgardo R. Donati**

**"Inmovilización y crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans* sobre diferentes soportes. Uso de bio-películas en la biolixiviación de minerales sulfurados"**

El presente trabajo de tesis doctoral se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y en la Cátedra de Introducción a Química de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata

Marzo de 1999

**Agradecimientos:**

A la Facultad de Ciencias Exactas y al CINDEFI por brindarme el lugar físico y equipos para la concreción de este trabajo.

Al Dr Edgardo Donati por su invaluable ayuda en la redacción de la presente tesis y por no bajar los brazos en momentos difíciles.

Al Dr Hector Pascual Tedesco por la oportunidad que me brindo para iniciarme en las tareas de investigación.

Al Dr Horacio Thomas por su apoyo constante para que este trabajo llegara a su termino y por el apoyo que brinda al grupo de biolixiviación.

Al Dr. Gustavo Curutchet por las tareas realizadas en conjunto.

Al Dr. Antonio Lagares por su aporte en los trabajos relacionados con exopolímeros.

A la Dra Marta Vasallo por su colaboración en la interpretación de los espectros.

A la Dra Adela Croce por su aliento permanente.

Al señor Chiche Vinachia por su valioso aporte en la construcción de los equipos de vidrio que se utilizaron en este trabajo.

A las maestras y personal de la Guardería de la UNLP por su dedicación especialmente a Coca, Martita y Vivi.

A todos las personas que trabajaron y trabajan en el grupo de biolixiviación bacteriana.

A mi madre por su entrega para el cuidado de mis hijos.

A todos mis compañeros de Introducción a la Química.

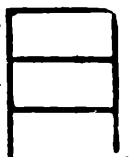
Al personal del CINDEFI

A todas las personas que en momentos muy difíciles estuvieron a mi lado.



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
UNLP

COLOCACION.....  
A .....  
Fecha.....  
Inv. R. .... Inv. .... S.F. 067



*A mi esposo, compañero de ruta*

*A mis hijos*

*A mi madre*

*A Gogui y Lida*

*Al Tío Beto*

## Índice general

Introducción general	1
<b>1</b> Introducción.	5
<b>2</b> Influencia de diversos sólidos en la oxidación de hierro(II) catalizada por <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> .	13
2.1 Introducción	14
2.2 Experiencias realizadas	19
2.3 Conclusiones	42
<b>3</b> Efecto de la precipitación de jarosita en la adherencia de las células de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> .	44
3.1 Introducción	45
3.2 Experiencias realizadas	48
3..3 Conclusiones	69
<b>4</b> Influencia del pH en el crecimiento de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> y en el desarrollo de bio-películas sobre perlas de vidrio.	71
4.1 Introducción	72
4.2 Experiencias realizadas	74
4..3 Conclusiones	93
<b>5</b> Exopolímeros de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> . Efecto en la adherencia de las células.	95
5.1 Introducción	96
5.2 Experiencias realizadas	98
5.3 Conclusiones	107
<b>6</b> Crecimiento de <i>Thiobacillus thiooxidans</i> sobre azufre.	108
6.1 Introducción	109
6.2 Experiencias realizadas	110
6..3 Conclusiones	121
<b>7</b> Biolixiviación anaeróbica de covelita utilizando <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> en presencia de hierro(III).	122
7.1 Introducción	123
7.2 Experiencias realizadas	125
7..3 Conclusiones	132

<b>8</b>	<b>Influencia de exopolímeros en la biolixiviación de covelita.</b>	<b>133</b>
8.1	Introducción	134
8.2	Experiencias realizadas	136
8..3	Conclusiones	141
<b>9</b>	<b>Biolixiviación directa de algunos minerales sulfurados argentinos con agregado de fuentes alternativas de energía.</b>	<b>142</b>
9.1	Introducción	143
9.2	Experiencias realizadas	145
9.3	Conclusiones	160
<b>10</b>	<b>Preparación de reactores con células de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> inmovilizadas sobre diferentes soportes.</b>	<b>161</b>
10.1	Introducción	162
10.2	Experiencias realizadas	164
10.3	Conclusiones	175
<b>11</b>	<b>Formación de reactores con células de <i>Thiobacillus thiooxidans</i> inmovilizadas sobre azufre</b>	<b>176</b>
11.1	Introducción	177
11.2	Experiencias realizadas	178
11.3	Conclusiones	183
<b>12</b>	<b>Biolixiviación indirecta de un mineral (Bajo La Alumbreira) con bacterias inmovilizadas. Comparación con una lixiviación directa</b>	<b>184</b>
12.1	Introducción	185
12.2	Experiencias realizadas	186
12..3	Conclusiones	190
<b>13</b>	<b>Biolixiviación indirecta y combinada de un mineral sulfurado (Capillitas)</b>	<b>191</b>
13.1	Introducción	192
13.2	Experiencias realizadas	193
13.3	Conclusiones	199
	<b>Conclusiones generales</b>	<b>200</b>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La recuperación de diversos metales a partir de minerales sulfurados de baja ley<sup>1</sup> se realiza en varios países del mundo (USA, Australia, Chile, España, etc.) a nivel industrial mediante el proceso denominado lixiviación bacteriana. Este proceso resulta el único rentable para la explotación de variados minerales especialmente cuando se utilizan bacterias autótrofas y mesófilas dentro del género *Thiobacillus*, como *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*, ya que su aplicación requiere escasa infraestructura y muy bajos costos.

De acuerdo a las características del mineral y el valor comercial de los metales a ser extraídos del mismo, variadas metodologías del proceso pueden ser utilizadas. Estas metodologías pueden ir desde tanques agitados cuando el metal a obtener (normalmente, un metal noble como el oro o un metal estratégico como el uranio) justifica los costos, hasta la metodología de “pilas” que son enormes aglomeraciones de mineral a través de las cuales se hace circular el medio lixivante inoculado o no (éste último caso en minerales con bacterias nativas) cuando el metal a recuperar no justifica realizar procedimientos que encarezcan el proceso como molienda, agitación, etc.

En los últimos tiempos, e independientemente de la metodología específica utilizada, se han comenzado estudios de procesos indirectos de lixiviación bacteriana en los cuales no hay contacto directo bacteria-mineral. Esto permite evitar una serie de inconvenientes que conlleva la aplicación de la lixiviación bacteriana por interacción directa entre microorganismos y mineral, entre los cuales se cuentan: inhibición bacteriana parcial o total provocada por las altas concentraciones en los lixiviados de los metales a recuperar o por otras especies minoritarias tóxicas para estos microorganismos, brusca finalización del proceso de disolución por cubrimiento de la superficie del mineral por subproductos sólidos (productos de hidrólisis, azufre, etc.) e imposibilidad de regulación de los

---

<sup>1</sup> Se denomina ley a la proporción entre el mineral útil (mena) y las impurezas o porción inútil para la metalurgia (ganga).

parámetros críticos para el crecimiento bacteriano (niveles de oxígeno disuelto, pH, temperatura, etc.) dentro de la masa del mineral.

Dentro de los procesos indirectos está adquiriendo mayor importancia el uso de bacterias inmovilizadas sobre diversos soportes formando bio-películas. Esto incrementa notablemente el número de bacterias respecto del que habitualmente se consigue en medios líquidos, de manera que se puede producir medio lixivante a una gran velocidad. Las dos especies de *Thiobacillus* habitualmente utilizadas en el proceso pueden producir medio ácido (ácido sulfúrico) y además especies con cierto carácter reductor cuando la fuente de energía es azufre elemental. Mientras que *Thiobacillus ferrooxidans* produce un medio fuertemente oxidante (hierro(III)) cuando la fuente de energía es hierro(II).

Dentro de este marco actualizado sobre el conocimiento de la lixiviación bacteriana, el presente trabajo de tesis doctoral ha sido dedicado precisamente al estudio del problema de la adherencia del *Thiobacillus ferrooxidans* sobre algunos soportes utilizables en la formación de bio-películas (vidrio, silicagel y también ganga de mineral sulfurado que está, por razones obvias, disponible en grandes cantidades en zonas donde pudiera aplicarse el proceso de lixiviación bacteriana) mientras que la adherencia del *Thiobacillus thiooxidans* fue limitada al caso de azufre elemental como soporte y sustrato simultáneamente debido a que este microorganismo no utiliza sustratos solubles de interés en zonas mineras.

El estudio de la adherencia del *Thiobacillus ferrooxidans* fue dirigido inicialmente a la influencia de la presencia de cada uno de los soportes elegidos sobre el crecimiento bacteriano y sobre la evolución de los productos de la acción bacteriana en el cultivo, en particular los insolubles. En una segunda etapa se estudió la importancia de estos depósitos insolubles en la formación de las bio-películas lo que provocó la necesidad de analizar la incidencia del pH inicial del cultivo en la formación de aquellos depósitos y, por ende, en la formación de las bio-películas.

Posteriormente, el estudio estuvo dedicado a la formación de bio-películas de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre los soportes elegidos en columnas percoladoras



analizando la productividad de hierro(III) en función del número de ciclos de crecimiento y de la velocidad de dilución. Paralelamente, se realizó la formación de bio-películas de *Thiobacillus thiooxidans* inmovilizado sobre azufre elemental para la producción continua de ácido sulfúrico.

Antes de realizar estudios para mostrar el uso de las bio-películas formadas sobre la lixiviación bacteriana indirecta de diversos minerales argentinos sulfurados de baja ley (Capillitas, Bajo La Alumbraera, Pachón), se hicieron estudios dirigidos a analizar la recuperación metálica en lixiviaciones directas, la posible acción cooperativa de ambas especies de *Thiobacillus* que pudiera tener lugar, aún con el uso de la metodología de las bio-películas, a través de las bacterias que no quedaran adheridas al soporte y de la influencia de la presencia de alguna fuente alternativa de energía sobre la acción directa de las bacterias.

Posteriormente se tomaron dos de los minerales que presentan una problemática claramente diferenciada que justifica el uso de las bio-películas. En primer lugar, con el mineral de Bajo La Alumbraera, se optó por el uso de una bio-película de *Thiobacillus ferrooxidans* que generara externamente el medio oxidante necesario para lixiviar el mineral evitando la oxidación del hierro(II). Este proceso provoca depósitos que cubren y detienen el proceso de disolución de los sulfuros. En segundo lugar, con el mineral de Capillitas, que presenta una altísima cantidad de especies básicas que provoca un alto consumo de ácido, se mostró el uso simultáneo e indirecto de dos bio-películas, una de *Thiobacillus thiooxidans* capaz de generar ácido sulfúrico para neutralizar aquellas especies básicas y otra de *Thiobacillus ferrooxidans* que generara el mencionado medio oxidante de hierro(III).

Complementan el presente trabajo, estudios sobre aspectos del mecanismo directo de la lixiviación bacteriana. El primero pretendió justificar la poca significativa acción del *Thiobacillus thiooxidans* sobre un sulfuro muy poco soluble comparado con la correspondiente al *Thiobacillus ferrooxidans*. Para ello se analizó la importancia de los exo-polímeros lábilmente unidos a la membrana celular (y de la fuente de energía en la cual previamente han crecido los microorganismos) sobre la adherencia de los *Thiobacillus* y sobre la lixiviación de un sistema modelo como

es la covelita. El segundo estuvo dedicado a comprender el crecimiento anaerobio del *Thiobacillus ferrooxidans* (en contraste con la inexistencia de esta posibilidad para el *Thiobacillus thiooxidans*) cuando está presente algún aceptor de electrones como el hierro(III) y su incidencia en la disolución de sulfuros insolubles en las zonas de muy baja concentración de oxígeno disuelto, situación que se presenta frecuentemente en las zonas por debajo de la superficie del mineral al utilizar la metodología de las pilas.



Las experiencias incluidas en este trabajo de tesis, han permitido varias comunicaciones a diversos congresos y publicaciones en revistas que se detallan a continuación:

1. "Use of packed bed bioreactors. Application to ores bioleaching". Porro S., Pogliani C., Donati E. and Tedesco P. *Biotechnology Letters*, **15** (2), 207-212, 1993.
2. "Anaerobic bioleaching of covellite". Donati E., Pogliani C. and Boiardi J. L. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47**(6), 636-639, 1997.
3. "Bioleaching of sulphide ore by a combined attack with two species of Thiobacilli" Pogliani C., Curutchet G. y Donati E. *5<sup>th</sup> Southern Hemisphere Meeting on Mineral Technology*, pp 253-256, Buenos Aires, Mayo 1997.
4. "The role of exopolymers in the bioleaching of non-ferrous metal sulphide". Pogliani C. and Donati E. Aceptado para su publicación en el *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998.

# **CAPÍTULO 1**

## Introducción

## LIXIVIACIÓN BACTERIANA

### Definición, desarrollo en el tiempo y estado actual

La habilidad de los microorganismos para contribuir a la disolución de minerales ha tenido un gran impacto sobre la industria minera. Como resultado del metabolismo microbiano, depósitos insolubles de metales (usualmente sulfuros metálicos u óxidos metálicos) son convertidos en especies metálicas solubles<sup>1</sup>. El proceso de solubilización mediado por microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) se denomina biolixiviación y ocurre en condiciones naturales donde estos microorganismos crecen asociados a minerales<sup>2</sup>. Específicamente, la lixiviación bacteriana comprende la extracción de iones metálicos o remoción de constituyentes que interfieren en la extracción de elementos metálicos, a través de la intervención directa o indirecta de bacterias<sup>3</sup>.

La biolixiviación a gran escala de minerales de cobre ha tenido lugar en forma natural por siglos. Como proceso de recuperación de metales se lo puede considerar un proceso de baja tecnología, consistiendo esencialmente en la irrigación de minerales de baja ley acumulados en zonas próximas a las excavaciones (dumps, vaciaderos). Estos minerales que se acumulan por las operaciones de cavado de las minas, no son aprovechables por las tecnologías convencionales ya que son mineralógicamente pobres, pero deben ser removidos para poder acceder a las partes ricas de mineralización. Desde el comienzo de los años sesenta el proceso de recuperación de cobre fue más eficiente, ya que el mineral fragmentado (a veces de tamaño adecuado) es apilado en terrenos especialmente preparados. La cima de estas pilas es irrigada con solución acidificada que puede contener bacterias si es que estas no se encuentran naturalmente en el mineral; a esta metodología se la denomina biolixiviación en pila<sup>4</sup>.

La lixiviación bacteriana ha sido dirigida tradicionalmente a la recuperación de ciertos metales asociados como sulfuros en los minerales: cobre, cobalto, níquel, cinc y

---

<sup>1</sup>Rawlings, D. E. and Silver S. 1995. "Mining with Microbes". *Biotechnology* 13, 773-778.

<sup>2</sup>Torma, A. E., Wey, J. E., Lakshmanan, V. I., Apel, M. L. and Brierley, C. L. (ed.). 1993. *Bioleaching Processes*, TMS, Warrendale, 769-770.

<sup>3</sup>Agate, D. A. 1996. "Recent Advances in Microbial Mining". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12, 487-495.

otros. En la sección siguiente se describirán los mecanismos involucrados en estos procesos. Sin embargo, posteriormente se descubrió que los minerales de uranio también podían ser beneficiados con la acción bacteriana<sup>5</sup>. En la década del ochenta, se ha probado la posibilidad de extender los procesos de lixiviación bacteriana para optimizar la recuperación de oro y plata a partir de minerales con altos contenidos en piritita ( $\text{FeS}_2$ ) o arsenopiritita<sup>6,7</sup>.

El alto valor de metales como el oro, permitió el desarrollo de procesos de lixiviación bacteriana en los cuales se exigían condiciones más estrictas de control bacteriano (y, por ende, más costosas). De este modo, la biominería comenzó a formar parte significativa de las fermentaciones industriales. Un ejemplo de esto es la planta de biooxidación construida en los campos de oro de Ashanti (Ghana) que constituye una de las mayores plantas de fermentación en el mundo. Actualmente, al menos seis plantas de biooxidación de minerales de oro operan en cinco países empleando tecnología de fermentación altamente controlada<sup>8</sup>.

De todos los microorganismos que contribuyen significativamente a los procesos de biolixiviación son, sin dudas, las bacterias quimioautotróficas y mesófilas del género *Thiobacillus*, las que se destacan sobre el resto<sup>8</sup>. Precisamente, la posibilidad de crecer a expensas de la oxidación de compuestos inorgánicos (hierro(II), compuestos reducidos de azufre), con dióxido de carbono como fuente de carbono y a temperaturas relativamente moderadas, las hace adecuadas para procesos de baja infraestructura y de costos aceptables. En particular, la mayoría de los trabajos a nivel de laboratorio e incluso las aplicaciones a nivel industrial, han utilizado dos especies del género *Thiobacillus*: *Thiobacillus ferrooxidans* y el *Thiobacillus thiooxidans*<sup>9</sup>.

---

<sup>4</sup>Karavaiko G., Rossi G., Agate A., Groudev S. and Avakyan Z. (ed). 1988. Biogeotechnology of metals. Center for International projects GKNT, Moscow.

<sup>5</sup>McCready, R. G. and Gould, W. D. 1990. "Bioleaching of Uranium". In: Microbial Mineral Recovery. Ehrlich, H. L. and Brierley, C. L. (ed.), McGraw-Hill, New York, 107-125.

<sup>6</sup>Livesey-Goldblantt, E., Norman, P. and Livesey-Goldblantt, D. R. 1983. "Gold Recovery from Arsenopyrite/pyrite Ore by Bacterial Leaching and Cyanidation". In: Recent Progress in Biohydrometallurgy. Rossi, G. and Torma A.E. (ed), Associazione Mineraria Sarda, Iglesias, 627-641.

<sup>7</sup>Rawlings, D. E. and Silver, S. 1995. "Mining with Microbes". Biotechnology 13, 773-778.

<sup>8</sup>Rawlings, D. E. 1998. "Industrial practice and the Biology of Leaching of Metals from Ores". Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 20, 268-274.

<sup>9</sup>Curutchet, G. 1996. "Comparación de dos especies del género *Thiobacillus* en la biolixiviación de sulfuros metálicos". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Otros géneros de bacterias también asociados a la catálisis de la oxidación de compuestos sulfurados son, entre otros, *Sulfolobus*, *Acidianus* y *Leptospirillum*.

## THIOBACILLUS

### Características de las especies más importantes para el proceso de lixiviación

#### *Thiobacillus ferrooxidans*

Las células de *Thiobacillus ferrooxidans* se encuentran naturalmente en los drenajes de aguas ácidas provenientes de minas con alto contenido en sulfuro y de minas de carbón bituminoso. Es el organismo dominante en la biohidrometalurgia en los procesos de biolixiviación<sup>10</sup>, y es principal en la oxidación de sulfuros minerales en los ambientes naturales ácidos y a temperaturas por debajo de 40 °C.

Es un bacilo Gram negativo, no esporulado, con un tamaño entre 0,5 a 0,6 micrones de ancho por 1 a 1,5 micrones de longitud, con extremos redondeados, que puede encontrarse solo o formando pares y que algunas veces posee un flagelo polar. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35 °C, aunque puede superar dichos límites dependiendo de la cepa y de las condiciones de crecimiento<sup>11,12</sup>. Es una especie autótrofa estricta, fijando el CO<sub>2</sub> atmosférico mediante un ciclo de Calvin convencional<sup>12</sup>.

*T. ferrooxidans* es una especie aeróbica aunque no estricta, capaz de catalizar la oxidación de compuestos reducidos de azufre y también la oxidación de hierro(II), empleando en ambos casos al oxígeno como último aceptor electrónico. La energía liberada en estas reacciones es aprovechada para sus procesos metabólicos. En ciertas condiciones (como se verá en el capítulo 7), el oxígeno puede ser reemplazado por el hierro(III) como último aceptor de electrones.

---

<sup>10</sup>Jensen, A. B. and Webb, C. 1995. "Ferrous Sulphate Oxidation Using *Thiobacillus ferrooxidans*: a Review". *Process Biochemistry* 30, 225-236.

<sup>11</sup> *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8va ed.). 1974. Co-edit Buchanan R. E. and Gibbons M. E. Baltimore.

<sup>12</sup>Norris, P. R. 1990. "Acidophilic Bacteria and Their Activity in Mineral Sulfide Oxidation". In: *Microbial Mineral Recovery*. Ehrlich H. L and Brierley C. L. (ed.), McGraw-Hill, New York, 3-27

### *Thiobacillus thiooxidans*

*Thiobacillus thiooxidans* es una bacteria acidófila, aerobia, Gram negativa, con una temperatura de crecimiento y morfología semejante al *T. ferrooxidans*. Su forma es la de varillas cortas, con una longitud no superior al micrón y que poseen usualmente un flagelo polar que le confiere una movilidad superior, en general, a la de *T. ferrooxidans*.

La energía para sus procesos metabólicos la obtiene a partir de la oxidación del azufre, y en algunos casos puede llegar a oxidar otros compuestos reducidos del azufre: algunos sulfuros metálicos, tiosulfato, etc. Las células de *T. thiooxidans* difieren de las de *T. ferrooxidans* en su bajo contenido de guanina-citosina (GC) (el contenido de GC es 58 % para *T. ferrooxidans* y 52 % para *T. thiooxidans*) y por su incapacidad para oxidar al hierro(II). Tampoco es capaz de oxidar concentrados de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ )<sup>13</sup>.

A continuación se expone un resumen con las características generales de estas dos bacterias:<sup>12, 14</sup>

Características	<i>T. ferrooxidans</i>	<i>T. thiooxidans</i>
Forma	bacilos 0,3-0,5x1,0-1.8 $\mu\text{m}$	bacilos 0,3x1,0-1.2 $\mu\text{m}$
Coloración Gram	negativo	negativo
pH óptimo	1,5 - 2,3	2,0 - 3,5
Rango de pH	1,2 - 6	0,5 - 6
Sustratos oxidables	$\text{Fe}^{+2}$ ; $\text{S}^0$ ; $\text{S}^{-2}$ ; $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ ; $\text{UO}_2^{+2}$ $\text{S}_4\text{O}_6^{-2}$ ; $\text{Cu}^+$ ; $\text{Se}^{-2}$ ; $\text{Mo}^{+5}$	$\text{S}^0$ ; $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ ; $\text{S}_4\text{O}_6^{-2}$ ; $\text{S}^{-2*}$
Fuente de Carbono	$\text{CO}_2$	$\text{CO}_2$
Fuente de Nitrógeno	$\text{NH}_4^+$	$\text{NH}_4^+$
Aceptores electrónicos	$\text{O}_2$ ; $\text{Fe}^{+3}$	$\text{O}_2$

\* Existe contradicción al respecto en bibliografía. Se informa capacidad débil y solamente frente a ciertos sulfuros.

<sup>13</sup>Barret, J., Hughes, M. N., Karavaiko, G. I. and Spencer, G. A. 1993. Metal Extraction by Bacterial Oxidation of Mineral, Ellis Hoorwood, Chichester.

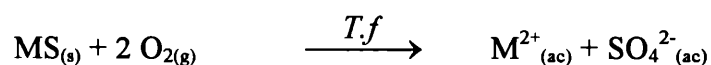
Estas dos especies comparten además, una característica muy importante y es su alta resistencia a los metales pesados y la posibilidad de adaptación a concentraciones cada vez mayores de los mismos en relativamente pocas generaciones<sup>14</sup>. Además soportan condiciones de pH extremadamente bajas. Estas características hacen de estas bacterias las ideales para la recuperación de metales a partir de minerales sulfurados de baja ley.

## MECANISMOS DE BIOLIXIVIACIÓN

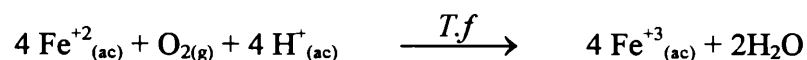
### Disolución de sulfuros metálicos catalizada por *T. ferrooxidans*

La disolución de un sulfuro metálico por *T. ferrooxidans* puede ocurrir fundamentalmente a través de dos mecanismos:

1) Mecanismo directo: La bacteria actúa directamente sobre el sulfuro, solubilizando al metal de acuerdo a la siguiente reacción:



2) Mecanismo indirecto: la bacteria oxida el hierro(II) a hierro(III) en fase líquida:



y el hierro(III) ataca al sulfuro metálico a través de la siguiente reacción:



Como puede observarse, en esta última reacción se produce hierro(II) que puede ser oxidado nuevamente por *T. ferrooxidans* a hierro(III) permitiendo que el mecanismo se produzca cíclicamente.

---

<sup>14</sup> Curutchet, G. 1996. "Comparación de dos especies del género *Thiobacillus* en la biolixiviación de sulfuros metálicos". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.



La contribución de los dos mecanismos de lixiviación depende del tipo de sulfuro metálico, la concentración de ion férrico y las condiciones de operación.

Se ha probado previamente que en el mecanismo directo sobre sulfuros metálicos muy insolubles, es necesario el contacto directo bacteria-mineral, mientras que esto no es necesario cuando el sustrato es soluble como en el caso de hierro(II) o de sulfuros relativamente solubles.

Como se ha adelantado, el proceso de lixiviación bacteriana también puede ser aplicado para el beneficio de la explotación de minerales de uranio; en este caso, el proceso consiste esencialmente en la oxidación directa<sup>15</sup> (o indirecta a través de la generación de hierro(III)) de  $UO_2$  a  $UO_2^{2+}$  que es una especie soluble en medio ácido. De este modo, puede recuperarse parte del uranio ( $U^{4+}$ ) contenido en los minerales que no es solubilizado en los métodos hidrometalúrgicos más habituales que usan soluciones de ácido sulfúrico.

Por último, en el caso de la recuperación de oro y/o plata, el proceso es aplicable cuando estos metales se encuentran en estado nativo y rodeados por una capa de sulfuros o arsenosulfuros (en general, pirita y arsenopirita). Esta oclusión de los gránulos de oro o plata, disminuye los rendimientos de recuperación en los procesos de disolución (cianuración u otros). En este caso, el papel de las bacterias consiste en oxidar la capa que rodea a los metales de interés permitiendo que los posteriores procesos de disolución incrementen su rendimiento.

Los procesos de lixiviación bacteriana y la influencia de diversos parámetros sobre la eficacia del proceso, han sido extensamente estudiados en muy diversas condiciones y pueden consultarse en libros y reviews (ver referencias 1-12).

A nivel industrial, los procesos de lixiviación bacteriana son aplicables en varios países y para la recuperación de diversas especies<sup>16</sup>. Países como Chile, Australia, Canadá y USA marchan al frente de estos procesos para la recuperación de cobre, níquel, oro y uranio.

---

<sup>15</sup> Dispirito, A. and Tuovinen, O. 1984. "Oxidation of Nonferrous Metals by Thiobacilli". Microbial Chemoautotrophy. Strohl, W. and Tuovinen, O. (eds.) The Ohio State University Press, Columbus.

<sup>16</sup> Paknikar, K. L. and Agate, A.D. 1987. "Development of a Culture Collection and Data Bank for Biohydrometallurgical Process in India". MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 3, 169-178.

En nuestro país, a pesar del reciente intento por incorporar la minería como un pilar importante de nuestra economía, los proyectos de mayor relevancia (como, por ejemplo, el de Bajo La Alumbrera, Catamarca) consisten solo en procesos físicos de preparación de concentrados y su posterior traslado a países (Australia, Canadá) que ya cuentan con tecnologías de recuperación metálica<sup>17</sup>. Por esa razón, no se ha dirigido demasiada atención a estudios como los del presente trabajo de tesis, que podrían contribuir a incrementar los conocimientos sobre el tema de la explotación de minerales.

---

<sup>17</sup> Actas de las V Jornadas Argentinas de Tratamiento de Minerales. 1998. San Juan, Argentina.

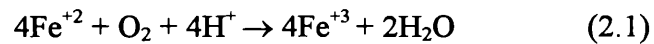
# **CAPÍTULO 2**

Influencia de diversos sólidos en la oxidación de  
hierro(II)  
catalizada por *Thiobacillus ferrooxidans*

## 2.1. INTRODUCCIÓN

### 2.1. 1. Crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre hierro(II)

Como fue descrito en el capítulo anterior, la bacteria denominada *Thiobacillus ferrooxidans* es capaz de transformar la energía libre asociada a la oxidación aeróbica de hierro(II) a hierro(III) en energía química aprovechable para su crecimiento bajo la forma de ATP. La reacción de oxidación de hierro(II) es la siguiente:



El estudio de la cinética de oxidación de iones hierro(II) resulta de gran interés teórico y práctico en el campo de la lixiviación bacteriana debido a que este proceso es la etapa inicial del denominado mecanismo indirecto para el ataque de sulfuros metálicos (ver capítulo 1).

La velocidad de consumo de hierro(II) se puede expresar como:

$$r = -d[\text{Fe}^{++}] / dt \quad (2.2)$$

El rendimiento en células por unidad de hierro(II) oxidado,  $Y_{X/\text{Fe}^{++}}$ , es:

$$Y_{X/\text{Fe}^{++}} = -\Delta X / \Delta[\text{Fe}^{++}] \quad (2.3)$$

donde  $\Delta X$  representa la masa celular (que expresaremos habitualmente en mg) generada a partir de la oxidación de cierta cantidad de hierro(II) oxidado ( $\Delta[\text{Fe}^{++}]$ ) producida (esta última la expresaremos en g de  $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Este parámetro permite relacionar la velocidad de crecimiento bacteriano y la velocidad de consumo de hierro(II):

$$dX/dt = Y_{X/\text{Fe}^{++}} \cdot r \quad (2.4)$$

En el estado exponencial de crecimiento bacteriano, puede indicarse la velocidad de crecimiento bacteriano como  $\mu \cdot X$  donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y

X es la población bacteriana instantánea (que expresaremos en mg de células/litro de solución).

Re-ordenando:

$$r = \mu X/Y_{X/Fe^{++}} \quad (2.5)$$

Admitiendo una cinética de crecimiento acorde con la ecuación de crecimiento de Monod<sup>1</sup> podemos escribir:

$$\mu = \mu_m [Fe^{++}] / ([Fe^{++}] + K_s) \quad (2.6)$$

donde  $[Fe^{++}]$  es la concentración de hierro(II) expresada en  $g.l^{-1}$  de  $SO_4Fe \cdot 7H_2O$ ,  $\mu_m$  es la velocidad específica máxima y  $K_s$  es la constante de saturación.

Si reemplazamos (2.6) en (2.5) podemos escribir:

$$r = \frac{\mu_m X [Fe^{++}]}{Y_{X/Fe^{++}} ([Fe^{++}] + K_s)} \quad (2.7)$$

Con el fin de llegar a una expresión linealizada, invertimos la ecuación anterior:

$$1/r = \{Y_{X/Fe^{++}} / \mu_m X\} + \{Y_{X/Fe^{++}} K_s / \mu_m X [Fe^{++}]\} \quad (2.8)$$

y luego multiplicando por la población bacteriana:

$$X/r = \{Y_{X/Fe^{++}} / \mu_m\} + \{Y_{X/Fe^{++}} K_s / \mu_m [Fe^{++}]\} \quad (2.9)$$

Representando  $X/r$  en función de  $1/[Fe^{++}]$  podemos obtener el cociente  $Y_{X/Fe^{++}} / \mu_m$  de la ordenada a la origen. Utilizando el valor de  $Y_{X/Fe^{++}}$  habitualmente aceptado para estos cultivos<sup>2</sup> (1,45 mg de células por gramo de  $SO_4Fe \cdot 7H_2O$ ), será posible estimar la velocidad específica máxima en los diferentes experimentos a describirse en este trabajo.

<sup>1</sup>Monod, J. 1949. "The growth of bacterial cultures". Ann. Rev. Microbiol. 3, 371-378.

<sup>2</sup>Acevedo, F. and Gentina, J. C. 1989. "Process engineering aspects of the bioleaching of copper ores". Bioprocess Engineering 4, 223-229.

### 2.1.2. Influencia de diversos materiales sobre la oxidación de hierro(II) catalizada por *Thiobacillus ferrooxidans*

En el capítulo 1 se ha indicado la importancia del proceso de oxidación de hierro(II) dentro del mecanismo indirecto de los procesos de lixiviación bacteriana. Este proceso se ha estudiado extensamente en función de las diversas variables que influyen en el mismo; para ello se han utilizado medios definidos utilizando diferentes metodologías: frascos agitados, fermentadores, etc.<sup>2,3,4,5,6,7,8,9</sup>.

Uno de los parámetros que puede influir en la oxidación de hierro(II), cuando este proceso ocurre dentro del mecanismo indirecto de lixiviación bacteriana, es la presencia de diferentes especies mineralógicas, inertes o no frente al ataque bacteriano.

Existe un número importante de estudios que han mostrado el efecto de variadas especies sobre la oxidación de hierro(II) aunque las conclusiones no han sido siempre coincidentes. Así, Dispirito, A. *et al*<sup>10</sup>, mencionan un efecto inhibitorio, provocado por la presencia de partículas sólidas como perlas de vidrio, pirita, flor de azufre y fluorapatita, sobre la oxidación de hierro(II) en concentraciones del orden de 120 mM y con un pH inicial de 1,5. En el caso de las perlas de vidrio, el grado de inhibición aumenta con la densidad de pulpa de dichas partículas mientras que para las otras especies mencionadas, su agregado, salvo para la menor densidad de pulpa (0,1%), provoca una inhibición total de la oxidación de hierro(II). Resultados similares fueron hallados por Soljanto, P. *et al*<sup>11</sup>; estos autores comprobaron que agregados de un 5 % p/v de cuarzo provocan parcial inhibición de la oxidación de hierro(II) que se incrementa cuando disminuye el tamaño de la partícula (se usaron tamaños de partículas entre 0,045 y 0,106  $\mu\text{m}$  de

---

<sup>3</sup>Murr, L.E., Torma, A.E. and Brierley, J.A. (ed) .1978. "Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena". Academic Press, New York.

<sup>4</sup>Ehrlich, H.L. 1981. "Geomicrobiology". Marcel Dekker, New York.

<sup>5</sup>Ehrlich, H.L. and Holmes, D.S. (ed). 1986. "Biotechnology for the Mining, Metal-Refining and Fossil Fuel Processing Industries". Biotechnol. Bioeng. Symp.16, John Wiley & Sons, New York.

<sup>6</sup>Karavaiko, G., Rossi G., Agate, A., Groudev, S. and Avakyan, Z. (ed). 1988. "Biogeotechnology of metals". Center for International projects GKNT, Moscow.

<sup>7</sup>Ehrlich, H.L. and Brierley, C.L. (ed). 1990. "Microbial Mineral Recovery". McGraw-Hill, New York.

<sup>8</sup>Rossi, G. 1990. Biohydrometallurgy. McGraw-Hill, Hamburg.

<sup>9</sup>Barrett, J., Hughes, M.N., Karavaiko, G.I. and Spencer, P.A. 1993. "Metal Extraction by Bacterial Oxidation of Minerals". Ellis Horwood, Chichester.

<sup>10</sup>Dispirito, A., Dugan, P. R. and Tuovinen, O. 1981. "Inhibitory Effects of Particulate Materials in Growing Cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*". Biotechnology and Bioengineering 23, 2761-2769.

<sup>11</sup>Soljanto, P., Pentti Rehtijarvi, J. and Tuovinen, O. H. 1980. "Ferrous Iron Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Inhibition by finely Ground Particles". Geomicrobiology Journal 2, 1-12.

diámetro). Densidades de pulpa menores de cuarzo o de óxido de aluminio, no provocaron inhibición del crecimiento bacteriano.

En la tesis del Dr. Edgardo Donati<sup>12</sup> se analizó el efecto de cuarzo, diferentes sulfuros y alúmina sobre la acción de *Thiobacillus ferrooxidans* aunque específicamente dirigido a su influencia sobre la lixiviación de sulfuros metálicos; el resultado más relevante obtenido en dichos estudios, para el caso de especies inertes (cuarzo y alúmina), es la ausencia de inhibición sobre el crecimiento bacteriano cuando la fuente de energía es soluble (hierro(II)) y una inhibición considerablemente mayor a mayor densidad de pulpa, cuando la fuente de energía es muy poco soluble (sulfuros metálicos como la covelita) y por ende, es necesaria la adherencia bacteriana previa sobre el sustrato<sup>13</sup>. Precisamente, estos resultados permitieron concluir que estos materiales inertes pueden influir en la oxidación de sulfuros debido a que las bacterias se adhieren sobre su superficie de modo que, si bien mantienen su viabilidad, no pueden acceder a la superficie de los sustratos insolubles y por lo tanto no pueden oxidarlos para permitir la liberación de los metales.

La adherencia de bacterias sobre sustratos inertes puede ocasionar inconvenientes en la lixiviación de sulfuros, sin embargo, puede ser un fenómeno sumamente útil cuando se trata de la oxidación de sustratos solubles como hierro(II) (aunque sobre este tema, como se adelantó en los párrafos anteriores, los resultados sobre ventajas o desventajas son contradictorios o, al menos, no coincidentes). Precisamente, cuando el sólido no inhibe la catálisis bacteriana de la oxidación del hierro(II), la capacidad de estas bacterias de adherirse a la superficie de un gran número de sólidos, podría ser usado para inmovilizar células que oxiden en forma continua hierro(II). Estos sólidos actuarían tan solo como soportes de una biomasa activa en la oxidación de hierro(II).

Por las razones anteriores, se decidió analizar en detalle la eventual inhibición provocada por ciertos materiales que pudieran ser especialmente útiles como soportes (y que, de hecho, ya han sido usados en ciertos trabajos<sup>14,15,16,17,18,19,20,21</sup>. Los materiales

---

<sup>12</sup>Donati, E. 1991. "Estudios de los factores químicos y fisicoquímicos en el crecimiento del *Thiobacillus ferrooxidans* y su utilización en la biolixiviación". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

<sup>13</sup>Pogliani, C., Donati, E., Curutchet, G. and Tedesco, P. 1990. "A need for direct contact with particle surface in the bacterial oxidation of covellite in the absence of chemical lixiviant". *Biotechnology Letters* 12, 515-518.

<sup>14</sup>Grishin, S. I. and Tuovinen, O.H. 1988. "Fast kinetic of Fe<sup>++</sup> oxidation in packed-bed reactor". *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3092-3100.

<sup>15</sup>García, M. J., Palencia, I. and Carranza, F. 1989. "Biological ferrous iron oxidation in packed-bed columns with low-grade sulphide mineral of support". *Process Biochemistry* 24, 84-87.

elegidos fueron perlas de vidrio, sílicagel, carbón activado y ganga de mineral sulfurado; éste último material sería particularmente útil ya que se encuentra presente en enormes cantidades en las adyacencias de aquellas minas cuya explotación exigiese la generación de hierro(III). También se decidió utilizar densidades de pulpa elevadas para las cuales son mayores las contradicciones acerca de la influencia del sólido sobre la acción bacteriana.

En este capítulo se describe la influencia de dichos sólidos (inertes y no inertes) sobre la velocidad de oxidación de hierro(II), catalizada por *Thiobacillus ferrooxidans*, utilizando la metodología de frascos agitados.

---

<sup>16</sup> Nemati, M. and Webb, C., 1996, "Effect of ferrous iron concentration on catalytic activity of immobilized cells of *Thiobacillus ferrooxidans*". Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 250-255.

<sup>17</sup> Karamanev, D. and Nikolov, L. 1991. "A comparison between the reaction rates in biofilm reactors and free suspended cells bioreactors". Bioprocess Engineering 6, 127-130.

<sup>18</sup> Shieh, W. K., Mulcahy, L., LaMotta, E. J. 1981. "Second World Congress on Chemical Engineering". Montreal, Canada, 165-170.

<sup>19</sup> Atkinson, B. 1981. Biochemical reactors. London: Pion Press.

<sup>20</sup> Olem, H. and Unz, R. F. 1977. "Acid mine drainage treatment with rotating biological contactor". Biotechnol. Bioeng. 19, 1475-1491.

<sup>21</sup> Livesey-Goldblatt, E., Tunley, T. and Nagi, I. 1977. "Pilot plant bacterial film oxidation (Bacfox Process) of recycled acidified uranium plant ferrous sulfate leach solution". In: Conference of Bacterial Leaching. Schwarts, W., (ed.), Verlag Chemie, Weinheim, 175-190.



## 2. 2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 2.2.1. Influencia de perlas de vidrio sobre la oxidación bacteriana de hierro(II)

#### 2.2.1.1. Descripción experimental

Los cultivos se realizaron en frascos agitados (180 rpm) y termostatizados (30 °C) utilizando 100 ml de medio 9 K<sup>22</sup> (medio mineral cuya composición es la siguiente 44,2 g/l de SO<sub>4</sub>Fe.7H<sub>2</sub>O, 3/l g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l de KCl, 0,014 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, pH inicial igual a 1,80) inoculados al 5 % v/v. El inóculo que contenía 2x10<sup>8</sup> bact.ml<sup>-1</sup> fue obtenido filtrando a través de un filtro Millipore (0,2 micrones), un cultivo de *T. ferrooxidans* DSM 11477, en estado exponencial de crecimiento y suspendiéndolo en medio 0 K (de idéntica composición al 9 K pero sin hierro presente). El cultivo había sido previamente filtrado a través de un filtro banda azul (S & S Rundfilter) para retener la jarosita.

A cuatro de aquellos cultivos se les agregó 20 g de perlas cuyos tamaños estaban comprendidos entre 2,6 y 3,6 mm de diámetro. Antes de ser utilizadas, las perlas de vidrio fueron tratadas con solución de HCl 20 % p/v durante dos horas, enjuagadas con agua destilada hasta neutralidad y finalmente esterilizadas en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Sistemas similares sin inoculación (estériles) y cultivos sin perlas de vidrio, fueron utilizados como controles.

En muestras periódicas se determinaron las concentraciones de hierro(II), por titulación con solución valorada de permanganato de potasio en medio ácido<sup>23</sup> y de hierro total, por espectrofotometría de absorción atómica usando una lámpara de cátodo hueco. El número de bacterias en suspensión fue determinado por conteo bacteriano en cámara de Petroff-Hausser utilizando un microscopio con dispositivo de contraste de fase. El pH de la solución fue determinado mediante un electrodo de vidrio en un equipo Altronix.

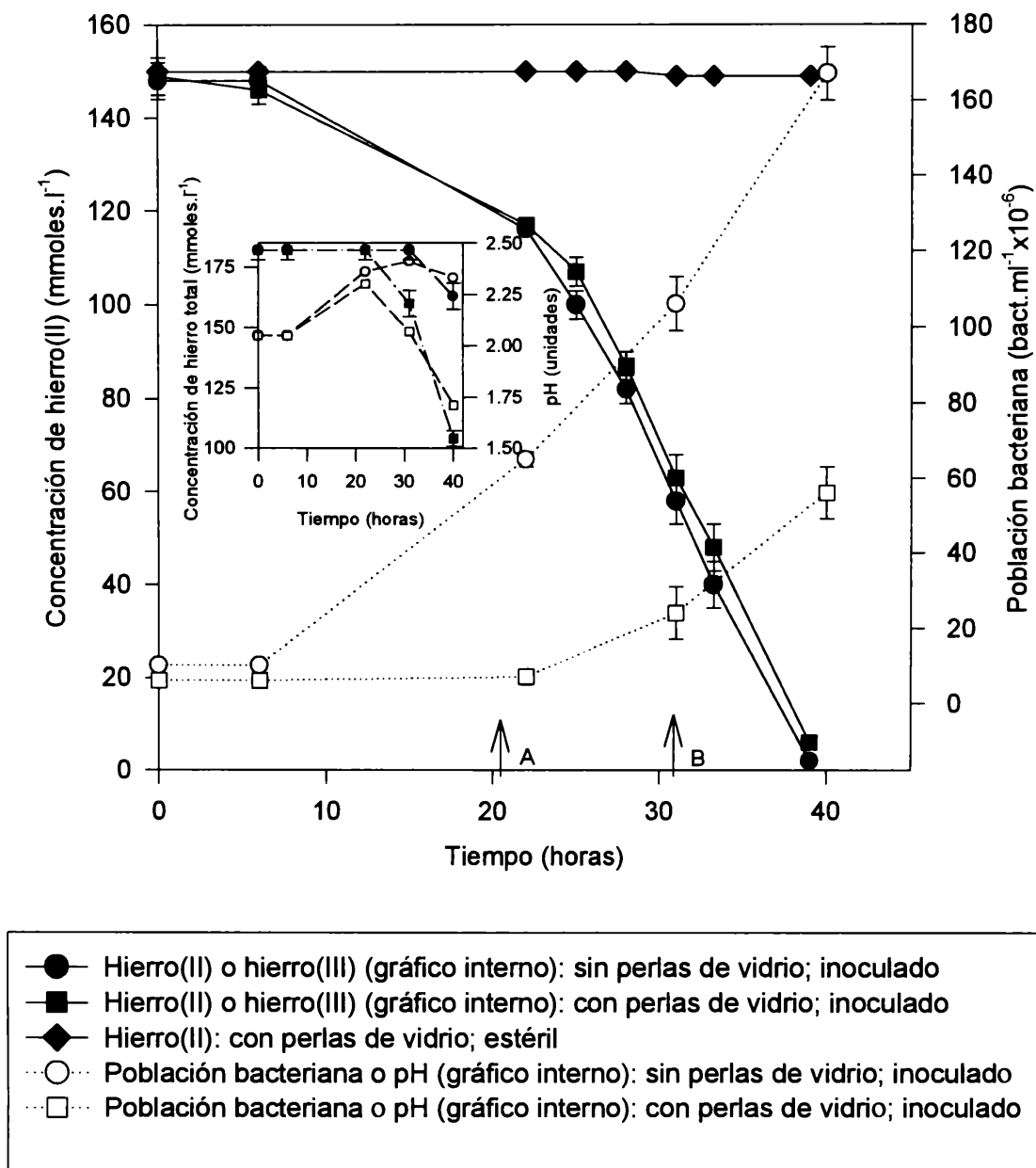
#### 2.2.1.2. Discusión de los resultados experimentales

---

<sup>22</sup> Silverman, M. P. and Lundgren. 1959. " Studies on the chemoautotrophic iron bacterium. *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields". J Bacteriol. 77, 326-331.

Las evoluciones de hierro (II), hierro total, pH y población bacteriana en solución para el sistema inoculado control (sin perlas) y para el sistema inoculado y con perlas, se observa en los gráficos de la figura 2.1. Los datos corresponden al valor promedio de 4 lecturas indicándose la desviación correspondiente.

FIGURA 2.1. Evolución de cultivos de *T ferrooxidans* con y sin perlas de vidrio



Comparando los cultivos con perlas y los controles sin perlas, puede observarse que la oxidación total del hierro(II) requiere en ambos aproximadamente 40 horas,

<sup>23</sup>Harris, D. 1992. Análisis químico cuantitativo, Grupo Editorial Iberoamérica, México.

encontrándose una fase lag de aproximadamente 20 horas para ambos sistemas. En un sistema estéril semejante no se produjo disminución significativa de la concentración de hierro (II) durante el transcurso de la experiencia.

En la figura 2.1 puede observarse una evolución bacteriana en solución significativamente diferente para ambos cultivos; ésta es una primera evidencia de la adherencia de las bacterias sobre las perlas de vidrio.

Inicialmente calcularemos los parámetros cinéticos para los cultivos sin perlas, utilizando la ecuación 2.9. Para ello se determinó la velocidad de consumo de hierro(II) a diferentes tiempos, mediante el cálculo de las pendientes a diferentes tiempos de la curva de decaimiento de la concentración de dicha especie en función del tiempo. Esas velocidades se correspondieron con los valores experimentales de concentración de hierro(II) y de población bacteriana en suspensión. La población bacteriana en suspensión es convertida a biomasa utilizando una ecuación de conversión previamente aceptada<sup>24</sup>. Realizando los cambios de unidades necesarios obtenemos los valores de  $X/r$  y de  $1/[Fe^{++}]$  que se detallan a continuación en la tabla 2.1.

TABLA 2.1. Población bacteriana y velocidad de oxidación de hierro(II) en un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans*

$r$ (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) <sup>①</sup>	$N$ (bact.ml <sup>-1</sup> ) <sup>②</sup>	$X$ (mg.l <sup>-1</sup> ) <sup>③</sup>	$X/r$ (mg.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> ) <sup>④</sup>	$1/[Fe^{++}]$ <sup>⑤</sup>
1.17	4.80 10 <sup>7</sup>	12.6	10.4	0.0273
1.95	8.85 10 <sup>7</sup>	23.3	12,0	0.0455
2.22	11.2 10 <sup>7</sup>	29.5	13.2	0.0734
1.86	14.4 10 <sup>7</sup>	37.9	20.3	0.171

① gramos de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  oxidados por litro y por hora

② población bacteriana en células por mililitro

③ masa bacteriana en miligramos por litro

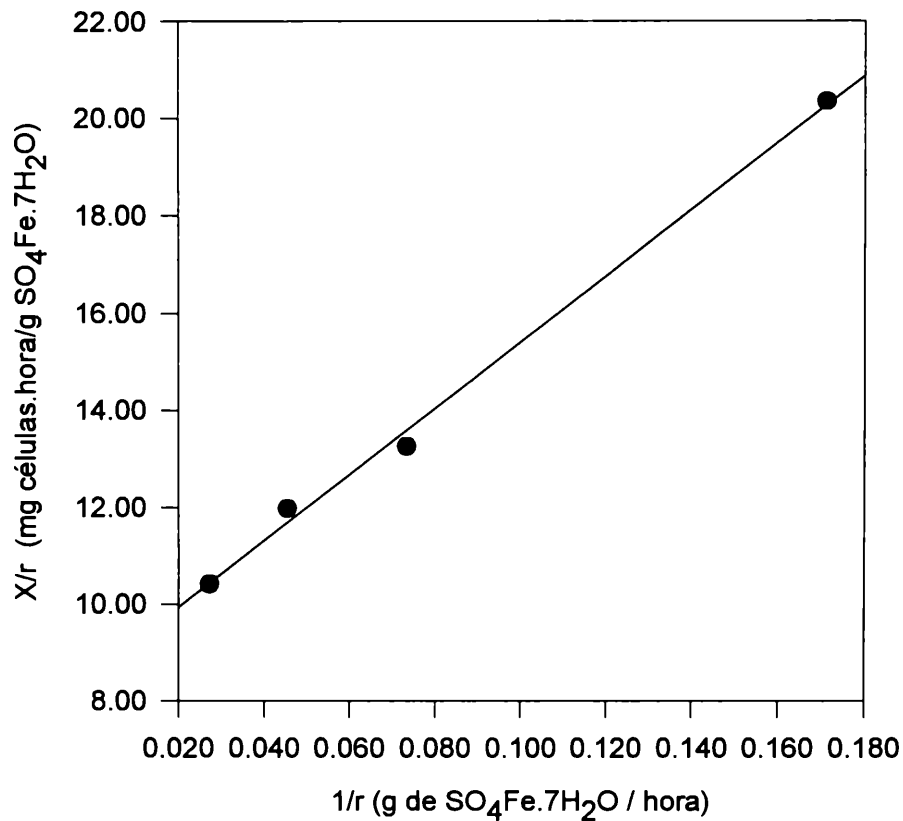
④ miligramos de células por gramo de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  oxidados por hora

⑤ inversa de g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  oxidados por litro

<sup>24</sup>Karavaiko, G., Rossi, F., Agate, A. Groudev, S. and Avakyan, Z. (ed). 1988. Biogeotechnology of metals. Centre for international projects GKNT, Moscow, 70-71.

Graficando  $X/r$  en función de  $1/[Fe^{++}]$  para el sistema control obtenemos el siguiente gráfico:

FIGURA 2.2. Aplicación de un modelo cinético a un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans*



La recta anterior presenta una pendiente de  $68,3 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$  y una ordenada al origen de  $8,57 \text{ mg} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ . El coeficiente de correlación correspondiente a esta recta es 0,997 por lo que se acepta que el crecimiento del cultivo control responde al modelo cinético utilizado. De la ordenada al origen podemos calcular la velocidad específica máxima para el sistema control que es  $0,169 \text{ h}^{-1}$ .

Analizaremos ahora los cultivos con perlas. Debido a que los soportes son inertes (tanto al ataque químico como bacteriano) consideramos que en los cultivos con perlas la velocidad global de oxidación de hierro(II) es la suma de las velocidades correspondientes al proceso catalizado por las bacterias presentes en la solución y al

catalizado por las bacterias adheridas a la superficie de las perlas. Así, la ecuación (2.2) tendrá dos términos:

$$r_{\text{Fe}(t)} = r_{\text{Fe}(l)} + r_{\text{Fe}(a)} \quad (2.10)$$

donde los subíndices t, l y a, se refieren respectivamente a las velocidades de oxidación total, debido a las bacterias libres y debido a las bacterias adheridas.

Para las dos últimas es posible utilizar la ecuación 2.7:

$$r_{\text{Fe}(l)} = \mu_{ml} X_l [\text{Fe}^{2+}] / Y_{Xl/\text{Fe}} ([\text{Fe}^{2+}] + K_{sl}) \quad (2.11)$$

$$r_{\text{Fe}(a)} = \mu_{ma} X_a [\text{Fe}^{2+}] / Y_{Xa/\text{Fe}} ([\text{Fe}^{2+}] + K_{sa}) \quad (2.12)$$

En estos cultivos no resulta posible discriminar entre la acción de las bacterias adheridas y la de las bacterias libres; por esa razón, se propone la hipótesis de que ambos grupos de bacterias oxidan hierro(II) a la misma velocidad ( $\mu_{ml} = \mu_{ma}$  y  $K_{sl} = K_{sa}$ ) y que el rendimiento en células por gramo o mol de hierro(II) coincide para bacterias adheridas y libres ( $Y_{Xl/\text{Fe}} = Y_{Xa/\text{Fe}}$ ). Esta última propuesta implica que el coeficiente de mantenimiento no varía para bacterias adheridas respecto del de las bacterias libres. Se intentará confirmar esta hipótesis en base a los resultados experimentales.

Si la hipótesis fuese cierta, la evolución de bacterias totales en los cultivos con y sin perlas debería ser similar ya que las condiciones de los cultivos y el tamaño de los inóculos iniciales coincide. Así, la población determinada en suspensión en los sistemas controles (sin perlas) debería coincidir con la población total ( $X_a + X_l$ ) en los cultivos con perlas. Esta aproximación supone que el número de bacterias adheridas sobre las paredes de los frascos es despreciable frente a la población total y que es semejante en los sistemas con y sin perlas.

Con estas aproximaciones se intentará predecir las velocidades de oxidación de hierro(II) en los sistemas con perlas a partir de los parámetros determinados en los cultivos controles (sin perlas). La comparación de estas velocidades calculadas con las determinadas experimentalmente permitirá decidir si la hipótesis propuesta resulta adecuada para describir el comportamiento de las bacterias adheridas sobre las perlas de vidrio.

La siguiente tabla reúne las velocidades calculadas y las experimentales para los cultivos con perlas para varios valores de concentración de hierro(II) y de población bacteriana total.

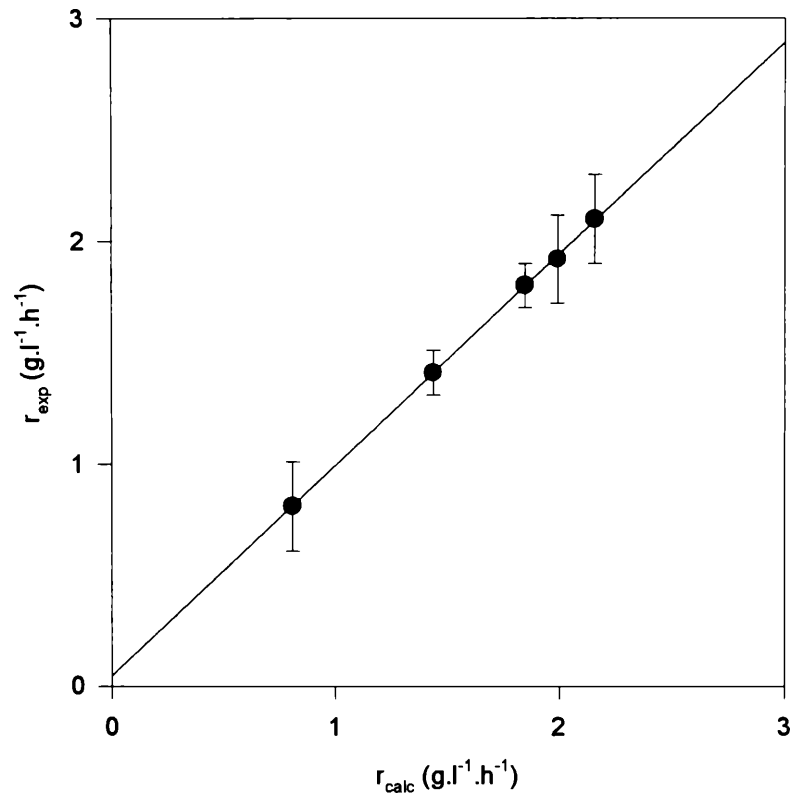
TABLA 2.2. Comparación entre las velocidades de oxidación de hierro(II) calculadas y experimentales para un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* con agregado de perlas de vidrio

[Fe <sup>++</sup> ] (g.l <sup>-1</sup> )	X (mg.l <sup>-1</sup> )	r <sub>calc</sub> (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	r <sub>exp</sub> (g.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
36.00	9.20	0.81	0.8 ± 0.2
28.36	15.8	1.44	1.4 ± 0.1
26.97	19.7	1.85	1.8 ± 0.1
22.94	22.3	1.99	1.9 ± 0.1
7.5	38.2	2.16	2.1 ± 0.2

La figura 2.3 muestra la representación de r<sub>exp</sub> en función de r<sub>calc</sub>.

La recta presenta un adecuado coeficiente de correlación (0,9997) con una pendiente igual a 0,95, de modo que los valores experimentales resultan ligeramente menores a los calculados mediante el modelo cinético utilizado indicando que hay una sobrestimación de la actividad bacteriana. Sin embargo, la diferencia entre valores calculados y experimentales está comprendida dentro de la dispersión de estos últimos, indicándonos que nuestra hipótesis es aceptable dentro del error experimental. Por esta razón, se acepta que en estas condiciones la velocidad específica máxima para las bacterias adheridas sobre perlas de vidrio es similar a la de las bacterias libres (no adheridas) e igual a 0,169 h<sup>-1</sup>.

FIGURA 2.3. Correlación entre velocidades de bio-oxidación de hierro(II) experimentales y calculadas mediante la ecuación 2.9

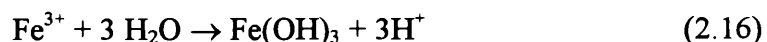
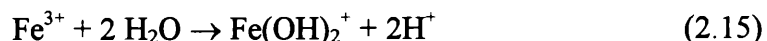
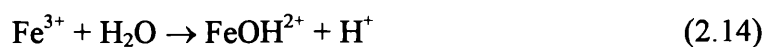


Volviendo a la figura 2.1, se ha indicado en ella con una flecha y la letra A (para el sistema con perlas) y con una flecha y la letra B (para el sistema sin perlas) el momento a partir del cual se empieza a observar turbidez en el cultivo lo cual constituye una señal inequívoca del comienzo de la formación de depósitos de hierro(III) en el sistema.

Respecto de dichos depósitos, debe aclararse que en los cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans*, a pH ligeramente por encima de 1,5, suele ocurrir el proceso descrito mediante la siguiente ecuación:



donde la sal básica obtenida como precipitado se denomina genéricamente jarosita.  $M^+$  es un catión monovalente (habitualmente  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Na^+$  o  $H_3O^+$ )<sup>25</sup>. La jarosita suele precipitar junto a hidróxidos y oxo-hidróxidos de hierro(III), provenientes de la hidrólisis de dicho catión, que representamos en forma simplificada según las siguientes ecuaciones



Estos últimos procesos son particularmente importantes cuando el pH supera el valor de 2,5. La precipitación de estos depósitos de hierro(III) provoca, en todos los casos, un rápido descenso del pH que puede compensar el ascenso ocasionado por la oxidación de hierro(II) (ver ecuación 2.1) aunque esto dependerá fuertemente del pH inicial y de otras características del medio. Cuando la concentración inicial de hierro(II) es  $9 \text{ g.l}^{-1}$  y el pH inicial es 1,80 (condiciones habituales en los cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans*), el pH final del medio se estabiliza en un valor de 2,4<sup>26</sup>. En estos cultivos, se confirmó, por difracción de rayos X, la presencia de una fase dominante de jarosita de amonio en los sólidos obtenidos. Por esta razón, en adelante se indicará la fase sólida solo como jarosita.

Según se observa en la figura 2.1, el comienzo de las precipitaciones coincide con una importante disminución del pH y de la concentración de hierro total en los sistemas; en el cultivo sin perlas, esto ocurrió tiempo después que en el cultivo con perlas. Además, la disminución de la concentración de hierro total fue significativamente mayor en el sistema con perlas ( $4,4 \pm 0,3 \text{ g.l}^{-1}$  frente a  $1,0 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$  en el control) y consecuentemente también lo fue la disminución del pH (los valores finales fueron 1,71 y 2,33 respectivamente).

Respecto del comportamiento de las bacterias en la solución, hemos adelantado que existen diferencias importantes entre ambos cultivos. En los frascos con perlas de vidrio el número inicial de bacterias en la solución es algo menor que el frasco control lo

---

<sup>25</sup> Jensen, A. B. and Webb, C. 1995. "Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review". *Process Biochemistry* 30, 225-236.



cual es explicable por una adherencia inicial de las bacterias sobre las perlas. Teniendo en cuenta, como ya hemos discutido, una evolución de la población bacteriana total semejante en ambos cultivos y que la adherencia sobre el recipiente es la misma en ambos casos, un 40 % de las bacterias se encuentra adherida inicialmente sobre las perlas; sin embargo, a medida que el crecimiento prosigue, se observa un máximo de desaparición bacteriana (aproximadamente un 90 %) para terminar con un 60 % de la población final adherida. Esto evoluciona en forma paralela a la desaparición de hierro total y a la disminución del pH causadas por la precipitación de la jarosita.

---

<sup>26</sup>Lancey, D. T. and Lawson, F. 1970. "Kinetics of the liquid-phase oxidation of acid ferrous sulphate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*". Biotechnol. Bioeng. 12, 29-50.

## 2.2.2. Influencia de la densidad de pulpa de perlas de vidrio en la velocidad de oxidación del hierro(II) en solución

### 2.2.2.1. Descripción experimental

Los cultivos se realizaron en frascos agitados (180 r.p.m.) y termostatizados (30 °C) utilizando 100 ml de medio 9 K<sup>1</sup> (pH inicial igual a 1,80) inoculados al 5 % v/v. El inóculo que contenía  $2,5 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>, fue obtenido filtrando a través de un filtro Millipore (0,2 micrones) un cultivo de *T. ferrooxidans* DSM 11477 en estado exponencial de crecimiento y suspendiéndolo en medio 0 K (de idéntica composición al 9 K pero sin hierro presente). El cultivo había sido previamente filtrado a través de un filtro banda azul (S & S Rundfilter) para retener la jarosita.

A los cultivos anteriores se le agregaron 1, 5, 10 y 15 g de perlas de vidrio cuyo tamaño estaba comprendido entre 2,6 y 3,6 mm de diámetro. Antes de ser utilizadas, las perlas de vidrio fueron tratadas del modo descrito en la sección 2.1.1. Cultivos similares sin perlas fueron utilizados como controles.

En muestras periódicas se determinó hierro(II), hierro total, población bacteriana en suspensión y pH, de igual manera a la descrita en 2.1.1.1.

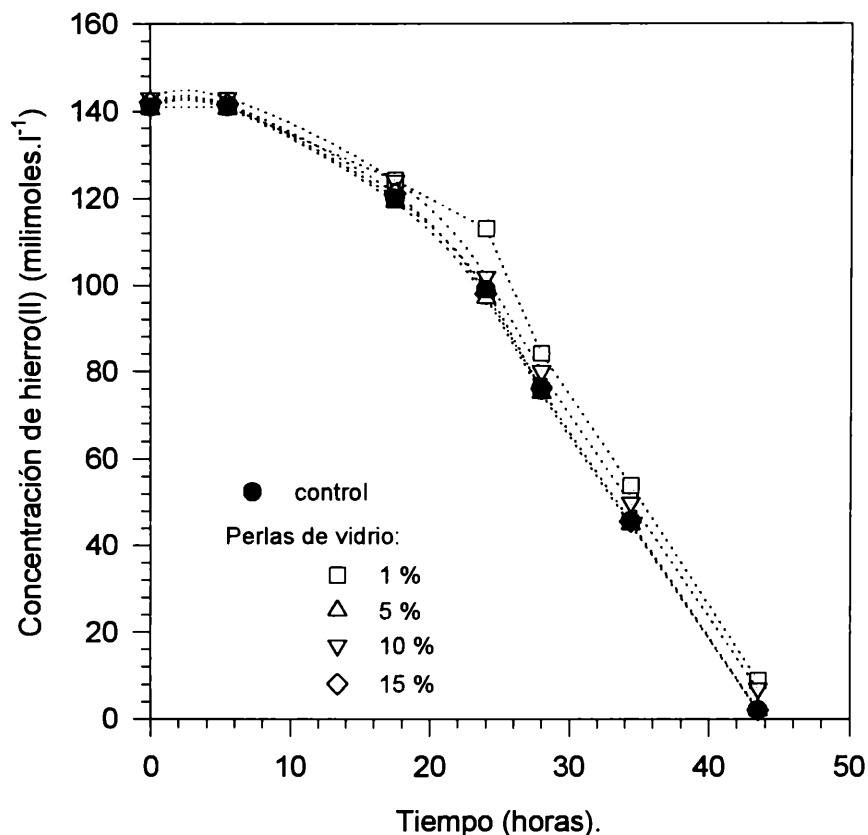
### 2.2.2.2. Discusión de los resultados experimentales

Como puede observarse en la figura 2-4, el consumo de hierro(II) para todos los cultivos incluido el control (sin perlas) fue similar. Las productividades de hierro(III) para los cultivos con densidades de pulpa en perlas de vidrio iguales a 1%, 5%, 10% y 15% y para el control fueron 3,03, 3,18, 3,12, 3,22 y 3,20 mM.h<sup>-1</sup> respectivamente que no son significativamente distintas dentro del error experimental (desviación estándar promedio igual a 0,08 mM.h<sup>-1</sup>). El control estéril (no graficado) no mostró cambios apreciables en la concentración de hierro(II) ni en los otros parámetros medidos.

---

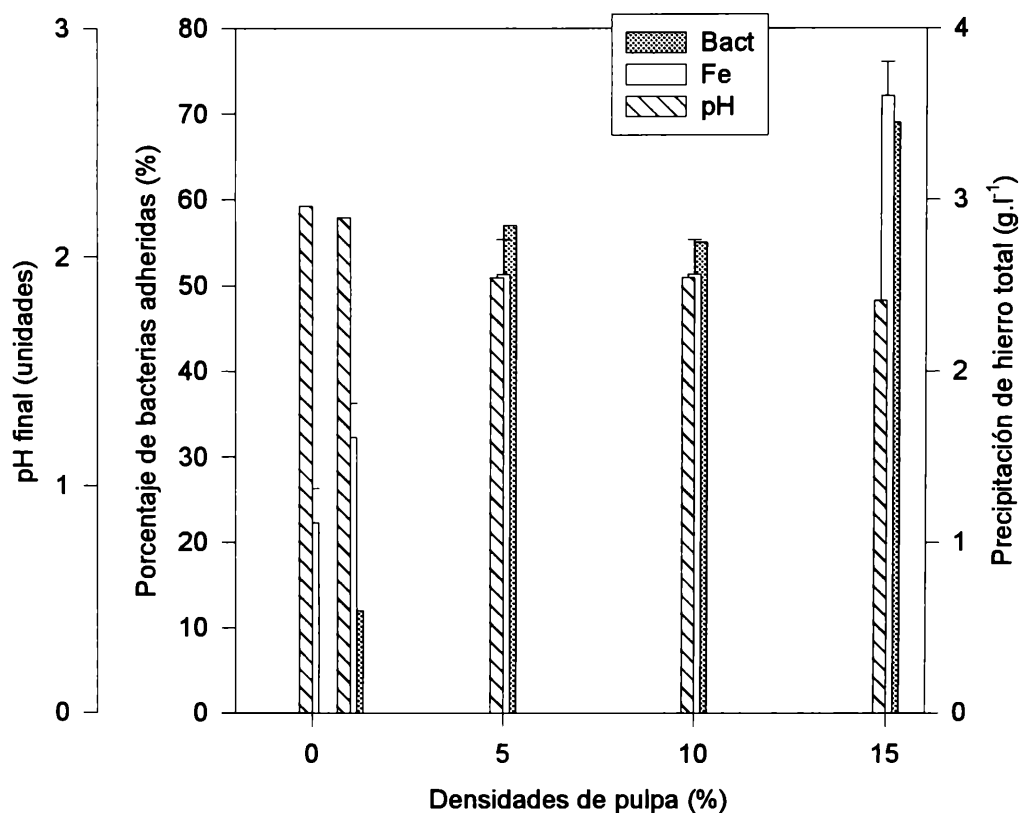
<sup>1</sup> Silverman, M. P. and Lundgren. 1959. "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields". J Bacteriol. 77, 326-331.

FIGURA 2.4. Variación de la concentración de hierro(II) en función del tiempo en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* con diferentes densidades de pulpa en perlas de vidrio.



La figura 2.5 presenta el pH, el porcentaje de bacterias adheridas y la precipitación de hierro total cuando el cultivo ha completado la oxidación de hierro(II). El cálculo del porcentaje de bacterias adheridas a las perlas de vidrio y a la jarosita en los diferentes cultivos se realizó admitiendo, de acuerdo a la conclusión alcanzada en la sección precedente, un comportamiento semejante de las bacterias adheridas con respecto a las que se encuentra libres. Esto fue corroborado con los presentes experimentos ya que las productividades obtenidas no pueden ser consideradas significativamente distintas, permitiendo utilizar como población bacteriana final en todos los cultivos la que fue obtenida en el cultivo control (sin perlas).

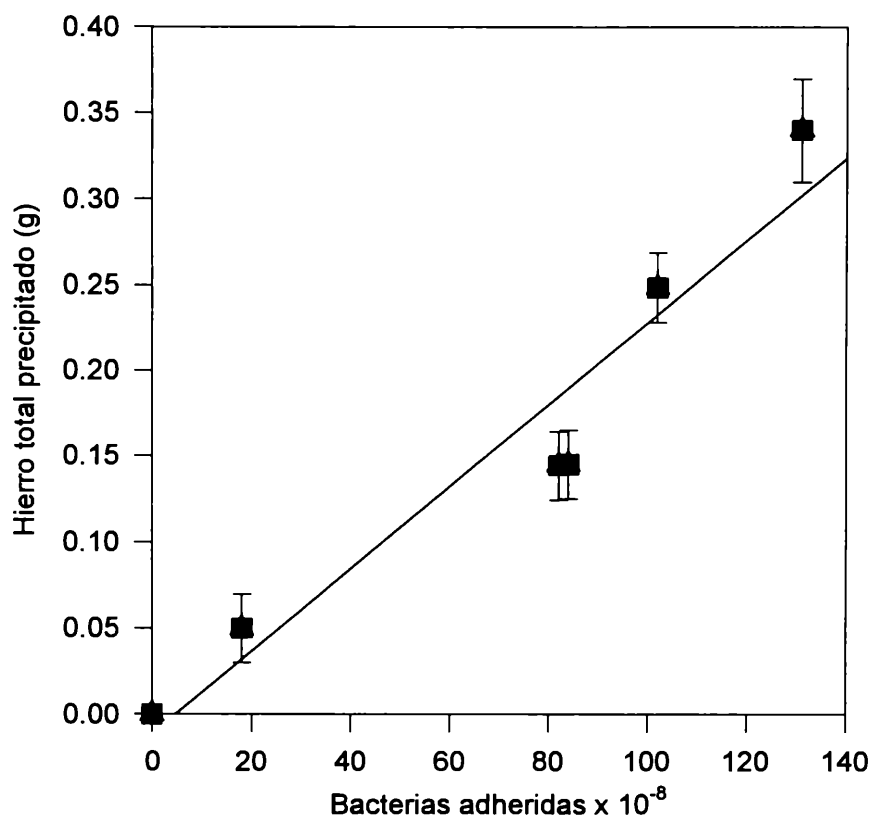
FIGURA 2.5. Comparación de diferentes parámetros en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* con diferentes densidades de pulpa en perlas de vidrio



Del análisis de los resultados obtenidos se desprende que la presencia de mayor cantidad de sólido y, por ende, de una superficie expuesta mayor, produce una mayor precipitación de jarosita aunque no hay una correlación total entre ambos parámetros. Sin embargo, la precipitación de hierro bajo la forma de jarosita resulta directamente proporcional a la cantidad de bacterias desaparecidas de la solución. La figura 2.6 nos muestra precisamente una correlación prácticamente lineal entre valores promedios de hierro total precipitado en los diferentes cultivos (previa resta de la cantidad de hierro precipitada en el control) y la cantidad total de bacterias adheridas (obtenidas como diferencia entre las del control y la del sistema correspondiente). Se ha incluido también los resultados correspondientes al cultivo de la sección precedente (densidad de pulpa utilizada igual a 20 %).

De acuerdo a esta correlación, se concluye que el aporte de las perlas de vidrio (e incluso de su superficie expuesta) en la adherencia bacteriana es poco significativo siendo un parámetro más relevante la cantidad de jarosita depositada. La evolución del pH en los diferentes cultivos (el pH final es más bajo cuanto mayor es la cantidad de hierro precipitada) también esta directamente relacionada con la precipitación de jarositas como se indicó en la sección precedente.

FIGURA 2.6. Correlación entre bacterias adheridas y precipitación de hierro en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* con diferentes densidades de pulpa en perlas de vidrio



### **2.2.3. Influencia de sílicagel sobre la oxidación bacteriana de hierro(II)**

#### *2.2.3.1. Descripción experimental*

Estas experiencias se realizaron en condiciones coincidentes con las descritas en 2.2.1.1 excepto que se reemplazaron las perlas de vidrio por sílicagel (sílicagel blanco grueso, Sílicagel S.A.) con un tamaño de partícula entre 2,0 y 3,4 mm. A este soporte se le realizó un tratamiento previo semejante al descrito para las perlas de vidrio. Se realizaron cultivos (todos por cuadruplicado) con un 20 % p/v en sílicagel, mas un frasco control (sin soporte sólido) y un frasco estéril. Los cultivos fueron inoculados al 5 % v/v (población bacteriana en el inóculo:  $7 \times 10^7$  bact.ml<sup>-1</sup>) con un inóculo obtenido como en 2.2.2.1.

Se determinó hierro total, pH, y población bacteriana al inicio y al final de los cultivos y el consumo de hierro(II) en función del tiempo. Estas determinaciones analíticas fueron realizadas como se describió en las secciones anteriores.

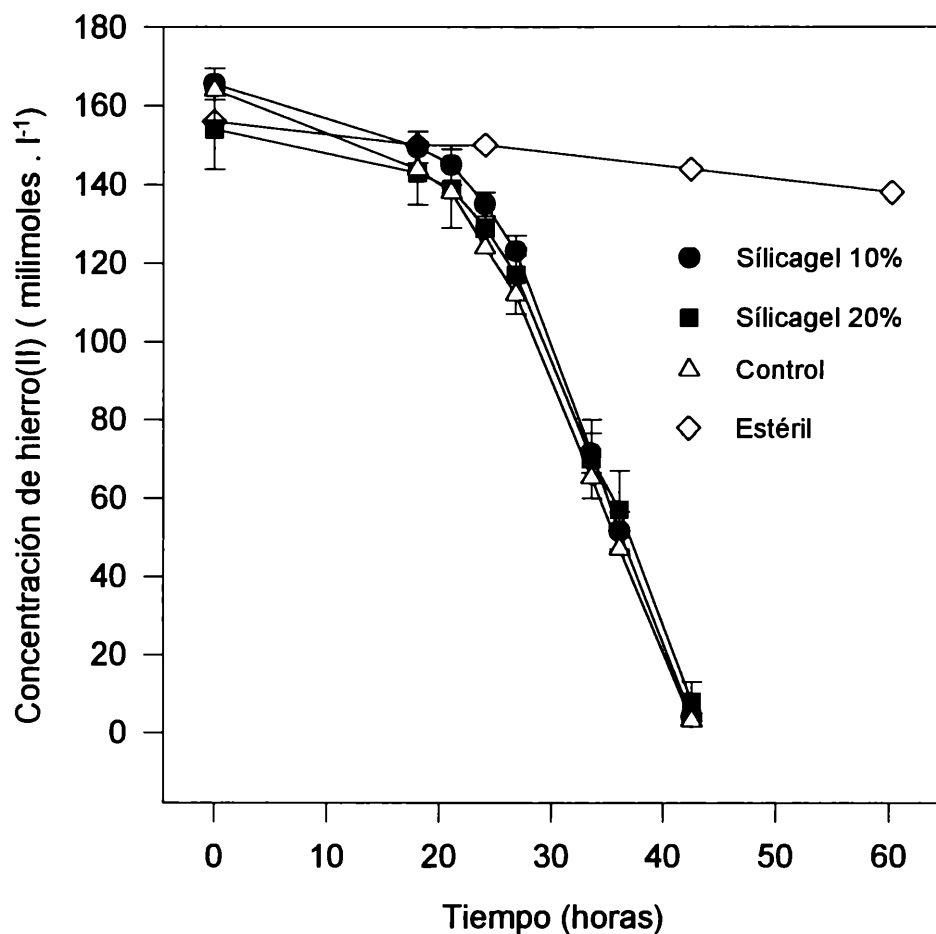
#### *2.2.3.2. Discusión de resultados experimentales*

La figura 2.7 muestra el consumo de hierro(II) en función del tiempo para todos los cultivos realizados (en cada caso se representó el promedio y la desviación standard correspondiente).

Puede observarse que no existe una variación significativa del consumo de hierro(II) en función del tiempo en los frascos que contienen sílicagel con respecto al sistema control. Las productividades de hierro(III) son 3,45 y 3,57 mM.h<sup>-1</sup> (con desviaciones estándar de 0,08 mM.h<sup>-1</sup>) para el cultivo con sílicagel y para el cultivo control. Estos resultados implican una velocidad ligeramente mayor en el cultivo control pero que no es estadísticamente significativa.

Tal cual se observó en el caso de las perlas de vidrio, la precipitación de hierro y consecuentemente, el pH final y la población bacteriana adherida fueron substancialmente afectados por la presencia de las partículas de sílicagel.

FIGURA 2.7. Variación de la concentración de hierro(II) en el tiempo para cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* en presencia de sílicagel

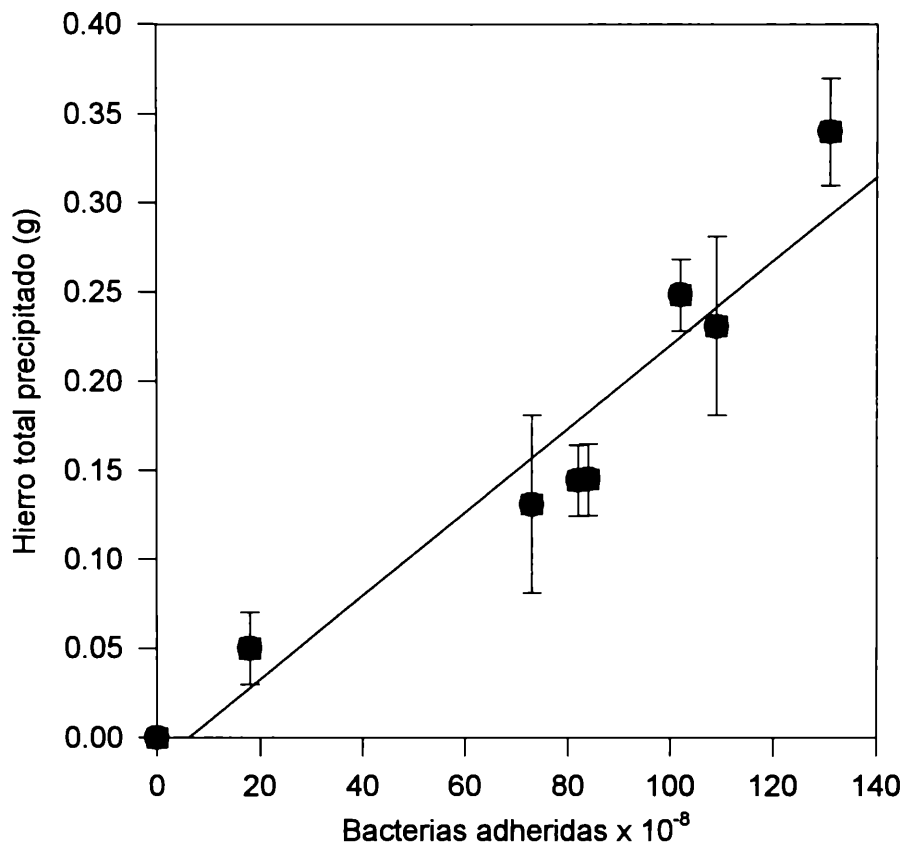


En el cultivo control precipitaron  $1,3 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$  de hierro frente a  $3,6 \pm 0,9 \text{ g.l}^{-1}$  en el cultivo con sílicagel. La población bacteriana adherida sobre sílicagel y jarosita (calculada como se ha descrito previamente) fue de 73 % mientras que el pH final fue 2,04 (frente a 2,33 del control).

El comportamiento general de los diferentes parámetros medidos en los cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* con perlas de vidrio y con sílicagel, incluyendo el comportamiento para diferentes densidades de pulpa de este último (datos no mostrados), es sugestivamente similar y parecen mostrar que estos sólidos solo permiten la precipitación de jarosita con los consecuentes cambios en el pH y, además, que el descenso del número de bacterias de la solución debe fundamentalmente a la adherencia

sobre los depósitos de hierro más que sobre los sólidos agregados. Para corroborar este último comportamiento, se incluyeron en la figura 2.6 los datos correspondientes a los cultivos con 10 y 20 % p/v de sílicagel. Esto se muestra en la figura 2.8 mostrando que la correlación sigue manteniéndose independientemente del sólido inerte (perlas de vidrio o sílicagel) que se haya agregado a los cultivos.

FIGURA 2.8. Correlación entre hierro total precipitado y número de bacterias adheridas en cultivos con agregados de perlas de vidrio o sílicagel



A partir de esta correlación puede obtenerse que aproximadamente  $4,3 \times 10^{10}$  bacterias se adhieren por cada gramo de hierro precipitado. Debe recordarse que en estos cálculos se ha tenido en cuenta la cantidad de bacterias que pudieran estar adheridas en los cultivos control, al restar la cantidad de hierro precipitado en los mismos (obviamente, se ha supuesto un comportamiento similar en todos los cultivos y que las



bacterias se adhieren esencialmente sobre los precipitados de hierro). Aceptando esta relación, han desaparecido de la solución (al adherirse a la jarosita) aproximadamente  $4,7 \times 10^9$  bacterias ( $4,7 \times 10^7$  bact.ml<sup>-1</sup>) en los cultivos control, lo que ha provocado una sobre-estimación (del orden del 30 %) en todas las velocidades específicas calculadas en la primera sección. Sin embargo, no es posible volver a calcular las mismas debido a que se desconoce la cantidad de jarosita precipitada en cada instante y la veracidad de las suposiciones anteriores.

## 2.2.4. Influencia del mineral de Bajo La Alumbraera sobre la oxidación bacteriana de hierro(II)

### 2.2.4.1. Descripción experimental

Como se adelantó en la introducción, en los procesos de tratamiento de minerales, los sólidos presentes en mayores proporciones corresponden a la ganga del mineral (material descartado) luego de los procesos de lixiviación. Por esta razón, resulta particularmente importante decidir su influencia sobre el crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* y sobre la capacidad de oxidación de hierro(II).

En estas experiencias se utilizó el mineral de Bajo La Alumbraera. Este mineral de cobre de alto interés económico para nuestro país, se extiende a dos mil setecientos metros sobre el nivel del mar, en una zona deprimida entre las montañas en el departamento de Belén en la provincia de Catamarca. El mineral de Bajo La Alumbraera, que por su extensión constituye uno de los principales yacimientos minerales de oro y cobre en el mundo, contiene un promedio de 0,5 % de cobre que se encuentra fundamentalmente bajo la forma de calcopirita ( $\text{FeCuS}_2$ ), calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) y covelita ( $\text{CuS}$ ) y 0,6 gramos de oro nativo por tonelada<sup>27</sup>.

Antes de su uso, muestras del mineral con un contenido medio de cobre de 1,25 %<sup>28</sup> fueron sometidas a procesos de biolixiviación utilizando *Thiobacillus ferrooxidans*. Los residuos de este proceso que contenían aproximadamente 0,41 % de cobre (y que denominamos ganga), fueron utilizados en todas las experiencias realizadas en esta sección previo tratamiento similar al utilizado para las perlas de vidrio (ver sección 2.1.1). Se utilizaron partículas con un tamaño comprendido entre 3,36 y 2,00 mm.

Se prepararon cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* en condiciones semejantes a las utilizadas con perlas de vidrio (todos por cuadruplicado) con y sin agregados de 20 % p/v de ganga del mineral. Los frascos fueron inoculados al 5 % v/v con una población bacteriana en el inóculo (obtenido como en 2.2.1.1) de  $1,5 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>. Sistemas similares pero estériles, fueron utilizados como controles. La experiencia se realizó en frascos agitados (a 180 rpm) y termostatizados a 30 °C.

---

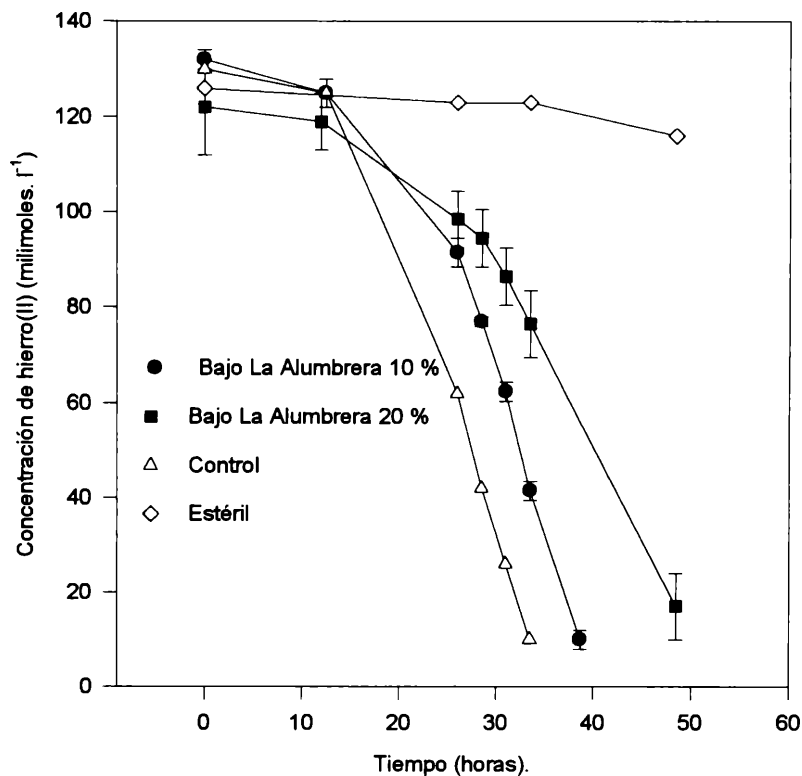
<sup>27</sup>Nueva. 1996. ADISA, Buenos Aires, 3, 273, 8-16.

Durante la experiencia se determinaron el consumo de hierro(II) en función del tiempo, las concentraciones totales de hierro, población bacteriana y pH al comienzo y al final de la experiencia, de modo absolutamente semejante a lo descrito en secciones experimentales precedentes.

#### 2.2.4.2. Discusión de los resultados experimentales

La figura 2.9 muestra la evolución de la concentración de hierro(II) en función del tiempo para todos los sistemas (se representó el promedio y la desviación standard correspondiente).

FIGURA 2.9. Cambio de la concentración de hierro(II) en el tiempo, en cultivos de *T. ferrooxidans* con y sin agregado de ganga del mineral de Bajo La Alumbraera



<sup>28</sup>Porro, S., Boiardi, L. y Tedesco, P. 1988. "Biolixiviación de minerales argentinos de cobre". Rev. Metal. Madrid 24, 297-302.

Los cultivos con y sin ganga del mineral presentan una evolución significativamente diferente siendo las productividades de 3,58 y 2,16 mM.h<sup>-1</sup> (con una desviación estándar de aproximadamente 0,06 mM.h<sup>-1</sup>), es decir, las bacterias oxidaron hierro(II) más lentamente en presencia de la ganga del mineral que en su ausencia. Por otro lado, en forma coincidente con los otros sólidos agregados previamente, la precipitación de hierro en el cultivo con agregado de mineral fue superior a la del control ( $3,5 \pm 0,5$  g.l<sup>-1</sup> y  $1,3 \pm 0,2$  g.l<sup>-1</sup> respectivamente) al igual que el descenso del pH (el valor final en el cultivo con mineral fue de 1,91).

Esta diferencia en el comportamiento respecto de los sólidos inertes previamente utilizados, puede asignarse directamente a la presencia de especies residuales bio-oxidables en la ganga (esencialmente sulfuros) que, al ser fuentes de energía alternativas para la bacteria, retardan la oxidación del hierro(II) soluble.

Para evidenciar este comportamiento se agregó en la figura 2.9, la evolución de la concentración de hierro(II) para un cultivo con un 10 % p/v de ganga del mineral. Este cultivo se comportó con velocidad de oxidación de hierro(II) intermedia entre la del control y la del cultivo con 20 % p/v de densidad de pulpa; su productividad fue 3,15 mM.h<sup>-1</sup> (desviación de 0,05 mM.h<sup>-1</sup>). Además, en este cultivo se encontró una precipitación de hierro ( $2,8 \pm 0,5$  g.l<sup>-1</sup>) también intermedia entre el control y el cultivo con 20 % de densidad de pulpa; no obstante, su pH final fue más bajo que el obtenido en el cultivo con mayor cantidad de ganga (1,83 frente a 1,91 respectivamente) indicando la probable existencia de una especie de características básicas en la ganga. Finalmente, esto fue verificado por el incremento en el pH detectado en un sistema estéril con agregado de ganga (pH final igual a 2,18).

## 2.2.5. Influencia de carbón activado sobre la oxidación bacteriana de hierro(II)

### 2.2.5.1. Descripción experimental

Estas experiencias se realizaron en condiciones coincidentes con las descritas en 2.1.1 excepto que se reemplazaron las perlas de vidrio por carbón activado Charcoal BDH con un tamaño de partícula de 1,0-2,0 mm, que fue tratado con ácido sulfúrico 1:10 hasta que cesó totalmente la producción de gases, luego se enjuagó con agua destilada hasta neutralidad y se esterilizó en autoclave 20 minutos a 120 °C.

Se realizaron cultivos (todos por cuadruplicado) con y sin 20 % p/v de carbón activado y los controles estériles correspondientes. A los frascos se les agregaron inóculos al 5 % v/v obtenidos del mismo modo que se describió en 2.1.1.1 y con una población bacteriana de  $7 \times 10^7$  bact.ml<sup>-1</sup>.

Durante la experiencia se determinaron el consumo de hierro(II) en función del tiempo, las concentraciones totales de hierro, población bacteriana y pH al comienzo y al final de la experiencia de modo absolutamente semejante a lo descrito en secciones experimentales precedentes.

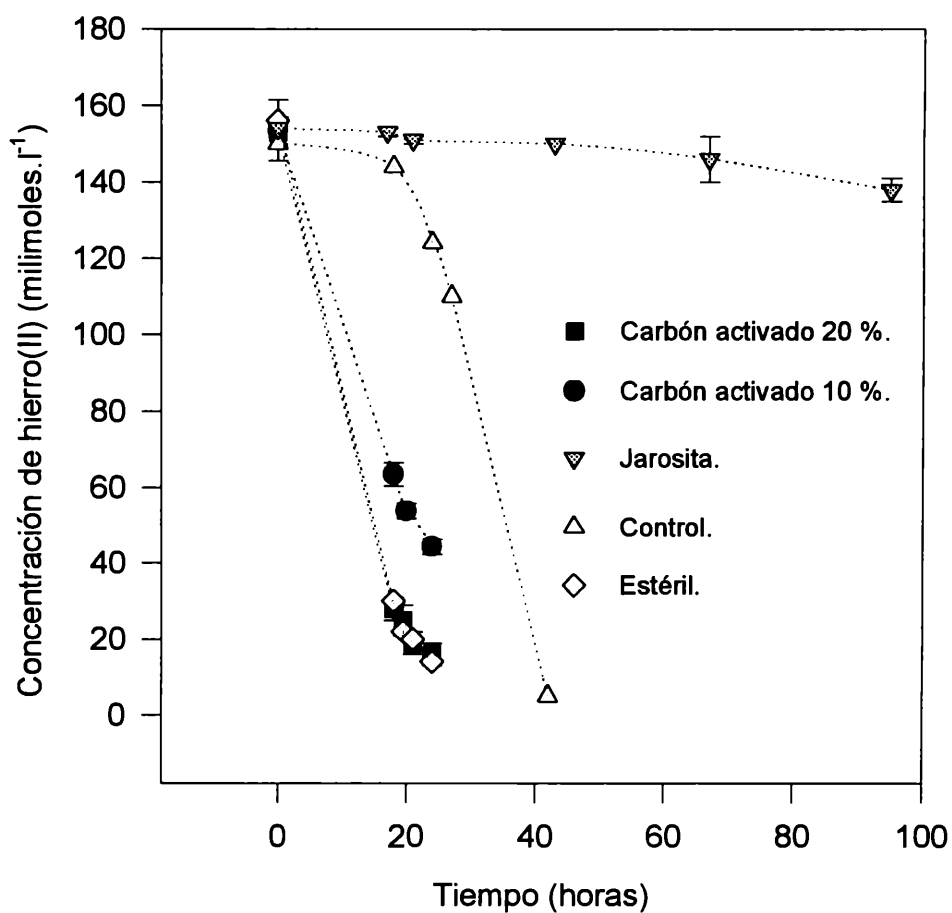
### 2.2.5.2. Discusión de los resultados experimentales

La figura 2.10 muestra el consumo de hierro(II) para todos los sistemas (se representó el promedio y la desviación standard correspondiente).

Curiosamente la oxidación de hierro(II) en los sistemas que contienen carbón activado, tanto estéril como inoculado, es mucho más rápida que la del cultivo control que se comportó normalmente. Aún más, la evolución de los otros parámetros fue muy similar en los sistemas con carbón activado independientemente de la presencia o no de *Thiobacillus ferrooxidans*; así, el pH descendió hasta 1,58 en ambos casos observándose una desaparición similar de hierro total (7 g.l<sup>-1</sup> y 6,9 g.l<sup>-1</sup> respectivamente para el sistema inoculado y el estéril). La jarosita formada fue separada de la solución y del carbón activado por filtración a través de papel de filtro banda azul (S & S Runderfilter), enjuagada con 20 ml de 0 K en porciones de 5 ml por vez y finalmente pesada

obteniéndose valores semejantes para el sistema estéril como en el inoculado:  $1,0 \pm 0,2$  g y  $0,9 \pm 0,2$  g respectivamente (estos valores solo son semicuantitativos debido a que buena parte de la jarosita quedó firmemente adherida al carbón).

FIGURA 2.10. Cambio en la concentración de hierro(II) en el tiempo, en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* con y sin agregado de carbón activado



Debido a la similitud del comportamiento de ambos sistemas y ante la posibilidad de que el sistema estéril estuviese contaminado (aún cuando no se detectaron bacterias en solución), la jarosita extraída se agregó a un nuevo frasco con medio 9 K de pH 1,8

(sin posterior inoculación). La evolución de este sistema también se muestra en la figura 2.10 con símbolos blancos comprobándose que no se produce oxidación de hierro(II) ni desarrollo bacteriano en el periodo observado. Esto significa que no hubo problemas de contaminación, al menos en la proporción necesaria para justificar la enorme velocidad de oxidación de hierro(II) registrada en los sistemas con carbón activado.

Estos resultados implican que la oxidación registrada fue esencialmente abiótica y la acción catalítica observada no corresponde a las bacterias sino al carbón activado. En un trabajo previo, Grishin y Tuovinen<sup>29</sup> reportaron que el uso de carbón activado como soporte en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* permitía la mayor productividad de hierro(III); sin embargo, el trabajo adolece de una evidente falencia y es la ausencia de controles estériles que, de acuerdo a los presentes resultados, hubieran debido mostrar una similar productividad. Una crítica a los resultados de este trabajo fue realizada por Kai y colaboradores<sup>30</sup>.

La semejanza en la evolución de los sistemas, inoculados y estériles, a los que se les agregó carbón activado, comprueba la insignificante influencia de las bacterias en la oxidación de hierro(II) observada; más aún, el cultivo control (sin carbón activado) oxida hierro(II) a un ritmo mucho menor que el observado en los sistemas con carbón.

No se ha sido posible hasta el momento dilucidar la naturaleza de la acción catalítica del carbón aunque es claramente independiente de la acción de las bacterias.

---

<sup>29</sup>Grishin, S.I. and Tuovinen, O. H. 1988. "Fast kinetic of Fe<sup>++</sup> oxidation in packed-bed reactor". *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3092-3100.

<sup>30</sup>Kai, T. Takahashi, T., Shirakawa, Y. and Kawabata, Y. 1990. "Decrease in iron oxidizing activity of *Thiobacillus ferrooxidans* adsorbed on activated carbón". *Biotechnol. Bioeng.* 36, 1105-1109.

### 2.3. CONCLUSIONES

- Las experiencias realizadas en este capítulo permitieron comprobar un comportamiento semejante de todos los parámetros (concentración de hierro(II), concentración total de hierro soluble, pH, bacterias en solución, etc) en los cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* a los cuales se les agregó perlas de vidrio o silicagel incluso a diferentes densidades de pulpa. Esto permite asegurar que la presencia de estos sólidos es solo como disparador de la precipitación de hierro lo que consecuentemente acarrea la variación de los otros parámetros; sin embargo, en ningún caso su influencia se traduce en una inhibición significativa de la catálisis bacteriana de la oxidación de hierro(II). De todos modos, la presencia del sólido traerá consecuencias importantes según fuera el destino de los cultivos. Así, si fuera importante lograr la mayor concentración de hierro(III) soluble (por ejemplo, en el caso de utilizarlo para algún proceso de lixiviación en el cual fuera necesario un medio oxidante soluble) o una alta población bacteriana libre (por ejemplo, cuando el cultivo se utilizara como inóculo en nuevos procesos o experiencias) será importante que estos sólidos no se encuentren presentes para evitar la precipitación de hierro y el secuestro de bacterias. Por el contrario, en los casos en los que la capacidad de esta bacteria será utilizada precisamente para la eliminación de hierro presente en la solución (por ejemplo, en el tratamiento de los drenajes ácidos de las minas) o en aquellos en los cuales interese mantener un gran número de bacterias en una fase sólida (por ejemplo, en la preparación de bio-películas según se discutirá en capítulos posteriores), la presencia de estos sólidos, esencialmente no inhibitorios de la acción catalítica, será importante para un aumento notable de la precipitación del hierro y del incremento en la población bacteriana adherida.
- El incremento de la precipitación de hierro en los cultivos en los cuales están presentes los sólidos inertes y que podrían comportarse como eventuales núcleos de cristalización, podría comprenderse a través de un proceso inicial con adherencia de bacterias sobre estos sólidos inertes (que se describirá en el próximo capítulo). Estas bacterias oxidan hierro(II) en la interfase provocando en dicha zona un incremento importante de la concentración de hierro(III) y un ascenso importante del pH favoreciendo de ese modo la precipitación de jarosita en un medio con alta



concentración de sulfatos. Estos precipitados de jarosita adhieren un gran número de bacterias (tal cual sugieren los resultados de este capítulo y tal cual se comprobará independientemente en el próximo) que continuarán el proceso de oxidación y consecuente precipitación de hierro tal cual se describió. Una mayor densidad de pulpa (y, eventualmente, una mayor superficie específica) solo influirán incrementando el área donde ocurre la precipitación y en consecuencia, provocarán mayor formación de depósitos de hierro con el consecuente arrastre de bacterias.

- El otro sólido inerte (carbón activado) produjo la catálisis de la oxidación de hierro(II) en forma completamente abiótica y acelerando el proceso a velocidades mucho mayores que las alcanzables por catálisis bacteriana por lo cual no resulta un material adecuado para un estudio de la actividad y el crecimiento del *Thiobacillus ferrooxidans*.
- El único sólido no inerte utilizado, ganga del mineral de Bajo La Alumbraera, si bien con un comportamiento semejante al de los otros, demostró no ser adecuado si se pretende conseguir altas productividades de hierro(III). Su comportamiento será discutido con mayor detalle en próximos capítulos.

# CAPÍTULO 3

Adherencia de las células de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre distintos soportes.  
Efecto de la precipitación de jarosita

### 3.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, ha adquirido gran importancia para un gran número de procesos tecnológicos, la inmovilización de grandes biomásas, en particular, de bacterias. Debido a esto se han realizado un gran número de estudios de adherencia bacteriana sobre distintos soportes, inertes o no, su influencia en el crecimiento y metabolismo bacteriano, así como los mecanismos que intervienen en la adherencia sobre distintos soportes. Así, se ha propuesto un mecanismo general para la adherencia bacteriana dividido en cuatro etapas <sup>1</sup>.

- Transporte de las células a la superficie. Este transporte puede producirse a través de tres vías distintas:

i) transporte difusivo que se produce cuando las bacterias presentan un movimiento browniano apreciable (velocidad promedio de  $40 \mu\text{m h}^{-1}$ ) que puede ser observado bajo el microscopio. Es un transporte considerado lento si se lo compara con el transporte convectivo o con el movimiento activo.

ii) transporte convectivo que es debido a flujos líquidos y es de varios órdenes de magnitud superior al transporte difusivo; aun así, existen situaciones en las cuales el acercamiento final hacia la superficie está controlado por difusión.

iii) movimiento activo que puede ocurrir por cambios o respuesta quimiotáctica a algún gradiente de concentración que puede existir en la región interfacial cuando una bacteria móvil se encuentra en la vecindad de la superficie.

- Adhesión inicial. Este proceso es esencialmente fisicoquímico. La suspensión bacteriana puede ser considerada como un sistema coloidal vivo y en primera aproximación puede ser descrita por las teorías químicas del coloide (como, por ejemplo, la teoría de DLVO<sup>2</sup>). En términos generales esta teoría describe los cambios en la energía libre de Gibbs como una función de la distancia entre dos cuerpos. Si los efectos estéricos no juegan ningún rol, la interacción total de la energía de Gibbs es obtenida a partir de la suma total de interacciones de Van der Waals y a mientras que las interacciones electrostáticas serán atractivas o repulsivas de acuerdo las cargas superficiales de bacterias y soporte. La adhesión inicial puede ser reversible

---

<sup>1</sup>van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder, A. J. B. 1990. "Influence of interfaces on Microbial Activity". *Microbiological Reviews* 54, 75-87.

<sup>2</sup>van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. and Zehnder A. J. B. 1989. "Bacterial

o irreversible; para el primero se acepta habitualmente que la bacteria depositada sobre la superficie sigue exhibiendo movimiento browniano y puede ser removida de la superficie con facilidad o por su propia movilidad bacteriana mientras que en el caso de la adherencia irreversible, no se presenta el movimiento browniano y no pueden ser removidas de la superficie fácilmente.

- Después que la bacteria ha sido depositada sobre la superficie del sólido, estructuras especiales de la superficie bacteriana (fibrillas) y/o compuestos secretados por la bacteria (polímeros), pueden formar fuertes uniones entre la célula y la superficie del sólido.
- Colonización bacteriana. Esta última etapa tiene lugar cuando las células fuertemente adheridas comienzan a crecer generando microcolonias y formando una bio-película.

Los dos últimos procesos son característicos del tipo de microorganismo por lo que resultan mucho más específicos que los dos primeros.

El término bio-película está asociado con un agregado microbiano, consistente en microorganismos pegados a una superficie, replicándose y produciendo sustancias extracelulares (exopolímeros) que participan en el pegado ya que sostienen a las células a la superficie y entre sí. La bio-película se forma espontáneamente sobre un soporte inerte e incrementa su volumen con el tiempo debido a la reproducción microbiana<sup>3,4,5,6</sup>. Las bio-películas son responsables de la mayoría de las actividades microbianas en situaciones naturales o biotecnológicas<sup>7</sup>.

La bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* manifiesta una tendencia natural a crecer sobre superficies sólidas. Por esta razón, resulta particularmente sencilla su inmovilización sobre diversos soportes consiguiendo elevadas biomasas que permiten incrementar la velocidad de oxidación de diversos sustratos (esencialmente, hierro(II)). *Thiobacillus ferrooxidans* ha sido inmovilizado sobre diversos soportes incluyendo las perlas de vidrio, resinas de intercambio iónico, carbón activado, arena y partículas de

---

adhesion: A physicochemical approach". Microb. Ecol. 17, 1-15.

<sup>3</sup>Christiansen, B. E. 1989. "The role of Extracellular Polysaccharides in Biofilm". J Biotechnol 10, 181-202

<sup>4</sup>Wilderer, P. A and Characklis, W. G. 1989. "Structure and Function of Biofilms". In: Structure and Function of Biofilm. Characklis, W. G. and Wilderer, P. A. (ed), John Wiley, New York, 5-17.

<sup>5</sup>Karamanev, D. G. 1991. "Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*". J Biotechnol 20, 51-64.

<sup>6</sup>Meyer, A. and Waillies, F. M. 1997. "Development of microbial biofilms on various surfaces for the treatment of heavy metal containing effluents". Biotechnology Techniques 11, 859-863.

<sup>7</sup>Marshall, K. C. 1994. Curr Opin Biotechnol 5, 296-301.

poliestireno. Los primeros trabajos con *Thiobacillus ferrooxidans* inmovilizados se hicieron sobre PVC (cloruro de polivinilo) utilizando reactores rotatorios<sup>8,9</sup>. También fueron utilizadas bacterias atrapadas dentro de alginato de calcio, agar y resinas de uniones entrecruzadas activadas por la luz<sup>10,11,12</sup>. Otros investigadores como Garcia M. y colaboradores<sup>13</sup> utilizaron un mineral de bajo grado en cobre como soporte.

Tuovinen y colaboradores<sup>14</sup> probaron perlas de vidrio, resinas de intercambio iónico y partículas de carbón activado como materiales soportes. En dicho trabajo se emplearon medios de cultivo de bajos pH de modo de proveer un mayor espacio para la adsorción de bacterias porque impide la precipitación de hierro(III).

Una falencia importante de los trabajos previos realizados sobre *Thiobacillus ferrooxidans* es la ausencia de estudios sobre relaciones entre adherencia bacteriana y formación de bio-películas. Por esta razón, el presente capítulo se ha dirigido a estudiar adherencia bacteriana de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre distintos soportes, las características de la adhesión inicial y de la colonización y su eventual relación con las productividades de hierro(III) que se alcanzan en las bio-películas formadas. Por otro lado, en la mayoría de los estudios realizados por otros autores, se ha insistido en la necesidad de trabajar a bajos pH para impedir la formación de jarosita; sin embargo, en el capítulo 2 se ha probado que ésta tiene un papel aparentemente relevante en la adherencia bacteriana por lo que en este capítulo se intentará definir su verdadero papel en la formación de bio-películas.

---

<sup>8</sup>Olem, H. and Unz, R.F. 1977. "Acid mine drainage treatment with rotating biological contactors". Biotechnol. Bioeng. 19, 1475-1491.

<sup>9</sup>Olem, H. and Unz, R.F. 1980. "Rotating-disc biological treatment of acid mine drainage". J Water Pollut Control Fed 52, 257-269.

<sup>10</sup>Lancy, E. and Tuovinen, O. 1984. "Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* immobilised calcium alginate". Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 94-99.

<sup>11</sup>Wakao, N., Endo, K., Sakurai, Y. and Shiota, H. 1994. "Immobilisation of *Thiobacillus ferrooxidans* using various polymers as matrix". J. Gen. Microbiol. 40, 349-358.

<sup>12</sup>Karamanev, D. G and Nikolov, L. N. 1988. "Influence of some physicochemical parameter on bacterial activity of biofilm: ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*". Biotechnol. Bioeng 31, 295-299.

<sup>13</sup>Garcia, M. J., Palencia, I. and Carranza, F. 1989. "Biological ferrous oxidation in packed-bed columns with low-grade sulphide mineral as support". Process Biochemistry 24, 84-87.

<sup>14</sup>Grishin, S. and Tuovinen, O. 1988. "Fast kinetic of Fe<sup>++</sup> oxidation in packed-bed reactor". Applied and Environmental Microbiology 54, 3092-3100.

## 3.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 3.2.1. Adherencia bacteriana del *Thiobacillus ferrooxidans* a distintos soportes (etapa de adhesión inicial)

#### 3.2.1.1. Descripción experimental

Se utilizaron como soportes perlas de vidrio, sílicagel, carbón activado y mineral de Bajo de la Alumbrera con las características y el tamaño de partícula descrito en el capítulo anterior.

Todos estos sólidos fueron tratados con HCl 20 % v/v durante 2 horas y enjuagados con agua destilada hasta eliminar completamente la acidez. Luego se esterilizaron en autoclave 20 minutos a 120 °C.

La suspensión bacteriana utilizada en los ensayos siguientes se obtuvo de la siguiente forma: las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 11477 cultivadas en medio 9 K<sup>15</sup> de pH inicial 1,80 fueron cosechadas al final de la fase exponencial de crecimiento, filtradas a través de papel de filtro banda azul (en función de retener depósitos de jarositas), centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 20 minutos. Luego se descartó el sobrenadante, el pellet se lavó con medio 0 K (sin hierro) de pH 1,80 y se centrifugó nuevamente (este tratamiento es necesario para eliminar todo el hierro que pueda quedar adherido a la masa bacteriana). El pellet se suspendió en medio 0 K de pH 1,80.

Las experiencias se realizaron en tubos de ensayo de 20 ml que contenían cada uno 1 g del soporte sólido respectivo y a los cuales se les agregó 5 ml de suspensión bacteriana (permitiendo una densidad de pulpa del 20 % p/v). Luego de una agitación vigorosa durante 15 minutos, todos los cultivos se filtraron por papel banda azul y se determinó por conteo directo en cámara de Petroff-Hausser el número de bacterias en el filtrado. En estudios previos, se ha constatado que 15 minutos es un período de tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de adherencia considerando el equilibrio físico reversible<sup>16,17</sup>.

---

<sup>15</sup> Silverman, M. P. and Lundgren. 1959. "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium. *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields". J Bacteriol. 77, 326-331.

<sup>16</sup>Allison, D. G. and Shutherland, W. J. 1987. "The Rol of Exopolysaccharides in Adhesion of Water Bacteria". J. Gen. Microbiol. 133, 1319-1327.

En función de descontar las eventuales bacterias adheridas al embudo, vidrio, papel de filtro, etc., se realizaron controles (denominados en adelante indistintamente blancos o controles) a los cuales no se les habían agregado los soportes respectivos.

Mediante la resta de las poblaciones bacterianas determinadas después del filtrado del sistema analizado y del blanco correspondiente, se determinó la población adherida por unidad de volumen. El porcentaje de adherencia fue calculado finalmente refiriendo la población adherida a la presente en los sobrenadantes de los blancos. Todos los sistemas fueron realizados por duplicado y los conteos, al menos, por triplicado. La temperatura a la cual se realizó la experiencia fue de 30 °C.

### 3.2.1.2. *Discusión de los resultados experimentales*

Los porcentajes de adherencia determinados para los soportes perlas de vidrio, sílicagel, carbón activado y ganga del mineral de Bajo La Alumbraera fueron 31 %, 44 %, 49 % y 39 % respectivamente.

Esta adherencia es considerada inicial por los tiempos involucrados en los cuales no hay prácticamente crecimiento bacteriano (además no hay fuente de energía adicionada ya que el medio usado fue 0 K, salvo la ganga de mineral aunque los tiempos de contacto son muy cortos para considerar ataque sobre el sólido) y debe ser, por la misma razón, metabólicamente independiente. Los valores obtenidos muestran una adherencia más importante para el carbón activado, al menos, para este pH, mientras que la menor la presentaron las perlas de vidrio.

Existen en bibliografía otros estudios sobre esta primera etapa de adhesión, aunque con resultados diversos, que incluyen especulaciones sobre las fuerzas que intervienen en esta etapa<sup>18,19,20,21,22</sup>. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no

---

<sup>17</sup>Curutchet, G. 1996. "Comparación de dos especies del género *Thiobacillus* en la biolixiviación de sulfuros metálicos". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

<sup>18</sup>Solari, J. A., Huerta, G., Escobar, B., Vargas, T., Badilla-Ohlbaum, R. and Rubio J. 1992. "Interfacial phenomena affecting the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to sulphide mineral surface". *Colloids Surfaces* 69, 159-166.

<sup>19</sup>Ohmura, N., Kitamura, K. and Saiki, I. 1993. "Selective Adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite". *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4044-4050.

<sup>20</sup>Devasia, P., Natarajan K. A., Sathyanarayana, D. N. and Rao, R. G. 1993. "Surface Chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces". *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4051-4055.

<sup>21</sup>Nikolov, L., Valkova-Valchanova, M. and Mehochev, D. 1988. "Oxidation of High Ferrous Iron

avanza hacia las etapas posteriores de adhesión y tampoco correlaciona -o, al menos, intenta correlacionar- la magnitud de esta adherencia inicial con la capacidad posterior de las bacterias para el consumo de nutrientes como hierro(II) y la producción de hierro(III). Esta correlación solo ha sido hecha previamente<sup>23</sup> en medios sin hierro para el ataque de sulfuros sólidos muy insolubles y se realizará en las próximas secciones para el ataque de un sustrato soluble como el hierro(II).

### **3.2.2. Adherencia bacteriana del *Thiobacillus ferrooxidans* a perlas de vidrio en la etapa de colonización. Formación de bio-películas de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre perlas de vidrio. Importancia de la jarosita en este proceso**

#### *3.2.2.1. Descripción experimental*

Se realizó un cultivo por cuadruplicado de *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 11477 en frascos agitados conteniendo 95 ml de medio 9 K a pH 1,80, 20 g de perlas de vidrio y 5 ml de un inóculo cuya población bacteriana fue de  $1,0 \times 10^7$  bact.ml<sup>-1</sup>. Además se realizaron dos controles: uno de ellos estéril con agregado de perlas de vidrio y otro inoculado pero sin perlas de vidrio. Los frascos fueron incubados en un agitador orbital (180 r.p.m.) termostatzado a 30 °C.

Una vez agotado el hierro(II) en los cultivos anteriores, se separaron los sólidos del medio de cultivo. Las perlas de vidrio y la jarosita de dos de los cuatro cultivos semejantes, se separaron del medio líquido por filtración a través de papel banda azul; los sólidos fueron enjuagados con cuatro porciones de 5 ml cada una de medio 0 K de pH 1,80.

En los dos cultivos restantes se separó la jarosita de las perlas de vidrio (agitando los frascos a mano de manera energética se suspende en el medio líquido la jarosita

---

Concentrations by Chemolithotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* in Packed Bed Bioreactors". Journal of Bacteriology 7, 87-94.

<sup>22</sup>Sam, L., Rema, V., Devasia, P. and Natarajan, K.A.1993. "Surface properties of *Thiobacillus ferrooxidans* and its adhesion to mineral surfaces". Current Science 65, 974-978.

<sup>23</sup>Donati E. 1991. "Estudios de los factores químicos y físico químicos en el crecimiento del *Thiobacillus ferrooxidans* y su utilización en la biolixiviación". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P.



mientras que las perlas de vidrio quedan en el fondo del frasco) y, en estas condiciones, el medio fue rápidamente filtrado a través de papel de filtro banda azul. Ambos sólidos (jarosita y perlas de vidrio) fueron enjuagados con cuatro porciones de 5 ml cada una de medio 0 K de pH 1,80, agitando suavemente para eliminar las bacterias que no se encuentran adheridas firmemente a los mismos.

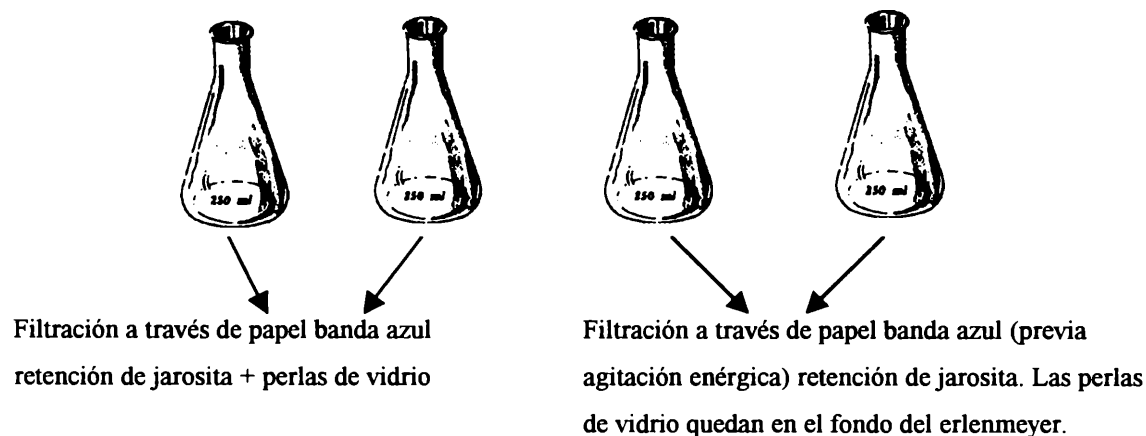
Con los sólidos filtrados: perlas de vidrio, jarosita y perlas de vidrio junto a la jarosita formada, se prepararon nuevos cultivos agregándolos a frascos con 100 ml de medio 9 K fresco. Así, los nuevos cultivos (todos realizados por duplicado) tuvieron como inóculo a las bacterias que se encontraban previamente adheridas a las perlas de vidrio, a la jarosita o a las perlas de vidrio/jarosita al finalizar los cultivos previos. Los cultivos se denominan en adelante P, J y P+J, indicando los que habían sido respectivamente inoculados solo con las perlas de vidrio, con la jarosita o con ambas, en todos los casos, provenientes de cultivos previos.

El pH inicial de los nuevos cultivos fue de 2,01 provocado por el agregado de los sólidos. Los cultivos no se volvieron a inocular y se los incubó en un agitador orbital (180 r.p.m.) termostatzado a 30 °C. Paralelamente, se incubó un control inoculado (frasco con medio 9 K al cual se le agregó un inóculo al 5 % v/v de *Thiobacillus ferrooxidans* preparado como se ha descrito en el capítulo anterior) y otro estéril.

A distintos tiempos se determinó la concentración de hierro(II) y de hierro total, población bacteriana y pH.

Para una mayor claridad se realizó un esquema de la descripción experimental:

Sistema inoculado con *Thiobacillus ferrooxidans* al 5% con perlas de vidrio al 20 %, (realizado por cuadruplicado) al terminar de crecer son tratados de acuerdo al siguiente esquema:



Todos los sólidos son enjuagaos con 20 ml 0K en porciones de 5 ml cada una. Los sólidos colonizados son los inóculos para los nuevos sistemas que se desarrollarían en medio de cultivo 9 K fresco. Los sistemas finales son los siguientes:



J + P

Jarosita + perlas de vidrio



J

Jarosita



P

Perlas de vidrio

Todos los sistemas fueron realizados por duplicados y no fueron vueltos a inocular.

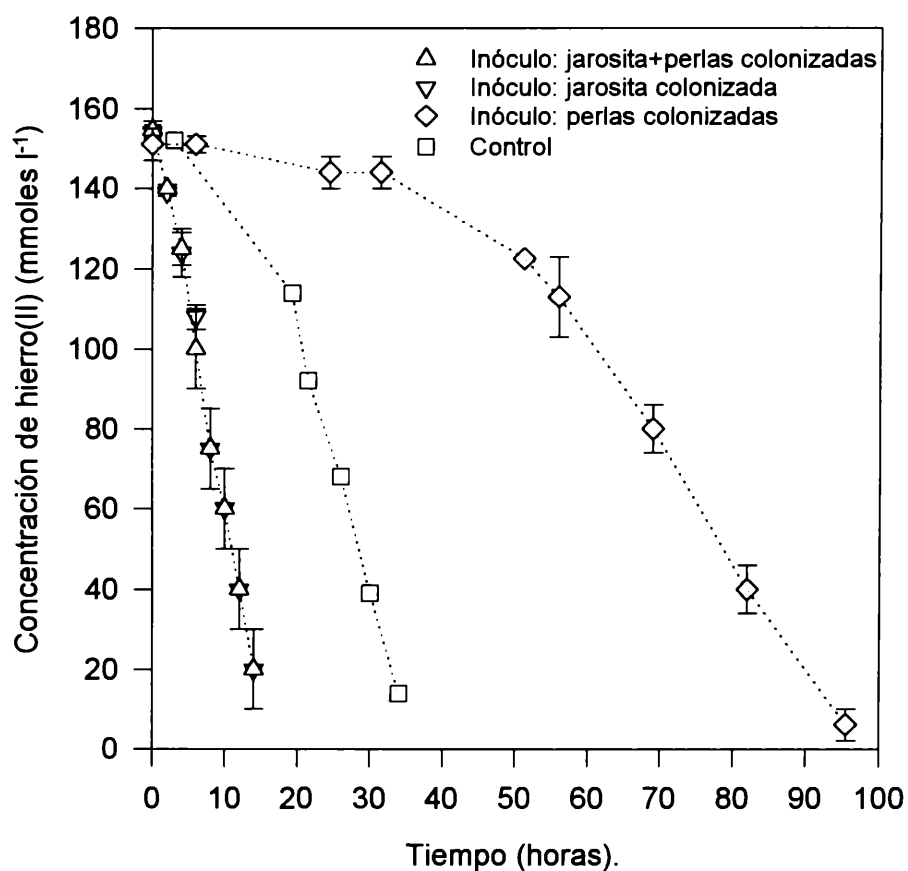
### 3.2.2.2. *Discusión de los resultados experimentales*

Las poblaciones bacterianas en solución apenas agregados los sólidos de los cultivos anteriores fueron  $13 \times 10^6$  células. $\text{ml}^{-1}$  en los cultivos J y P+J, mientras que en el cultivo P la población bacteriana inicial en solución no fue significativa. Estas poblaciones iniciales son un reflejo cualitativo del número total de bacterias colonizadas sobre los sólidos que se agregaron en cada caso.

El consumo de hierro(II) en función del tiempo se observa en la figura 3.1 para los cuatro sistemas mencionados (se representó el promedio y la desviación standard correspondiente).

La velocidad de oxidación de hierro(II) es muy superior en los sistemas que fueron inoculados con J (independientemente de que se arrastraran o no las perlas) superando incluso a un sistema inoculado externamente; en cambio, el cultivo inoculado con las perlas de vidrio exclusivamente es claramente más lento que el sistema control. Las productividades de hierro(III) calculadas son  $9,57 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  (para los sistemas J y P+J) y  $1,52 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$  (para el sistema P).

FIGURA 3.1. Consumo de hierro(II) en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* inoculados con sólidos (perlas de vidrio y/o jarosita) provenientes de cultivos previos



Los pH finales determinados en los sistemas (1,57, 1,67 y 1,803 para P+J, J y P respectivamente) correlacionan con la desaparición de hierro en los sistemas ( $5,2 \pm 0,5$  g.l<sup>-1</sup>,  $5,0 \pm 0,1$  g.l<sup>-1</sup> y  $4,5 \pm 0,5$  g.l<sup>-1</sup> respectivamente) por precipitación de jarosita. Las poblaciones bacterianas en solución son  $56 \times 10^6$ ,  $125 \times 10^6$  y  $60 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup> para los tres cultivos en el orden indicado.

El cultivo inoculado solo con perlas de vidrio colonizadas (P) muestra una fase lag (tiempo durante el cual no se produce una variación significativa de la concentración de hierro(II)) de 48 hs mientras la etapa lag del control es solo de 13 hs. Los cultivos J y J+P no muestran esta fase lag y comienzan a oxidar hierro(II) inmediatamente. En

realidad, esta fase lag solo es aparente ya que todos los sistemas fueron inoculados con bacterias que provenían de cultivos en el mismo estadio de desarrollo y, además, los nuevos medios tienen exactamente la misma composición química que aquellos de los cuales provienen<sup>24,25</sup>. Esta aparente fase lag puede ser debida a que es muy diferente el número de bacterias que colonizaron los sólidos en los cultivos anteriores o, eventualmente, que es menor la fracción de bacterias viables llevadas en las perlas de vidrio respecto del que lleva la jarosita. Cualquiera de estas dos hipótesis queda corroborada por diferencias poco significativas en los cultivos J y P+J.

En función de decidir estas dos hipótesis se realizaron microfotografías de las perlas de vidrio colonizadas de modo semejante a aquellas utilizadas como inóculo en el cultivo P.

Las perlas de vidrio colonizadas por *Thiobacillus ferrooxidans* fueron separadas del medio de cultivo y lavadas con 0 K de pH igual 1,80, luego se apoyaron sobre un papel de filtro y fueron dejadas dentro de un desecador de vidrio conteniendo  $Cl_2Ca$  durante 24 hs. Idéntico tratamiento tuvieron las perlas no colonizadas (lavado y secado). Ambos sistemas fueron metalizados con oro y se realizaron microfotografías con un microscopio Jeol J.S.M. T 100.

Las dos primeras microfotografías (figura 3.2) muestran: las perlas de vidrio antes y después de ser utilizada en un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans*.

En la segunda microfotografía se observan sobre la perla claros depósitos que por su color, rojizo-anaranjado y distinguible a simple vista, son de jarosita. Las siguientes microfotografías (figura 3-3) corresponden a una zona de la superficie de una perla y una ampliación de la misma.

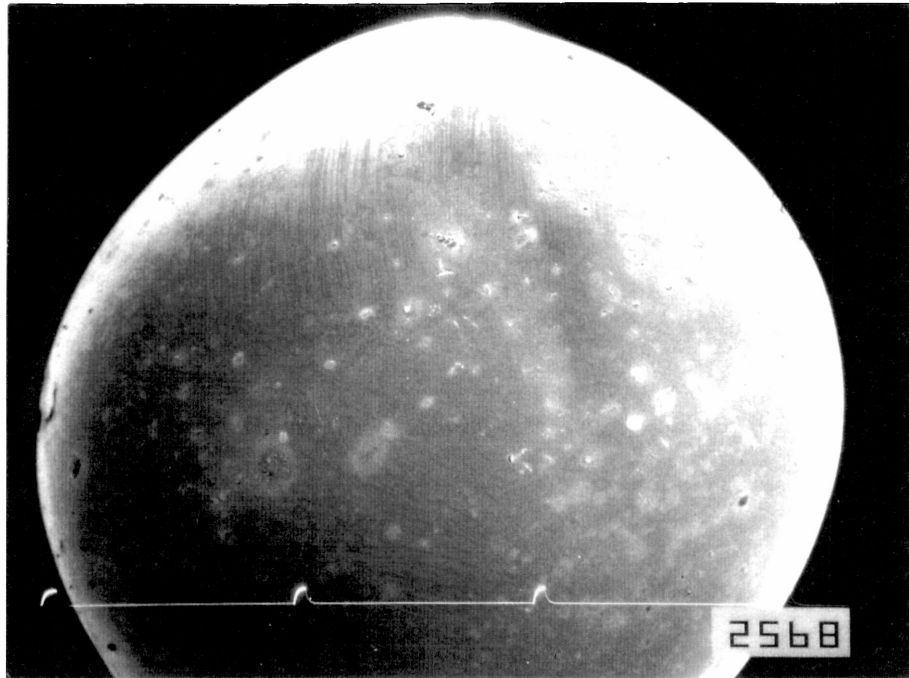
---

<sup>24</sup> Stainer R. Y., Doudoroff. M. y Adelberg E. A. "Microbiología". 1977. Editorial Aguilar.

<sup>25</sup> Davis B. D., Dubenco R., Eisen H. N. y Ginsberg H. S. 1985 "Tratado de Microbiología" 3<sup>ra</sup> Edición Salvat.

FIGURA 3.2 Microfotografías de perlas de vidrio antes (a) y después (b) de estar expuestas a un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans*. Aumento 35 X

(a)



(b)

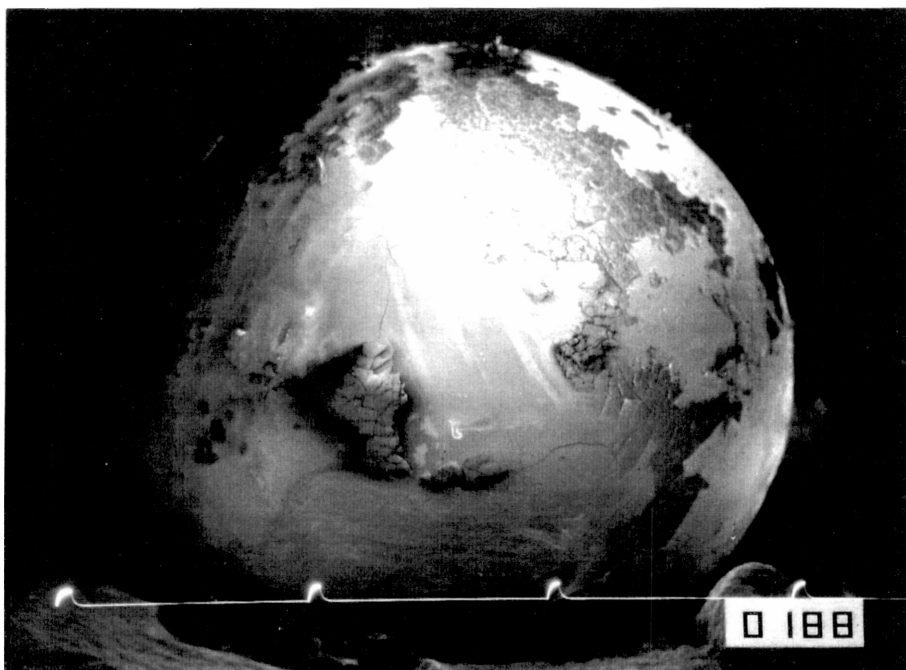
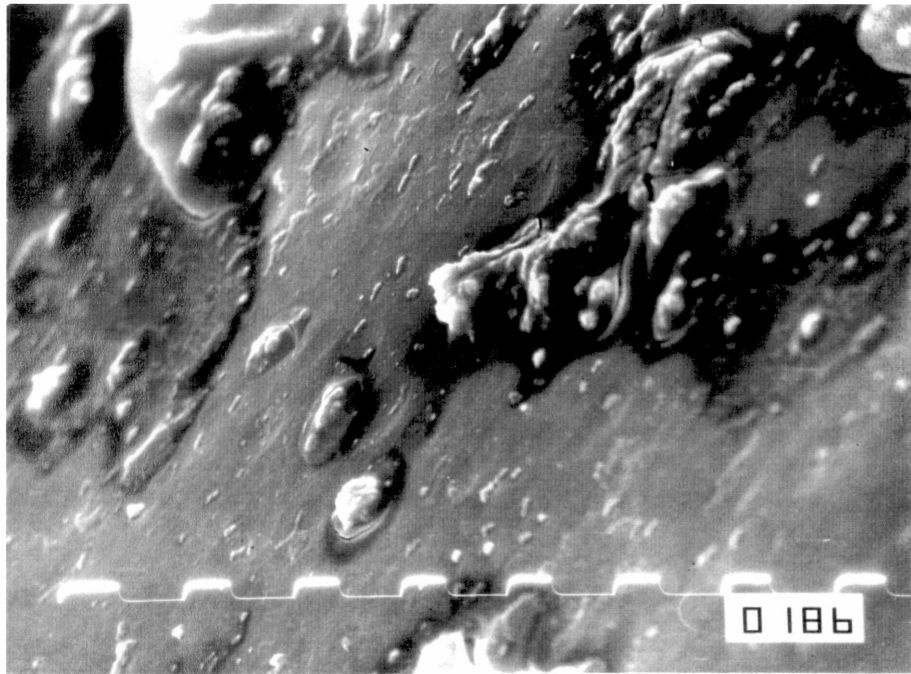
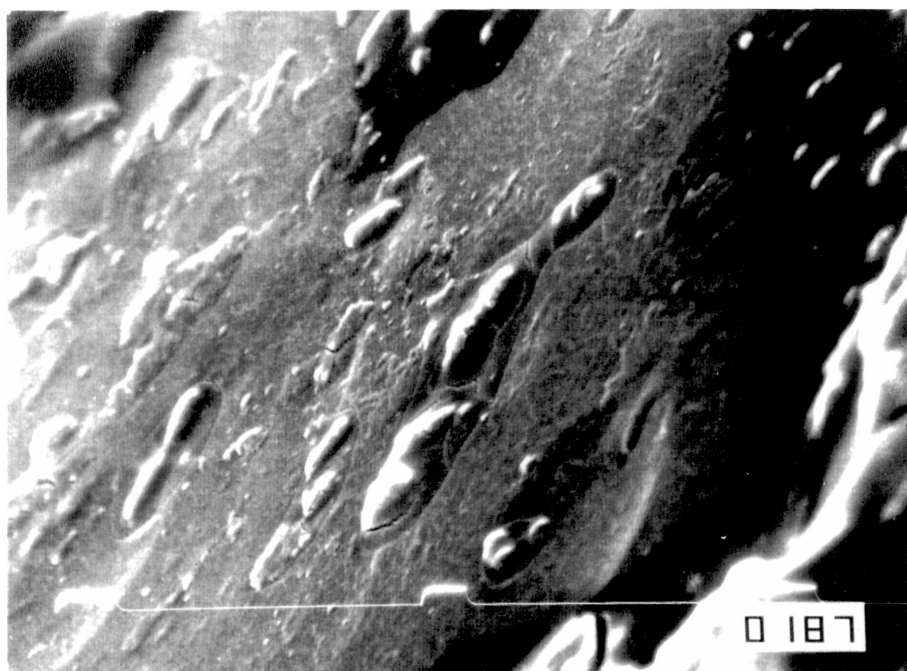


FIGURA 3.3. Microfotografías de una perla de vidrio previamente en contacto con un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* con ampliación 1500 X (a) y 5000 X (b)

(a)



(b)



Se observaron bacterias solo en las zonas donde se detectaron los depósitos anteriores aunque su número es bastante reducido indicando probablemente que es válida la hipótesis de una colonización muy pobre de las perlas de vidrio.

Por otro lado sería importante poder estimar el número de bacterias retenido por cada soporte, para ello se obtuvo una expresión que involucre dicho número con parámetros determinados experimentalmente. La velocidad de aparición de hierro(III) puede expresarse mediante la siguiente expresión, cuya deducción puede encontrarse en el apéndice 1.

$$d[\text{Fe(III)}]/dt = \{ \exp(\mu.t) - 1 \} . X_i / Y_{X/S} \quad (3.1)$$

Donde  $X_i$  corresponde al número de bacterias al comenzar la fase exponencial.

Realizando una regresión no lineal podemos encontrar el número de bacterias iniciales llevado en cada cultivo. Se reemplazó  $\mu$  por  $0,169 \text{ h}^{-1}$  (determinado en el capítulo 2) e  $Y_{X/S}$   $1,45 \text{ mg de bacterias. (g de sulfato ferroso heptahidratado)}^{-1}$ .

De acuerdo a esto, podemos calcular la población inicial al comenzar la fase exponencial en los sistemas donde la jarosita o las perlas colonizadas fueron usadas como inóculos, obteniendo los siguientes valores:

$$X_j = 37,2 \cdot 10^6 \text{ bact. ml}^{-1} \quad (*)$$

$$X_s = 0,062 \cdot 10^6 \text{ bact. ml}^{-1} \quad (*)$$

$X_j$  corresponde a los sistemas inoculados con jarosita y  $X_s$  a los sistemas inoculados con el soporte sólido únicamente (perlas de vidrio).

Estas poblaciones presentes en los sólidos (consideradas iniciales cuando comienza el crecimiento exponencial para el segundo ciclo de cultivos) están expresadas por mililitro del medio en el cual están contenidos dichos sólidos y corresponden al 33,8 % y al 0,1 % de la población bacteriana final. El número de bacterias secuestradas por los sólidos anteriormente mencionados se puede determinar por la diferencia entre el número de bacterias del cultivo control (cuya población bacteriana debería ser igual a la de los cultivos con perlas, según los resultados del capítulo anterior) y las presentes en los sistemas inoculados con perlas de vidrio, cuando terminan de crecer ambos sistemas en iguales condiciones.

Estos valores demuestran que la población bacteriana efectivamente adherida a las perlas y a la jarosita es menor a la población bacteriana que desaparece de la solución; en otros términos, no todas las bacterias que desaparecen de la solución se encuentran adheridas ya sea a los soportes sólidos o a la jarosita formada in situ, lo cual es debido, probablemente, a que buena parte de la población bacteriana en contacto con los sólidos solo está adherida reversiblemente de modo que los sucesivos lavados que se realizaron antes de reinocular el medio de cultivo, fueron suficientes para desprenderlas. Por otro lado, es probable que el número de bacterias llevadas por los soportes sólidos sea mayor que el estimado, ya que solo estamos considerando aquellas -viables- capaces de oxidar el hierro(II). Por lo tanto las bacterias que se encuentren adheridas en zonas profundas de los granos del depósito es probable que no puedan oxidar el sustrato debido a problemas difusionales de los nutrientes o del sustrato y también del oxígeno.

Resulta interesante estimar la velocidad de consumo de hierro(II) a partir del número de bacterias obtenido por el cálculo anterior y compararla con la velocidad experimental. Para el cálculo de la velocidad de los sistemas que poseen jarosita y perlas de vidrio colonizadas, se utilizará la ecuación obtenida del modelo cinético del capítulo anterior (gráfica 2. 2), en función de estimar la viabilidad del modelo utilizado previamente y de las suposiciones realizadas en este punto.

La ecuación experimental obtenida en el capítulo anterior para la velocidad de oxidación de hierro(II) en función de la población bacteriana y de la concentración de hierro(II) para un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* crecido sobre hierro(II) es la siguiente:

$$X/r = 8.5699 + 68.290373/[Fe^{++}] \quad (3.2)$$

Con el valor de  $Y_{X/Fe^{++}}$  utilizado en el capítulo anterior (1,45 mg de células por gramo de  $SO_4Fe \cdot 7H_2O$ ), y la población inicial calculada previamente(\*), podemos calcular el número de bacterias totales como la suma de las iniciales más las generadas a través de la cantidad de sulfato de hierro(II) consumido:

$$X_{\text{totales}} = X_{\text{iniciales}} + X_{\text{generadas}} \quad (3.3)$$

donde X es la masa (mg) de células por litro.

De este modo, se puede estimar punto a punto, las poblaciones bacterianas



instantáneas asociadas a una cierta concentración de hierro(II) en solución y con ellas y la ecuación experimental indicada más arriba (3-2), se calcularon las velocidades de oxidación de hierro(II) en cada punto. Los resultados se encuentran en la tabla 3-1 para el cultivo que contiene jarosita .

TABLA 3.1. Cálculo de las velocidades de consumo de hierro(II) para un cultivo que contiene como inóculo, una bio-película de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre jarosita

SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> O g.l <sup>-1</sup>	Δ SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> O g.l <sup>-1</sup>	N <sub>generadas</sub> mg.l <sup>-1</sup>	N <sub>totales</sub> mg.l <sup>-1</sup>	Γ <sub>calculado</sub> Γ <sub>experimental</sub> (g SO <sub>4</sub> Fe.7H <sub>2</sub> O.h <sup>-1</sup> )
40,73	4,17	6,05	15,8	1,53      2,08
36,56	4,17	6,05	21,9	1,54      2,08
32,25	4,45	6,45	28,3	2,66      2,22
25,44	9,17	13,3	41,6	3,69      4,59
16,68	8,34	12,1	53,7	4,22      4,17
9,035	6,90	10,0	63,7	3,95      3,48

Como resulta evidente de las tablas, existe un buen grado de correlación entre las velocidades experimentales y calculadas ratificando el uso del modelo.

### **3.2.3. Adherencia del *Thiobacillus ferrooxidans* a sílicagel y mineral Bajo La Alumbra en la etapa de colonización. Productividades de hierro(III). Importancia de la jarosita formada in situ**

#### *3.2.3.1. Descripción experimental*

Se realizaron cultivos por cuadruplicado de *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 11477 en frascos conteniendo medio 9 K con pH inicial igual a 1,80 con 20 g de cada uno de los siguientes soportes: sílicagel y ganga del mineral de Bajo La Alumbra (el tratamiento previo fue semejante al indicado en el capítulo anterior). El carbón activado fue eliminado como soporte dado que su presencia provoca una rápida oxidación del hierro(II) aun en sistemas estériles. Los soportes separadamente fueron adicionados a 100 ml de medio de cultivo inoculados al 5 % v/v con *Thiobacillus ferrooxidans*. Se realizó un control estéril (con 20 gramos de cada soporte) y un control inoculado sin agregado de soportes.

Una vez agotado el hierro(II) en los cultivos anteriores, se procedió a separar y a lavar los sólidos presentes con el mismo procedimiento que el descrito en la sección 3.2.2.1. Previamente a este tratamiento se midió en cada cultivo la cantidad de hierro total soluble. La jarosita retenida de dos de los frascos de cada soporte fue enjuagada con agua destilada, secada a temperatura ambiente y pesada posteriormente.

Tanto los soportes sólidos sin jarosita como los que contenían jarosita fueron utilizadas como inóculo en 100 ml de medio 9 K en frascos de 250 ml de capacidad agitados a 180 r.p.m. y termostatizados a 30 °C. Los cultivos (por duplicado) finalmente incubados fueron los inoculados con sílicagel (S), sílicagel y jarosita (S+J), ganga de Bajo La Alumbra (B) y ganga de Bajo La Alumbra y jarosita (B+J).

En estos cultivos se determinó la concentración de hierro(II) y de hierro total en función del tiempo, pH y población bacteriana en solución.

#### *3.2.3.3. Discusión de los resultados experimentales*

En la tabla 3.2 se muestran los cambios en la concentración de hierro total, como así también el peso de la jarosita para cada soporte correspondiente a la primera parte de la experiencia (es decir, a la obtención de los inóculos). Aquí también se incluyen los

resultados obtenidos en la sección precedente donde se utilizaron perlas de vidrio, para luego poder hacer una comparación de los tres soportes sólidos.

TABLA 3.2. Producción de jarosita y descenso de hierro total para los sistemas que contienen: perlas de vidrio (P), sílicagel (S) y ganga del mineral de Bajo La Alumbreira (B)

Sistemas	(P)	(S)	(B)
Jarosita (g)	$0.72 \pm 0.03$	$0.58 \pm 0.02$	$1.1 \pm 0.1$
Fe [mic-fin] (g/l)	$4,4 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,6$

El cálculo de la cantidad de jarosita que debería haberse detectado en cada sistema en base a la cantidad de hierro desaparecida (ver la ecuación 2.13 para la formación de jarosita; se ha supuesto que M es fundamentalmente amonio ya que es el catión monovalente mayoritario en estos medios) proporciona siempre valores mas altos que los experimentales excepto para el caso de la ganga del mineral.

Las diferencias observadas entre el hierro desaparecido de la solución y la jarosita recuperada, se debe probablemente a que se produce una pérdida parcial de jarosita pues parte queda parcialmente adherida al soporte inerte y a las paredes de los frascos donde se realizaron las experiencias y además se producen pérdidas en los sucesivos lavados. Por otro lado, en realidad se ha comprobado a través de difracciones de rayos X que los precipitados si bien son mayoritariamente jarositas, pueden contener óxidos hidratados de hierro(III).

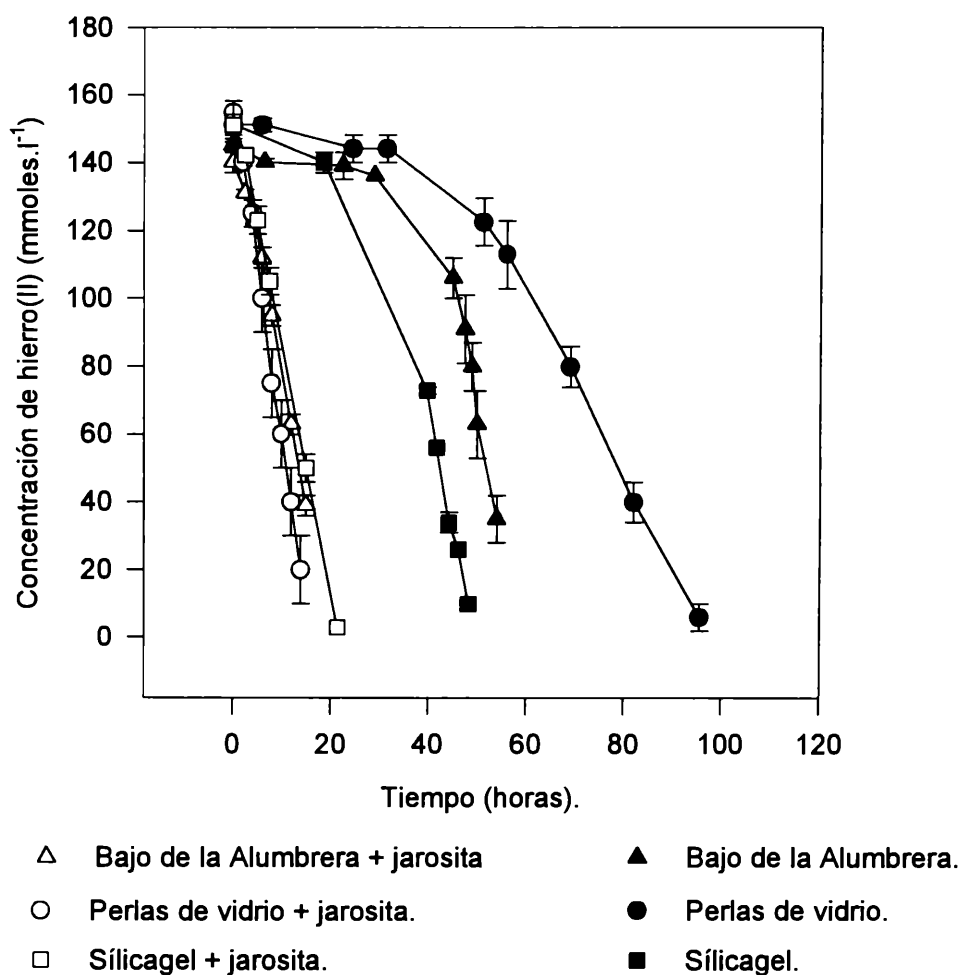
En el caso del mineral Bajo de la Alumbreira, el peso de la jarosita se corresponde aproximadamente con el cálculo realizado a partir del hierro desaparecido de la solución. Las explicaciones para esta compensación de los efectos mencionados en el párrafo anterior, pueden ser las siguientes:

- El mineral no es un soporte inerte y puede ser atacado (al menos, su porción sulfurada) por el hierro(III) generado por acción del *Thiobacillus ferrooxidans* sobre el hierro(II). Este ataque puede formar azufre elemental y además producir el

desmenuzado del mineral generando residuos que son recogidos junto a la jarosita formada (esto fue constatado por la aparición de picos no atribuibles a la jarosita en los difractogramas de rayos X).

- El mineral contiene hierro que, aunque está presente en baja proporción, puede incrementar la cantidad de jarosita producida respecto de la que hubiera dado solamente el hierro agregado en el medio de cultivo.

FIGURA 3.4. Consumo de hierro(II) para cultivos inoculados con soportes sólidos con y sin jarosita) colonizados por *Thiobacillus ferrooxidans*



La figura 3.4 nos muestra el consumo de hierro(II) en función del tiempo para los frascos que fueron inoculados con los distintos soportes sólidos (solos o con jarosita) incluyendo, en función de una rápida comparación, los cultivos en los cuales el soporte

eran las perlas de vidrio y cuya descripción se realizó en la sección precedente. Confirmando lo que se observó previamente para el caso de las perlas de vidrio, independientemente del soporte sólido utilizado, los sistemas que llevaron jarosita terminan de oxidar el hierro(II) en un período de tiempo mucho menor que los sistemas que solo tuvieron como inóculo los soportes sólidos.

En la tabla 3.3 pueden observarse algunas de las medidas realizadas al comenzar y al finalizar el crecimiento de los cultivos y los cálculos realizados para los sistemas mencionados.

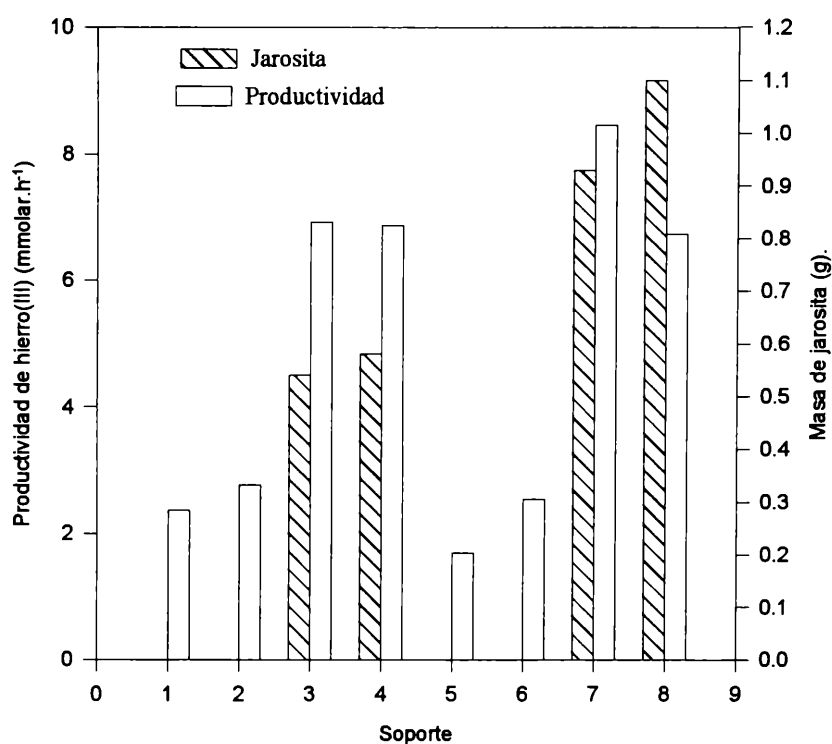
TABLA 3.3. Medidas realizadas al finalizar el crecimiento bacteriano de los cultivos empleando como inóculo sílicagel (S), sílicagel + jarosita (S+J), Bajo la alumbrera (B) y Bajo la alumbrera + jarosita (B+J)

Cultivos inoculados con soportes sólidos (20 % p/v) colonizados con células de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	S	S + J	B	B + J
Población bacteriana inicial en solución (bact/ml) $\times 10^{-6}$	*	33	*	55
Precipitación de hierro (g/l)	$2,3 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,5$
Productividad de hierro(III) ( $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$ )	2.92	6.88	2.0	6.73
Duración de la fase lag Aparente	30	–	38	–

\* Se observaron 1-2 bacterias por campo.

En la figura 3.5 se observan las productividades de hierro(III) calculadas para los cultivos inoculados con bacterias inmobilizadas en cada soporte o en cada soporte-jarosita; también se agregaron las masas de jarosita presentes en cada cultivo (considerando que la cantidad de jarosita adherida a los soportes no es significativa). Los resultados corresponden a cultivos con 10 y 20 % p/v de soporte.

FIGURA 3.5. Productividades de hierro(III) en cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* inoculados con bacterias inmobilizadas en diversos soportes



- |                                |                              |
|--------------------------------|------------------------------|
| 1- Silicagel 10 %.             | 5 - Mineral 10 % .           |
| 2 - Silicagel 20 %.            | 6 - Mineral 20 %.            |
| 3 - Silicagel 10 % + jarosita. | 7 - Mineral 10 % + jarosita. |
| 4 - Silicagel 20 % + jarosita. | 8 - Mineral 20 % + jarosita. |

Los sistemas 1, 2, 5 y 6 solo poseen la jarosita adherida al soporte.

Los resultados para los cultivos con silicagel muestran una dependencia bastante estrecha entre la cantidad de jarosita arrastrada desde el cultivo anterior y la

productividad de hierro(III), lo que está relacionada con el mayor número de bacterias inmovilizadas. Esto confirma una vez más que el mayor número de bacterias se adhiere sobre la jarosita y no sobre el soporte. De todos modos, existe una pequeña diferencia en las productividades medidas cuando las densidades de pulpa para cada soporte son 10 ó 20 % marcando una ligera adherencia sobre el soporte o más probablemente según se ha comentado, sobre la jarosita adherida a los soportes. Estos resultados también son coincidentes para perlas de vidrio (datos no graficados)

En el caso particular de la ganga del mineral de Bajo La Alumbraera, la productividad es mucho menor que la esperada en base a la masa de especies precipitadas. En realidad, como se ha dicho, la jarosita es solo parte del depósito obtenido y, por ende, el número de bacterias adheridas sobre ella y la productividad de hierro(III), son menores a los esperados de acuerdo a la masa total depositada.

Mostrando la veracidad de la hipótesis adelantada sobre la posibilidad de crecimiento bacteriano a expensas de ciertos componentes del mineral (sulfuros, hierro(II)), la productividad decrece cuando se aumenta la densidad de pulpa en el mineral ya que habrá disponible más sustrato en el soporte y, por ende, una mayor población bacteriana atacará al mineral y no al hierro del medio disminuyendo la productividad de hierro(III).

La aparente etapa lag que se observa en estos cultivos inoculados con soportes colonizados por bacterias y separados de la jarosita no adherida, fue disminuyendo desde las perlas de vidrio hasta el sílicagel. Esta fase da una idea estimativa de la cantidad de bacterias que colonizaban cada soporte.

Una relación lineal puede observarse en la figura 3.6 donde se graficó el porcentaje de adherencia hallado en 3.2.1.1. en función de la productividad para los sistemas que poseen bacterias adheridas solamente a los soportes sólidos. La experiencia realizada parece indicar que una vez que las bacterias se adhieren inicialmente a los soportes la oxidación del Fe(II), por ende la producción de jarosita y la adherencia de nuevas bacterias es proporcional al número de bacterias adheridas en la etapa inicial. La colonización bacteriana, estimada por medio de la productividad, resultó ser directamente proporcional al número de bacterias adheridas en la etapa inicial.

Por otro lado de la misma forma que en la sección 3.2.2.2 se calculó el porcentaje de las bacterias retenidas del total presente en la solución para los sistemas que contienen perlas de vidrio, se realizaron los mismos cálculos para los sistemas con distintos

soportes, los resultados se encuentran en la tabla 3.4.

FIGURA 3.6. Adhesión inicial a distintos soportes y la relación con la productividad de hierro(III), cuando los soportes colonizados se utilizaron como inóculo

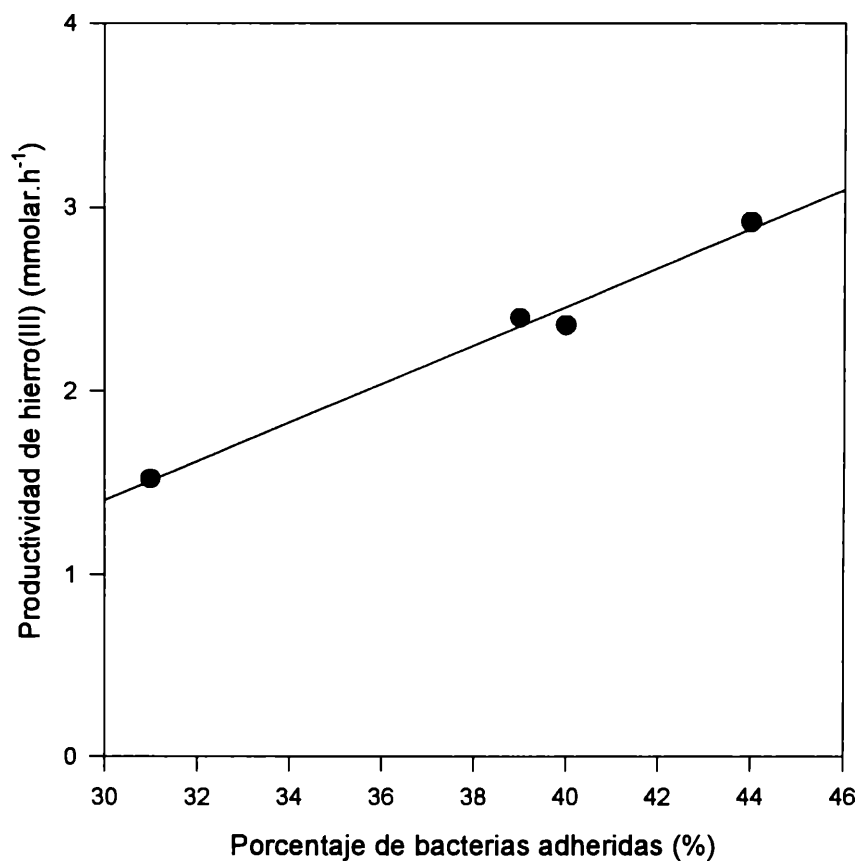


TABLA 3.4. Porcentaje de bacterias secuestradas del total en solución para cada uno de los soportes estudiado.

Vidrio	Vidrio + Jaros.	Ganga	Ganga + Jaros.	Silic.	Silic. + Jaros.
0,1	33,8	8,1	13,6	8,9	12,9



Para la misma densidad de pupa que la utilizada en las perlas de vidrio, se encontró que Bajo La Alumbreira retiene un 37,03% del total de bacterias mientras que la jarosita producida in situ retuvo 62,7 %; por último, sílicagel retuvo 40,8 % mientras que la jarosita producida in situ para este soporte un 59,2 %.

Aquí también observamos que a mayor adherencia inicial tenemos un mayor porcentaje de bacterias secuestradas del total de solución para los sistemas que solo poseen los soportes sólidos, mientras que, para aquellos que además poseen jarosita precipitada, el porcentaje de bacterias secuestrado de la solución está relacionado con la cantidad de hierro desaparecida de la misma.

Existen técnicas de observación microscópica que permiten observar las bacterias adheridas a los soportes in situ, es decir sin ningún tratamiento previo. Este es el caso de Microscopio de Barrido Ambiental, donde las observaciones se realizan a presiones elevadas (aproximadamente 20 mm de Hg), comparadas con las realizadas con un SEM (microscopio electrónico de barrido) y las muestras a observar son colocadas en la platina tal como se encuentran en el ambiente de donde provienen. Empleando la técnica citada fueron observadas muestras de sílicagel colonizadas por bacterias y la jarosita obtenida de dichos cultivos.

En la figura 3.7 puede observarse la superficie de la jarosita de los cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* que crecieron adheridos a sílicagel. La superficie aparece sumamente compleja, porosa e irregular que dificulta la observación de las bacterias.

En la figura 3.8 se observan células de *T. ferrooxidans* adheridas a la jarosita depositada sobre el soporte inerte (sílicagel).

FIGURA 3.7 Jarosita obtenida de un cultivo de *T. ferrooxidans* con silicagel como soporte. Aumento 10000 x.

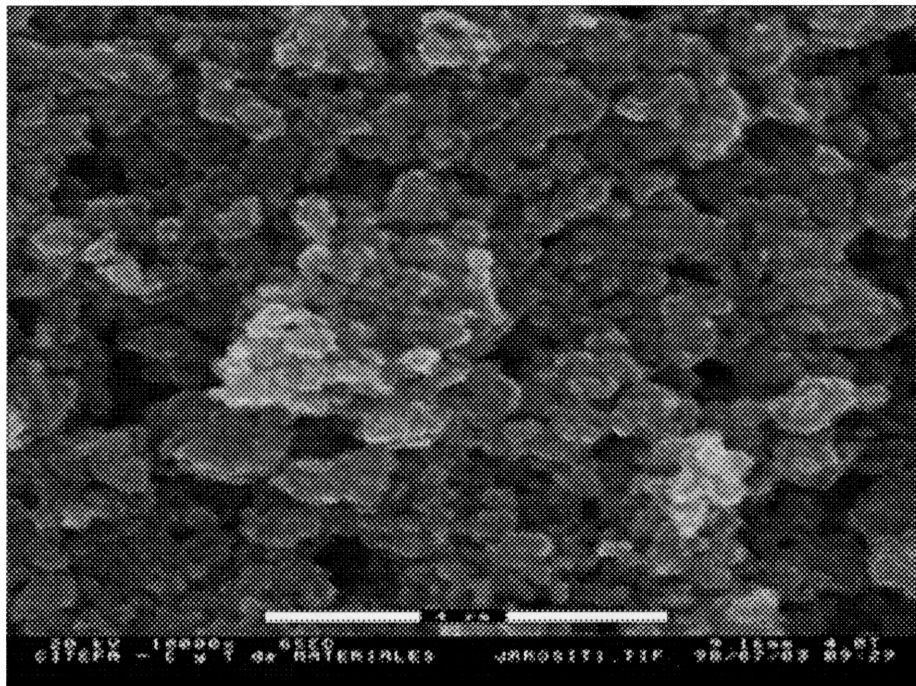
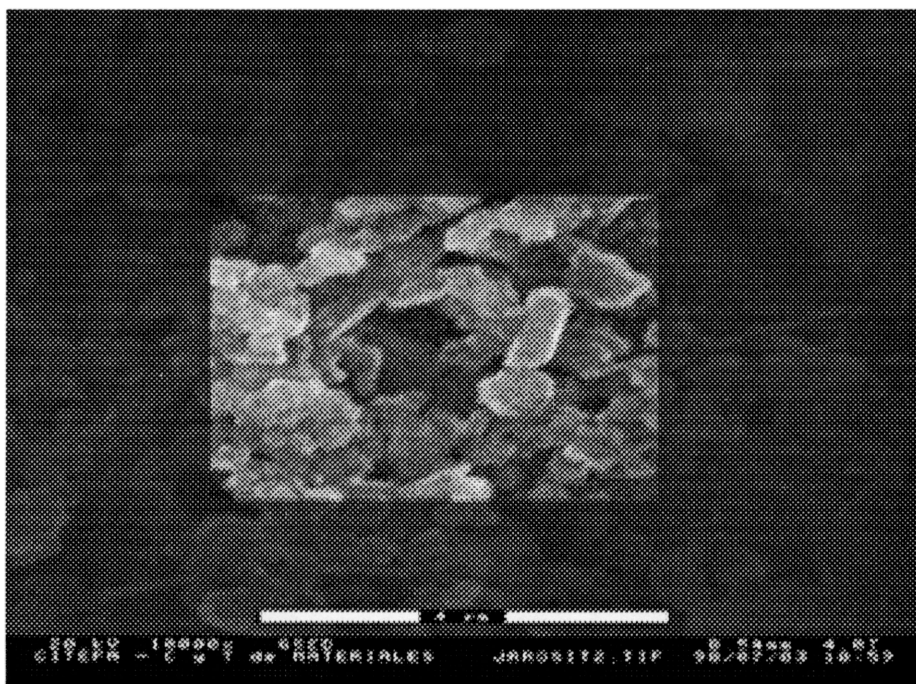


FIGURA 3.8 Célula de *T. ferrooxidans* adherida a la jarosita depositada sobre silicagel. Aumento 10000 x.



### 3.3. CONCLUSIONES

- De los cuatro soportes estudiados, es el carbón activado el que permite la mayor adherencia (por grama de soporte) en la etapa inicial; si bien este hecho lo postula como un soporte adecuado para *Thiobacillus*, los resultados hallados en el capítulo anterior muestran que en la presencia de este sólido se produce una catálisis abiótica de la oxidación del hierro(II) muy importante<sup>23</sup>, lo que impide el desarrollo bacteriano a expensas del sustrato mencionado.
- De los soportes restantes se comprueba que a mayor adherencia bacteriana inicial se produce una mayor colonización por *T. ferrooxidans*. Esto quedó demostrado por una mayor productividad de hierro(III) cuando esos soportes colonizados (provenientes de cultivos que habían agotado hierro(II)) se utilizaron como inóculo. Esa productividad de hierro(III) respondió a una relación lineal con la adherencia inicial.
- La colonización se produjo esencialmente sobre la jarosita, es decir, sobre estos depósitos se encuentran adheridas la mayor cantidad de bacterias desaparecidas de la solución; este hecho fue comprobado por una mayor productividad en los cultivos cuyos inóculos fueron soportes (con jarosita incluida) respecto de los que utilizaron solo los soportes (y eventualmente, la jarosita depositada sobre ellos) como inóculos.
- El número de bacterias secuestradas de la solución está vinculado estrechamente con la cantidad de hierro desaparecido de la misma siendo otros factores (tipo de soportes, superficie expuesta, etc) de influencia indirecta.
- La población bacteriana efectivamente adherida a las perlas y a la jarosita (predicha a través de una regresión lineal a partir de los valores de velocidad de oxidación de hierro(II)) es menor a la esperada teniendo en cuenta solamente las bacterias que desaparecen del cultivo. Este hecho probablemente este relacionado con una adherencia reversible de bacterias que son arrastradas durante los lavados cuando se separaron los soportes y/o la jarosita del cultivo.
- Los resultados obtenidos en este capítulo permiten indicar que en el caso de la adherencia de células de *T.ferrooxidans*, además de los posibles mecanismos habituales de adherencia, debe sumarse el papel de los depósitos de hierro(III) como

---

<sup>23</sup>Jensen, A. and Webb, C. 1995. "Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review". Process Biochemistry 30, 225-236

predominante en los cultivos con hierro. Sin embargo, probablemente en la adhesión inicial en dichos cultivos como en la adhesión bacteriana cuando el hierro no está presente (por ejemplo, cuando el sustrato es un sulfuro muy poco soluble) deben obrar otros mecanismos de interacción superficie-bacteria.

# **CAPÍTULO 4**

Influencia del pH en el crecimiento de  
*Thiobacillus ferrooxidans* y en el desarrollo de  
bio-películas sobre perlas de vidrio

## 4. 1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior hemos comprobado que la jarosita formada durante el crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre hierro(II) en presencia de partículas sólidas, es la responsable de arrastrar una gran cantidad de bacterias (muy superior al asociado a las partículas sólidas agregadas).

Sin embargo, en la mayoría de los estudios en los cuales se pretendía inmovilizar a estas bacterias para formar una bio-película, se ha trabajado en rangos de pH desde 1,5 hasta 1,9 sin hacer mención del papel de la jarosita durante el proceso. En los pocos trabajos donde se menciona la jarosita, en realidad, se sugiere trabajar en condiciones en las cuales la precipitación de hierro(III) no sea abundante. Así, Grishin y colaboradores<sup>1</sup> estudiaron la oxidación de hierro(II) en varios sistemas (perlas de vidrio, resinas de intercambio iónico y partículas de carbón activado como materiales soportes), en cultivos en batch y en cultivos de flujo continuo, usando medios de cultivo con pH entre 1,35 y 1,5, de modo de permitir una mayor superficie para la adsorción de bacterias, al impedir (por el bajo valor de pH) la precipitación de hierro(III). Del mismo modo, García M. y colaboradores<sup>2</sup> indicaron que la bio-película formada en un mineral sulfurado de cobre de baja ley es estable por largos períodos de tiempo, y que el rendimiento de la oxidación de hierro(II) se incrementa al disminuir el pH. Karamanev<sup>3</sup> propone un modelo matemático para la formación de bio-películas trabajando a pH 1,8 pero no menciona el comportamiento de los sistemas a pH más bajos.

Resulta entonces interesante, estudiar la formación de bio-películas en sistemas con soportes inertes (perlas de vidrio) en condiciones en las cuales la precipitación de jarosita no esté tan favorecida como en los cultivos ya estudiados. Un modo de conseguir este propósito es trabajar con cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* en medio 9 K<sup>4</sup> a pH cada vez más bajos para impedir la formación de jarosita.

---

<sup>1</sup>Grishin, S. and Tuovinen, O.H. 1988. "Fast kinetic of Fe<sup>++</sup> oxidation in packed-bed reactor". Applied and Environmental Microbiology 54, 3092-3100.

<sup>2</sup>García, M. J., Palencia, I. and Carranza, F. 1989. "Biological ferrous oxidation in packed-bed columns with low-grade sulphide mineral as support". Process Biochemistry 24, 84-87.

<sup>3</sup>Karamanev, D.G. 1991. "Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*". Journal of Biotechnology 20, 51-64

<sup>4</sup> Silverman, M. P. and Lundgren. 1959. " Studies on the chemoautotrophic iron bacterium. *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields". Journal of Bacteriology 77, 326-331.

*Thiobacillus ferrooxidans* es una bacteria acidófila capaz de crecer en medios de cultivos con pH tan bajos como 1,3, si fueron previamente adaptados. En nuestro laboratorio se han obtenido buenos resultados descendiendo el pH en cada cultivo hasta alcanzar consumos de hierro(II) constantes al pH deseado<sup>5</sup>.

En este capítulo se realizaron estudios de crecimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* a distintos valores de pH en presencia de un soporte sólido inerte. A partir de ellos se obtuvieron soportes sólidos colonizados con el objetivo de formar bio-películas a distintos pH para poder discernir el papel de la jarosita en cada caso.

---

<sup>5</sup>Porro, S Boiardi, J. L. and Tedesco, P. H. 1989. "Bioleaching Improvement at pH 1,4 using selected *Thiobacillus ferrooxidans* strains". Biorecovery 1, 145-154.

## 4.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 4.2.1. Crecimiento del *Thiobacillus ferrooxidans* a distintos pH en presencia de un soporte inerte

#### 4.2.1.1. Descripción experimental

Las experiencias se realizaron empleando perlas de vidrio como soporte inerte. El medio de cultivo utilizado fue 9 K con tres diferentes pH iniciales: 1,39; 1,57 y 1,80. Se utilizaron frascos de 250 ml de capacidad en los cuales se agregaron 90 ml de medio 9 K al pH requerido, 10 g de perlas de vidrio y 10 ml del inóculo constituido por *T. ferrooxidans* DSM 11477 que habían crecido al pH más bajo (1,39). Este inóculo provenía de un cultivo el cual, al alcanzar la fase exponencial de crecimiento, fue filtrado por Millipore (0,22 micrones) y suspendido en 0 K de pH 1,4.

La población inicial en los cultivos fue aproximadamente  $9 \times 10^6$  bact.ml<sup>-1</sup>. Paralelamente se realizaron controles inoculados pero sin agregado de perlas de vidrio y controles estériles con perlas de vidrio para cada pH. Todos los cultivos fueron agitados a 180 rpm y termostatizados a 30 °C.

Cultivos semejantes se utilizaron para evaluar la masa de jarosita formada.

Se determinó la concentración de hierro(II) por titulación con solución valorada de permanganato de potasio en medio ácido. La concentración de hierro total fue determinada por espectrofotometría de absorción atómica usando una lámpara de cátodo hueco. El número de bacterias en la solución fue determinado por conteo bacteriano utilizando un microscopio con dispositivo de contraste de fase mediante una cámara de Petroff-Hauser. El pH fue determinado usando un equipo Altronix.

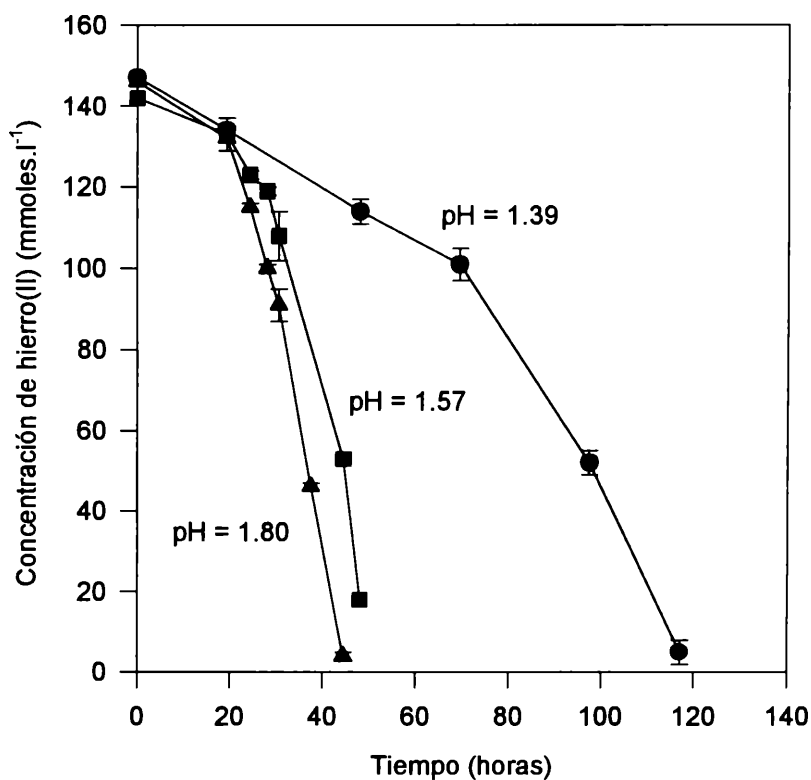
#### 4.2.1.2. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 4.1 se muestra la evolución de hierro(II) en función del tiempo para los cultivos a diferentes pH iniciales (se ha representado el promedio de los duplicados de cada sistema y se ha indicado la desviación correspondiente); la evolución del hierro(II) en los cultivos muestra que la velocidad de oxidación disminuye con el pH, al menos, para el rango utilizado. Los controles inoculados pero sin perlas coincidieron en



velocidad con aquellos que las contenían, confirmando que, independientemente del pH, las velocidades de crecimiento de bacterias adheridas y en solución son semejantes (este hecho fue demostrado en el capítulo 2 para cultivos con un pH inicial igual a 1,8).

FIGURA 4.1. Consumo de hierro(II) del *T. ferrooxidans* a pH: 1,8, 1,57 y 1,39



Teniendo en cuenta la discusión sobre la velocidad de consumo de hierro(II) y el crecimiento bacteriano (desarrollada en el apéndice 1) y realizando una regresión no lineal de la ecuación 3, puede estimarse  $\mu$  (velocidad de crecimiento específico), teniendo en cuenta el número de bacterias iniciales para cada cultivo a su respectivo pH y considerando que el  $Y_{X/Fe(II)}$  (rendimiento en células del sustrato) no varía apreciablemente con el pH<sup>6</sup> Reemplazando en la ecuación  $Y_{X/Fe(II)}$  por 1,45 mg células

<sup>6</sup> Kuenen, J. Pronk, J. Hazeu, W. Meulenberg, R. and Bos, P. 1993. "A Review of bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by Acidophilic Thiobacilli". In Biohidrometalurgical Technologies. Torma, E. Apel, M. and Brierley C. (ed.) TMS. International Biohydrometalurgy Symposium. USA 2, 487-494.

por gramo de  $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , siendo el número de bacterias iniciales para todos los cultivos igual a  $90 \times 10^6 \text{ bact. ml}^{-1}$ , para cada cultivo al respectivo pH se obtuvieron:  $\mu_{\text{pH}=1,34} = 0,0435 \text{ h}^{-1}$ ,  $\mu_{\text{pH}=1,57} = 0,146 \text{ h}^{-1}$  y  $\mu_{\text{pH}=1,80} = 0,152 \text{ h}^{-1}$ , independientemente que los sistemas contengan o no perlas de vidrio, ya que el consumo de hierro(II) de los sistemas con perlas de vidrio es semejante al de los controles respectivos. Los valores obtenidos son concordantes con el comportamiento observado en la figura 4.1. En la tabla 4.1 se observan los cambios de pH, hierro total y número de bacterias finales en los sistemas inoculados conteniendo perlas y en los controles respectivos.

TABLA 4.1. Determinaciones de pH, hierro total y número de bacterias finales en los sistemas inoculados conteniendo perlas de vidrio y en los controles respectivos.

Frascos	perlas control		perlas control		perlas control	
	pH = 1.39		pH = 1.57		pH = 1.8	
pH <sub>final</sub>	151	1.51	1.94	1.94	1.88	2.20
Fe ppdo (g.l <sup>-1</sup> )	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,5	n.d.
Bact. <sup>①</sup>	17(± 0,6)	17	18(±0,1)	19	6,5(± 0,6)	18

n.d.: *diferencias no significativas entre hierro total soluble antes y después del crecimiento*

<sup>①</sup>*Se refiere a bacterias finales (bacterias ml<sup>-1</sup> x 10<sup>7</sup>).*

En los frascos que contienen los cultivos con perlas de vidrio y su respectivo control a pH igual a 1,39, el medio de cultivo se encontraba totalmente límpido al terminar el crecimiento bacteriano. En cambio, el cultivo con perlas a pH 1,57 y los controles a pH 1,57 y pH 1,80, se encontraban apenas opalescentes al completarse el crecimiento, indicando que hubo una mínima (incipiente) formación de jarosita. Solamente se observó franca formación de jarosita en el cultivo que posee perlas de vidrio al pH mayor, obteniéndose un peso final de jarosita precipitada igual a 0,52 g.

En los cultivos con pH iniciales iguales a 1,39 y 1,57, se observó una evolución de pH similar a la de los respectivos controles, obteniéndose pH finales iguales a 1,51 y 1,94. En cambio, en el cultivo con pH inicial igual a 1,80 se alcanzó un pH final igual a 1,88 cuando las perlas estuvieron presentes y un pH 2,20 en el control respectivo (sin perlas). La diferencia observada en los cultivos con pH inicial 1,80, está relacionado con

la precipitación de hierro como jarosita e hidroxocompuestos (formados por hidrólisis, ecuaciones 2.13 – 2.16), que provoca la disminución del pH. Esta precipitación fue ratificada por la desaparición de  $2,5 \text{ g.l}^{-1}$  de hierro total en este cultivo contra desapariciones no significativas para los demás sistemas.

El mayor valor de pH inicial favorece la precipitación de hierro(III) (menores valores de pH reprimen la hidrólisis) estimulada además por la presencia de las perlas, y la consecuente adherencia de bacterias sobre ella, que ofrece una interfase con alta concentración de hierro(III) y alto pH. Es de destacar que el soporte inerte por sí solo no produce precipitación de jarosita tal cual se comprobó en los controles estériles que contenían perlas de vidrio (datos no mostrados).

Más interesante aún es el número de bacterias presentes en la solución al final del crecimiento. En los cultivos (con y sin perlas) al menor pH inicial se encontraron  $17 \times 10^7$   $\text{bact.ml}^{-1}$ , al pH intermedio (con y sin perlas)  $18 \times 10^7$   $\text{bact.ml}^{-1}$  (la diferencia entre el control y el sistema con perlas se encuentra dentro del error estimado en el recuento bacteriano) mientras que en el cultivo al mayor pH, la presencia de perlas hizo descender la población bacteriana desde  $18 \times 10^7$   $\text{bact.ml}^{-1}$  hasta  $6,5 \times 10^7$   $\text{bact.ml}^{-1}$ . Esto sugiere que la desaparición de bacterias en la solución está relacionada probablemente con la presencia de la jarosita más que con la presencia del soporte.

También podría explicarse el comportamiento anterior admitiendo que a menor pH cambian las características superficiales de las bacterias impidiéndoles adherirse sobre el soporte y ser iniciadoras de la precipitación de jarosita y posterior oclusión bacteriana. Sin embargo, la primera explicación es más consistente con los resultados descritos en el capítulo 3.

La formación de jarosita y la oclusión bacteriana también depende del tiempo en el que el soporte estuvo en equilibrio con la solución férrica. Este hecho se verificó dejando al cultivo con perlas (de pH inicial igual a 1,57) en agitación y en contacto con el medio cuando ya se había agotado el hierro(II). Luego de 10 hs, se comprobó una importante producción de jarosita, una disminución de la población bacteriana en solución desde  $18 \times 10^7$   $\text{bact.ml}^{-1}$  hasta  $8 \times 10^7$   $\text{bact.ml}^{-1}$  y un posterior descenso de pH (hasta un valor final de 1,88); adicionalmente, esto volvió a confirmar la importancia de la formación de jarosita en la desaparición de las bacterias de la solución.

Por otro lado, se siguió la formación de bio-películas sobre perlas de vidrio expuestas a cultivos a diferentes valores de pH.

Es importante aclarar en este punto que en esta experiencia (a diferencia de las experiencias de los capítulos anteriores) se trabajó a un inóculo de un 10 % y con una densidad de pulpa en perlas de vidrio igual al 10 % p/v. Esto permitirá una adecuada comparación entre los sistemas a diferentes pH iniciales ya que ambas modificaciones (aumento del inóculo que disminuirá el tiempo de contacto perlas-solución y descenso de la densidad de pulpa que disminuirá la interfase) provocarán una menor precipitación de jarosita.

## **4.2.2. Experiencias de formación de bio-película sobre perlas de vidrio a distintos pH**

### *4.2.2.1. Descripción experimental*

Las bacterias adheridas a los soportes sólidos en cada uno de los cultivos anteriores fueron utilizados para experiencias posteriores con el fin de obtener bio-películas. Para ello, el cultivo, una vez agotado el hierro(II) presente, fue filtrado (a través de filtro banda azul S & S Runderfilter) para obtener los soportes sólidos con las bacterias adheridas. Estos soportes fueron lavados cuatro veces con 5,0 ml de solución de ácido sulfúrico y luego agregados a un nuevo frasco con medio fresco; tanto la solución de ácido sulfúrico utilizado como el medio fresco poseían un pH igual al inicial de cada sistema. Esta operación se repitió sucesivamente (cada cultivo luego del filtrado será denominado en adelante un nuevo paso) para obtener una bio-película sobre cada soporte, situación que se supone alcanzada cuando se alcanza la máxima velocidad de oxidación de hierro(II).

De ese modo se trabajó con cultivos a tres pH distintos: 1,39,1,57 y 1,80, utilizando para ello 100 ml de medio de cultivo 9 K con los soportes sólidos (perlas de vidrio y eventual jarosita formada en el paso previo) colonizados como único inóculo. Se trabajó en frascos de 250 ml, agitados a 180 r.p.m y termostatizados a 30 °C.

Durante la experiencia se determinó consumo de hierro(II), número de bacterias en solución, pH y hierro total.

En las sucesivas generaciones (denominadas paso 1,2, etc.) se procedió de la misma forma que la citada arriba, es decir reteniendo perlas por filtración cuando los sistemas terminan de crecer, y realizando el mismo procedimiento de lavado descrito más arriba.

#### 4.2.2.2. Discusión de los resultados experimentales

En las tablas 4.2, 4.3 y 4.4, se indican los valores experimentales de velocidad de consumo de hierro(II), diferencia entre hierro soluble inicial y final, número de bacterias finales, fase lag y productividad de hierro(III). La fase lag se determinó a partir de la curva obtenida para consumo de hierro(II) en función del tiempo (figuras 4.6, 4.7 y 4.8) según lo descrito previamente<sup>7</sup>.

TABLA 4.2. Velocidad de consumo de hierro(II), número de bacterias finales, productividad de hierro(III) y fase lag para la formación de bio-películas de *Thiobacillus ferrooxidans* (pH 1,39) sobre perlas de vidrio.

	Paso 1	Paso 2	Paso 4	Paso 5
Fase lag (h)	50	72	80	70
$r^{\textcircled{1}}$ (mM.h <sup>-1</sup> )	2,0	2,6	2,0	4,0
Bact.ml <sup>-1</sup> <sup>Ⓜ</sup>	170x10 <sup>6</sup>	190x10 <sup>6</sup>	176x10 <sup>6</sup>	190x10 <sup>6</sup>
P (mM.h <sup>-1</sup> ) <sup>Ⓝ</sup>	1,16	1,08	0,90	1,13

<sup>Ⓛ</sup>:  $r$  = velocidad de oxidación de hierro(II) en la fase exponencial (los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,95).

<sup>Ⓜ</sup>: se refiere a células finales en suspensión.

<sup>Ⓝ</sup>: productividad de hierro(III).

No se observó desaparición significativa de hierro(III) ni precipitación de jarosita en ninguno de los pasos.

---

<sup>7</sup> Monod, J.1949 "The growth of bacterial cultures"Ann. Rev. Microbiol.3, 371-379

TABLA 4.3. Velocidad de consumo de hierro(II), hierro precipitado, número de bacterias finales productividad de hierro(III) y fase lag para la formación de bio-películas de *Thiobacillus ferrooxidans* (pH 1,57) sobre perlas de vidrio.

	Paso 1.	Paso 2.	Paso 4.	Paso 5.
Fase lag (h)	24	9	0	0
$r^{\textcircled{1}}$ (mM. h <sup>-1</sup> )	4,5	6,1	7,5	10,4
Bact.ml <sup>-1</sup> <sup>Ⓜ</sup>	179 x10 <sup>6</sup>	170 x10 <sup>6</sup>	161x10 <sup>6</sup>	98x10 <sup>6</sup>
P (mM.h <sup>-1</sup> ) <sup>Ⓜ</sup>	2,58	4,47	7,50	10,46
Fe (g.l <sup>-1</sup> )	0,23	0,25	0,43	0,53

<sup>Ⓜ</sup>:  $r$  = velocidad de oxidación de hierro(II) en la fase exponencial (los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,97).

<sup>Ⓜ</sup>: se refiere a células finales en suspensión. <sup>Ⓜ</sup>: productividad de hierro(III).

La cantidad de jarosita formada desde la primera generación a la quinta fue de 0,45 g.

TABLA 4.4. Velocidad de consumo de hierro(II), hierro precipitado, número de bacterias finales productividad de hierro(III) y fase lag para la formación de bio-películas de *Thiobacillus ferrooxidans* (pH 1,80) sobre perlas de vidrio.

	Paso 1.	Paso 2.	Paso 4.	Paso 5.
Fase lag (h)	19	0	0	0
$r^{\textcircled{1}}$ (mM. h <sup>-1</sup> )	5,66	6,32	13,75	14,80
Bact.ml <sup>-1</sup> <sup>Ⓜ</sup>	65x10 <sup>6</sup>	70 x10 <sup>6</sup>	76 x10 <sup>6</sup>	28 x10 <sup>6</sup>
P (mM.h <sup>-1</sup> ) <sup>Ⓜ</sup>	3,19	6,22	13,71	15,20
Fe (g.l <sup>-1</sup> )	2,5	2,5	2,6	4,5

<sup>Ⓜ</sup>:  $r$  = velocidad de oxidación de hierro(II) en la fase exponencial (los coeficientes de correlación fueron superiores a 0,99).

<sup>Ⓜ</sup>: se refiere a células finales en suspensión. <sup>Ⓜ</sup>: productividad de hierro(III)

La cantidad de jarosita formada desde la primera etapa a la quinta fue de 1,885 g.

Al menor pH inicial (1,39) se produce un incremento sistemático de la fase lag (estimado como el tiempo durante el cual prácticamente no hay disminución de la concentración de hierro(II)) desde 50 hs para el primer paso hasta 80 hs para el cuarto. En los sucesivos pasos no se produjeron cambios apreciables. La población bacteriana final alcanza valores entre  $1,8-2,0 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>; en ningún caso se observa una precipitación de jarosita ni la desaparición de una cantidad significativa de hierro en solución.

En el caso del pH inicial igual a 1,57, la fase lag disminuye desde 24 hs. (primer paso) a 0 a partir del tercer paso. La velocidad de oxidación de hierro(II) se incrementó hasta el quinto paso donde alcanzó un valor de 10,4 mM de hierro(II).h<sup>-1</sup> y una disminución permanente del número de bacterias en solución (el cual descendió desde  $17,9 \times 10^7$  hasta  $9,8 \times 10^7$  bact.ml<sup>-1</sup>) en forma paralela a la disminución de hierro en solución (desde 0,23 hasta 0,53 g.l<sup>-1</sup>).

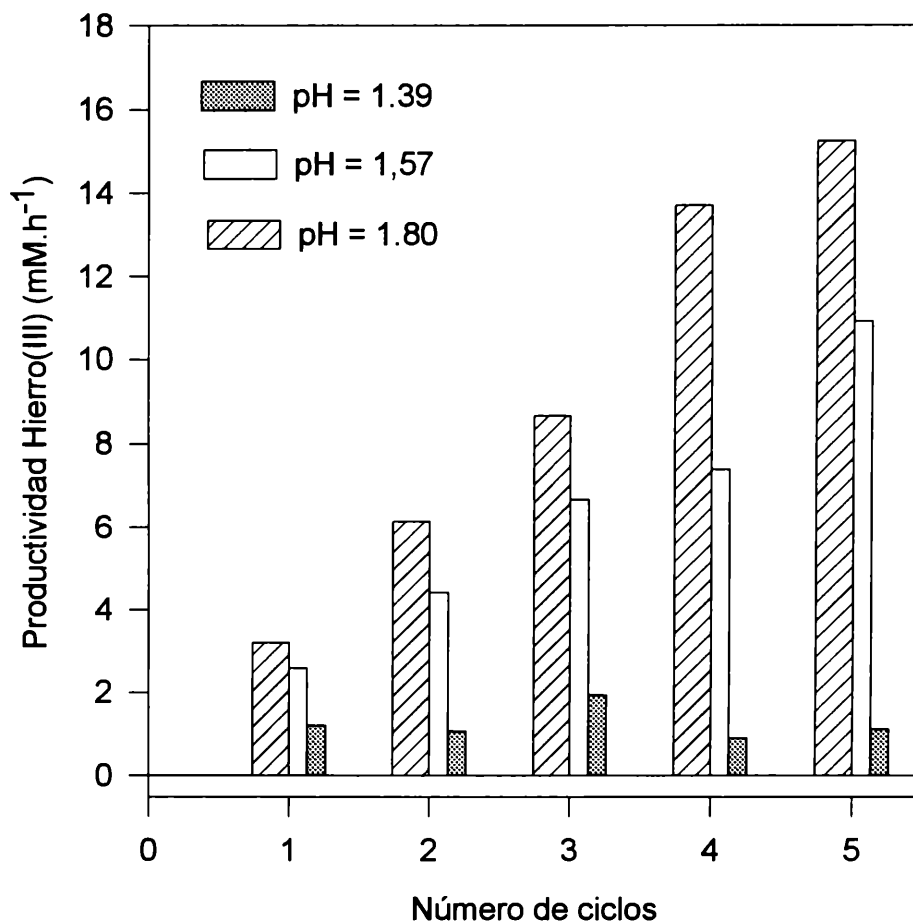
A pH 1,80 la etapa lag disminuye desde 19 hs en el primer cultivo hasta 0 hs a partir del segundo paso mientras que la velocidad de oxidación de hierro(II) se incrementó hasta un valor de 15,0 mM hierro(II).h<sup>-1</sup> en el quinto paso que se mantuvo posteriormente. La desaparición de hierro total fue creciendo desde 2,5 g.l<sup>-1</sup> en el primer paso hasta 4,5 g.l<sup>-1</sup> en el 5to. paso; paralelamente fue descendiendo la población bacteriana en solución hasta  $2,8 \times 10^7$ .

Para una más rápida verificación del comportamiento de los sistemas, en la figura 4.2 se ha representado el cambio en la productividad media de ion hierro(III) para cada uno de los pH en función del número de pasos.

Como puede observarse, en el cultivo a menor pH no se produce prácticamente cambio de productividad en los sucesivos pasos. Esto difiere claramente de lo obtenido para los cultivos a pH iniciales mayores. Por otro lado, la productividad aumenta conforme desciende el número de bacterias en solución en el paso previo.



FIGURA 4.2. Productividad de hierro(III) para los cultivos de *Thiobacillus ferrooxidans* a distintos pH durante los distintos pasos.



En función de justificar las variaciones en productividad observadas, se realizó una comparación entre las evoluciones de diversos parámetros del crecimiento para un paso específico hacia la formación de la bio-película. Esto fue representado en las figuras 4.3, 4.4, y 4.5 para el quinto paso en la formación de la bio-película a pH 1,39, el octavo paso a pH 1,57 y el décimo paso a pH 1,80, respectivamente. El tiempo requerido para alcanzar el paso representado a cada pH fue aproximadamente el mismo.

Lo destacable es que a pH 1,39, donde no precipita hierro(III) (el hierro total permanece constante y por eso no se ha representado), el número de bacterias en solución aumenta continuamente hasta que se agota el hierro(II), mientras que a pH 1,57 y a pH 1,8 el número de bacterias desciende conforme desciende el hierro total.

FIGURA 4.3. Cambios del número de bacterias en solución, hierro(II) y pH durante el crecimiento de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* a pH = 1,39.

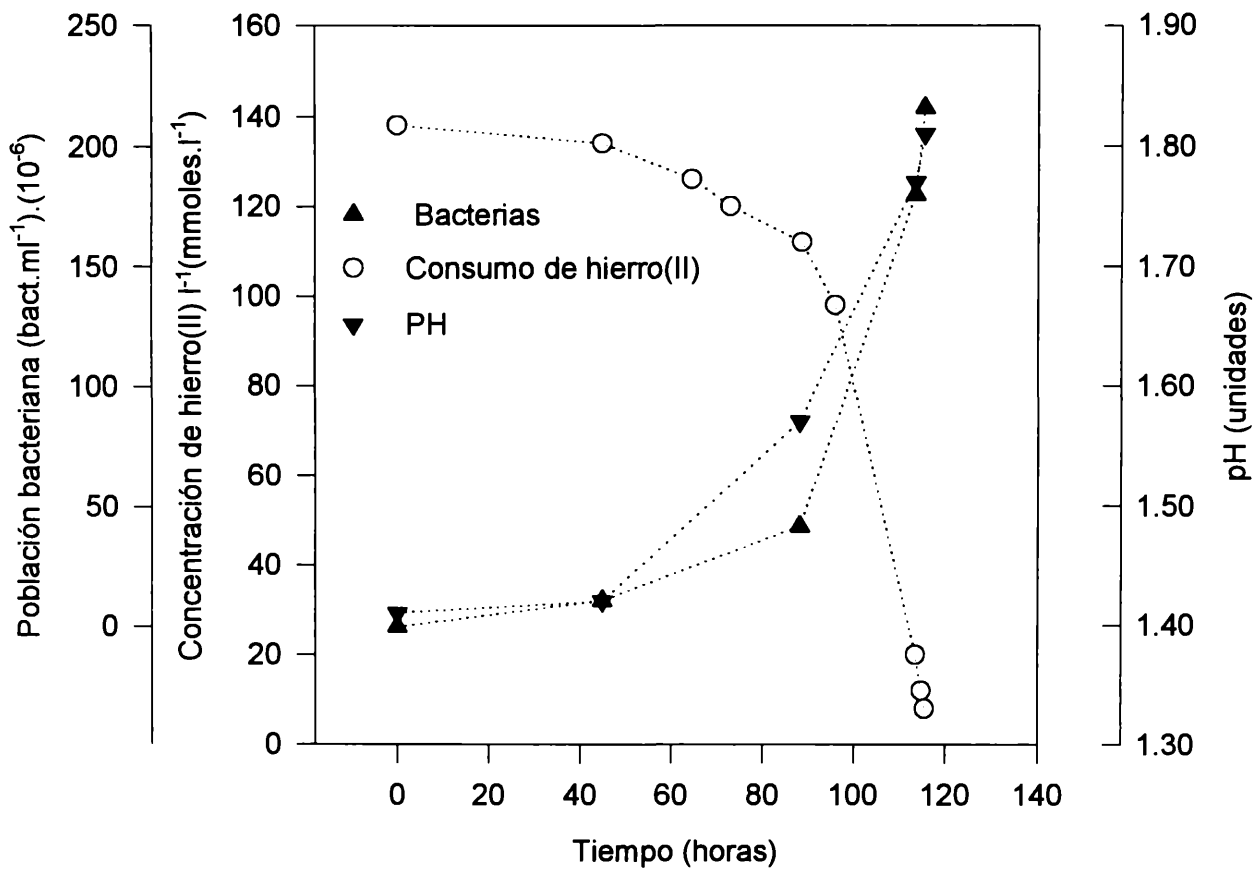


FIGURA 4.4. Cambios del número de bacterias en solución, hierro soluble, hierro(II) y pH durante el crecimiento de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* a pH = 1,57.

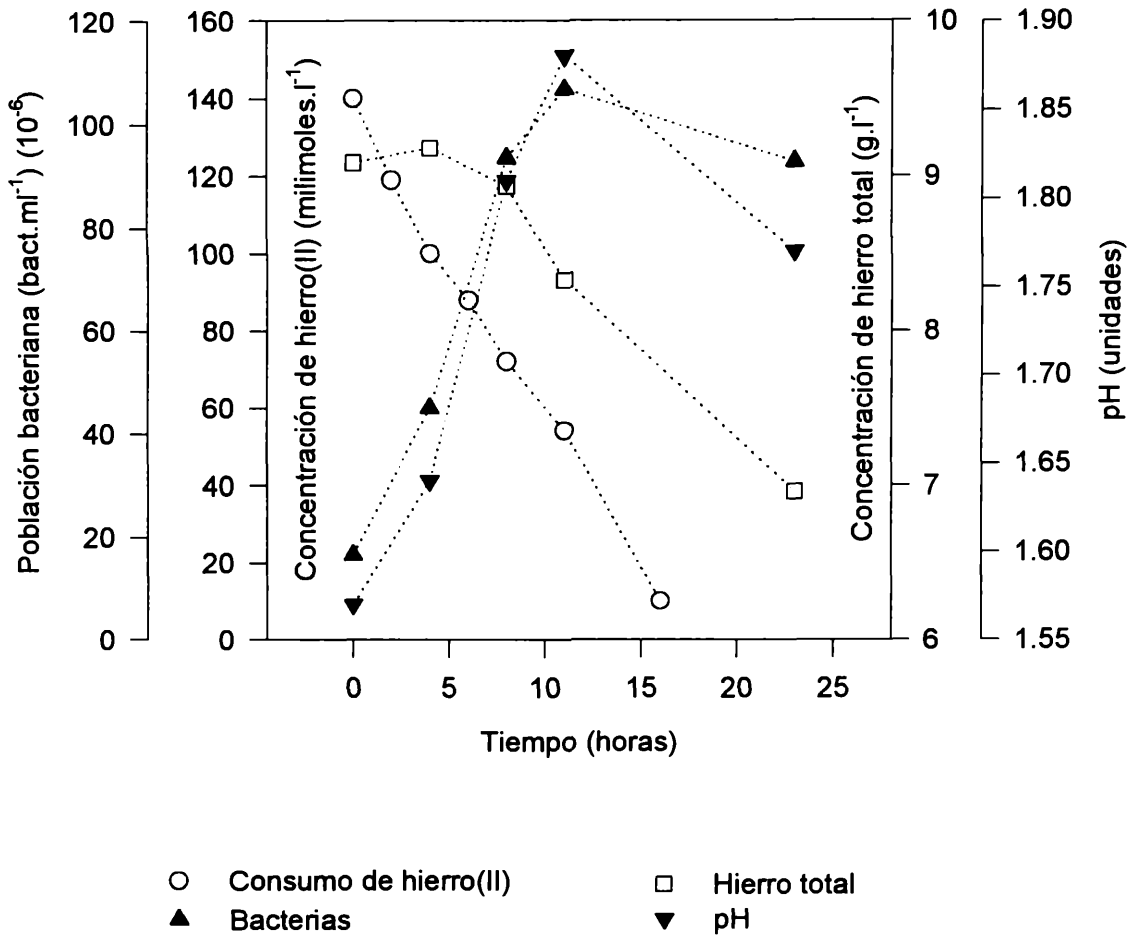
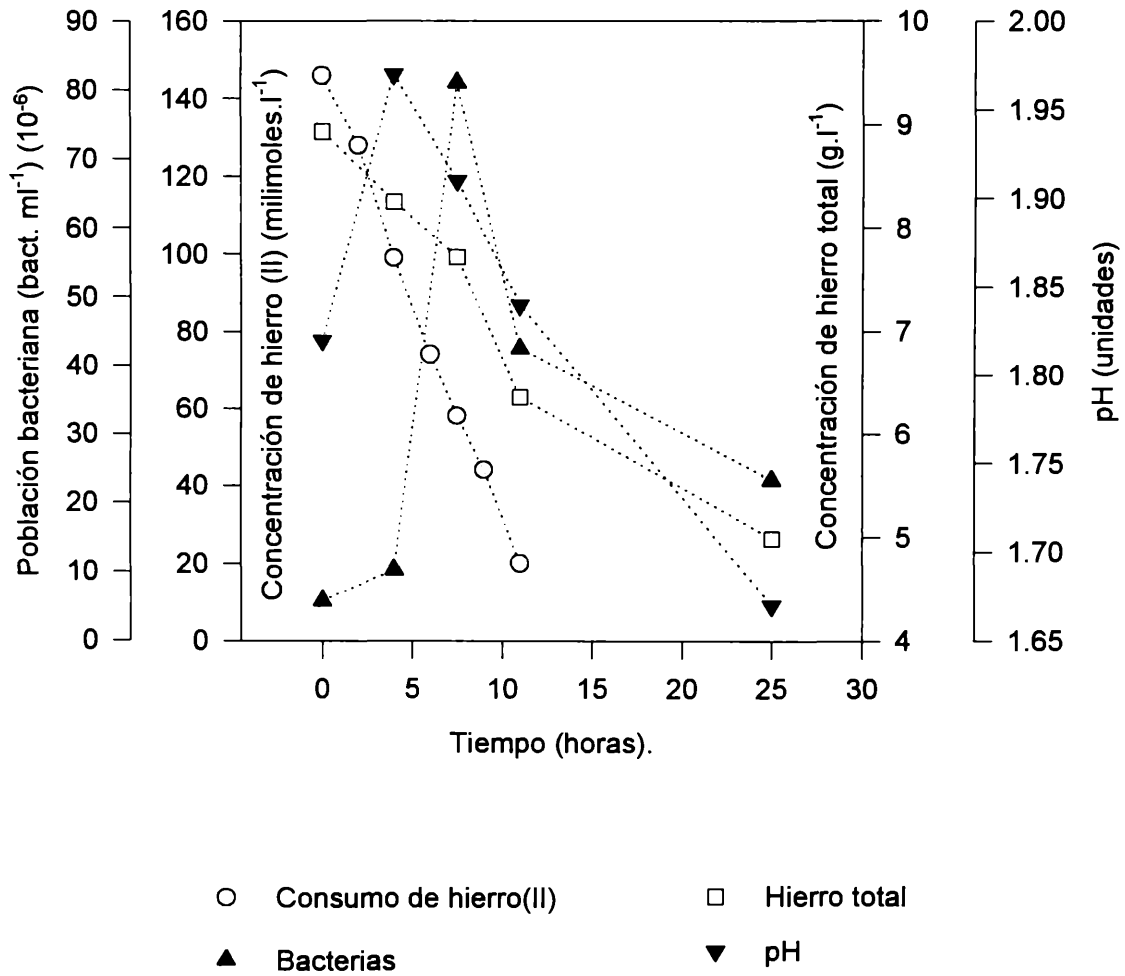


FIGURA 4.5. Cambios del número de bacterias en solución, hierro soluble, hierro(II) y pH durante el crecimiento de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* a pH = 1,80.



Las figuras anteriores muestran una interesante correlación entre las evoluciones del pH de los cultivos y la población bacteriana en suspensión. En todos los sistemas se observa un crecimiento de ambos parámetros debido al consumo de hierro(II) (ver capítulo 2); posteriormente, en los cultivos con mayor pH inicial, comienza a producirse un descenso de ambos parámetros coincidente con la precipitación del hierro(III).

En las figuras 4.6, 4.7, 4.8 se han representado los consumos de hierro(II) en función del tiempo incluyendo los pasos más representativos y para cada uno de los pH iniciales, respectivamente.

FIGURA 4.6. Consumo de hierro(II) para los distintos pasos a pH = 1,39

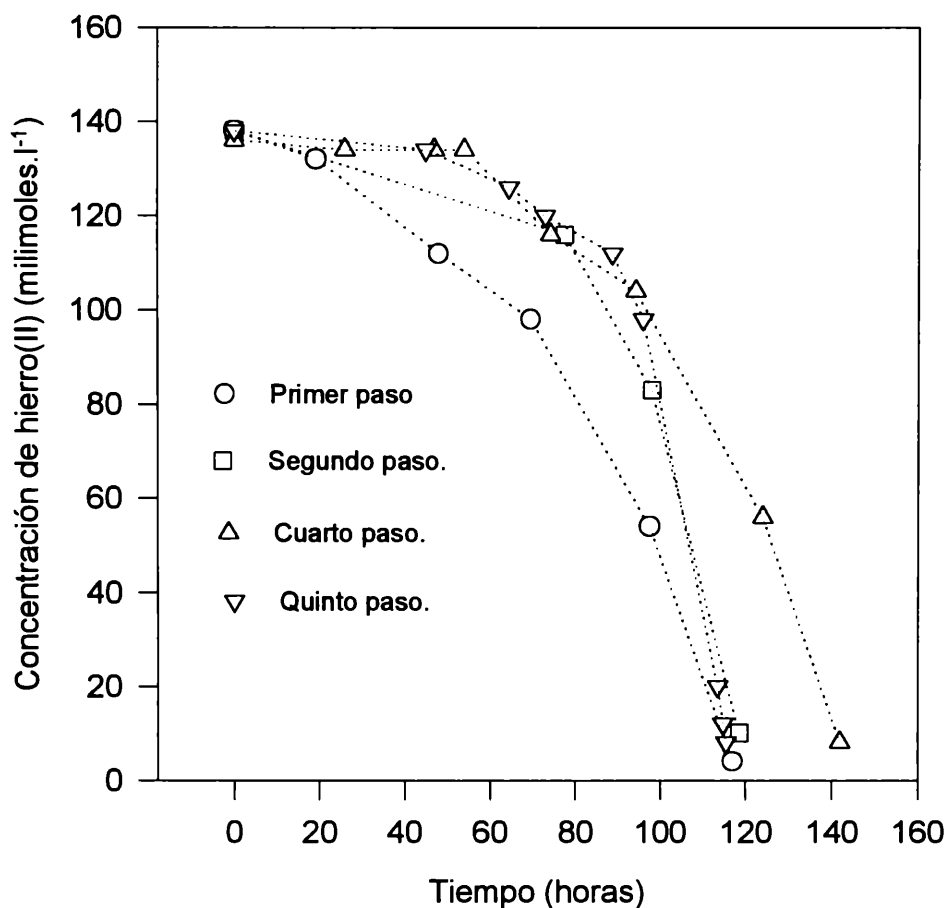
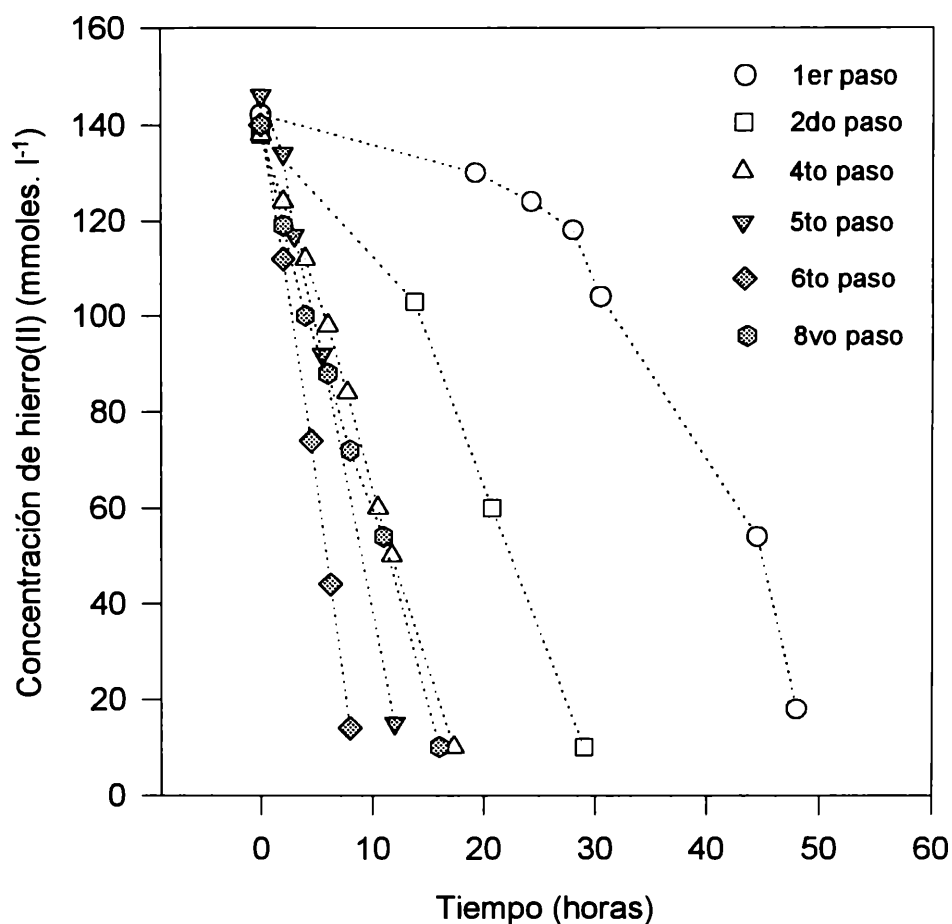
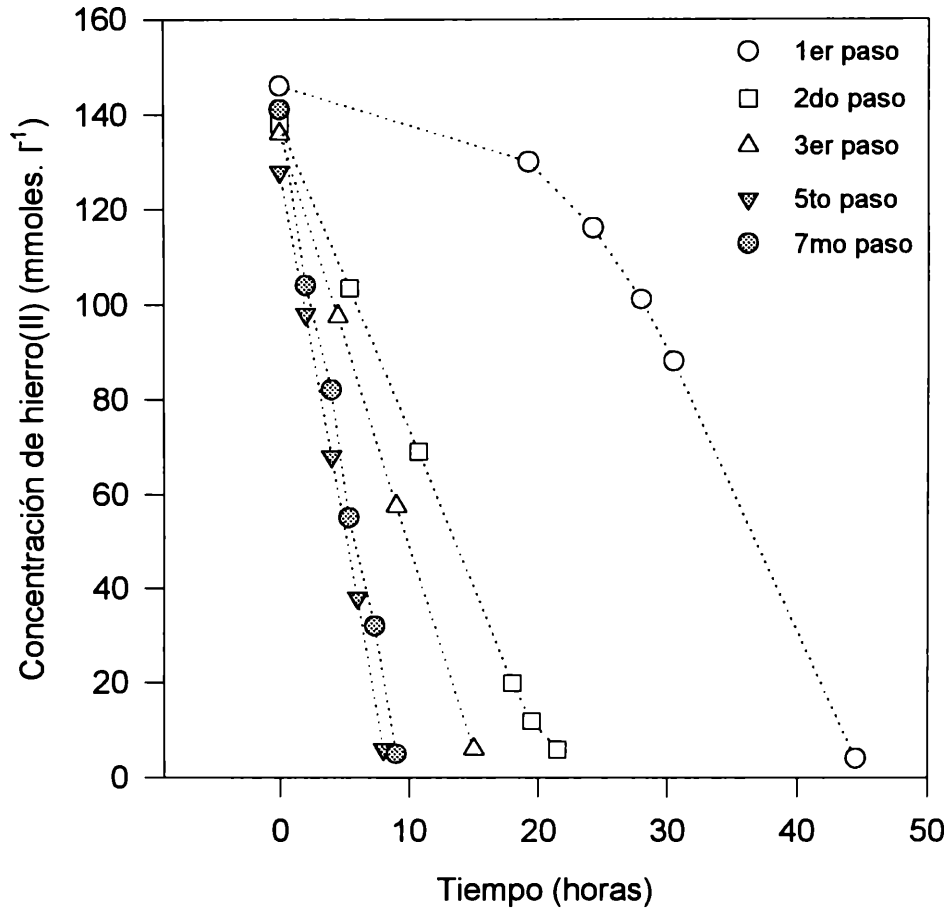


FIGURA 4.7. Consumo de hierro(II) para los distintos pasos a pH = 1,57.



Para la experiencia con pH inicial igual a 1,39 se observan consumos de hierro(II) erráticos y sin ninguna tendencia, creciente o decreciente, que acompañe los pasos sucesivos. Esto probablemente indique una muy pequeña población bacteriana inmovilizada que además es removida parcialmente por los lavados que se realizaron en cada paso.

FIGURA 4.8. Consumo de hierro(II) para los distintos pasos a pH = 1,80.



En cambio para los otros dos pH iniciales, se comprueba un incremento constante de la velocidad de oxidación de hierro(II) hasta alcanzar prácticamente velocidades constantes (dentro del error experimental) en los últimos pasos. Esto significa que la población bacteriana inmovilizada no es fácilmente desorbida por los lavados y que, además, se va incrementando paulatinamente paso a paso. Debido a que, como se ha demostrado previamente, la mayor cantidad de bacterias está inmovilizada sobre los depósitos de hierro(III) y estos van incrementándose paso a paso, podría esperarse que el número de bacterias inmovilizadas y, consecuentemente, la velocidad de oxidación de hierro(II), se incrementase en forma continua. Sin embargo, según se ha indicado, dicha velocidad alcanza un valor constante y esto puede ser debido, entre otras causas a:

- Los nuevos depósitos de hierro(III) van cubriendo bacterias inmovilizadas previamente, impidiéndoles el acceso de nutrientes.
- El acceso de oxígeno y/o dióxido de carbono se hacen críticos y limitan el crecimiento.

Los máximos valores de productividad de hierro(III) alcanzados fueron: 15,7 mM.h<sup>-1</sup> (desde el séptimo paso) y 15,2 mM.h<sup>-1</sup> (desde el quinto paso) para pH 1,57 y 1,80, respectivamente.

Mediante la ecuación 3 del apéndice 1, es posible calcular las poblaciones iniciales de un cultivo realizando una regresión no lineal con los datos de concentración de hierro(III) en función del tiempo. De ese modo, pudieron calcularse las poblaciones bacterianas iniciales (inmovilizadas sobre los soportes que provenían del cultivo previo) en cada uno de los pasos hacia la formación de la bio-película. Para ello se tomaron como válidos los valores de  $\mu$  para cada pH calculados en 4.2.1.2 y el valor de  $Y_{X/Fe}$  utilizado en todos los cálculos. Estos valores, para cada pH inicial, y para los primeros cinco pasos (dado que no se cuentan con pasos posteriores para el pH 1,39) se muestran en la tabla 4.5. En esta tabla también se ha incorporado el porcentaje de bacterias retenidas por los sólidos. El indicado como “Final (1° paso)” se refiere al porcentaje de bacterias retenidas entre el primer y el segundo paso; esto fue calculado teniendo en cuenta la población total producida en el primer cultivo (estimada como similar a la del control respectivo sin perlas de vidrio) y la calculada (según se ha descrito anteriormente) como inicial en el segundo paso. Por otro lado, el indicado simplemente como “Final”, se refiere al porcentaje de bacterias del total producido durante los cuatro pasos, retenido por los sólidos; para ello se ha supuesto que las poblaciones bacterianas generadas en cada paso son iguales entre sí e iguales al control, lo cual está justificado porque los medios contuvieron en todos los casos la misma cantidad de sustrato (hierro(II)).



TABLA 4.5. Número de bacterias inmovilizadas sobre los soportes sólidos (perlas de vidrio y jarosita) al comienzo de cada paso.

pH	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5	Porcentaje de bacterias retenidas	
	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	Final (1 <sup>o</sup> paso)	Final (5 <sup>to</sup> paso)
1,39	9,3x10 <sup>8</sup>	15x10 <sup>8</sup>	10x10 <sup>8</sup>	8,7x10 <sup>8</sup>	5,5	1,3
1,57	12x10 <sup>8</sup>	15x10 <sup>8</sup>	21x10 <sup>8</sup>	44x10 <sup>8</sup>	6,7	6
1,80	17x10 <sup>8</sup>	25x10 <sup>8</sup>	39x10 <sup>8</sup>	85x10 <sup>8</sup>	9,4	11,8

El número de bacterias iniciales calculadas tal cual se ha realizado aquí, es menor a la supuestamente adherida a los sólidos en el paso anterior (calculada como diferencia entre la población bacteriana total producida y la presente en suspensión inmediatamente antes del filtrado). Esto puede deberse a una pérdida real de bacterias adheridas durante los lavados pero también a que parte de las bacterias adheridas y trasladadas al nuevo cultivo han perdido parcial o totalmente su capacidad de oxidar hierro(II). Por esta razón, en adelante se referirá a las bacterias adheridas calculadas a través de la productividad como bacterias “viables”.

Los porcentajes indicados en la última columna, indican que la población bacteriana “viable” adherida sobre los sólidos es muy baja respecto del total que ha estado en contacto con los sólidos durante los cuatro pasos. Sin embargo, debe considerarse que la población presente en los sólidos (para los casos en los cuales la formación de la bio-película ha sido particularmente adecuada: pH 1,57 y 1,80) es aproximadamente 25 y 50 % del total producido durante un crecimiento, es decir, entre 2,5 y 5 veces mayor que el tamaño de un inóculo del 10 % v/v. Esto significa que se ha incrementado la capacidad de generar hierro(III) entre 2,5 y 5 veces mayor respecto de un cultivo con inóculo en medio líquido.

La retención de bacterias observada a pH 1,39, a pesar de la insignificante desaparición de hierro(III) en solución, está indicando que existe adherencia sobre las perlas de vidrio (incrementada, tal vez, por una insignificante precipitación de jarosita sobre el vidrio). Sin embargo, estas bacterias no deben estar firmemente adheridas o la superficie tiene una limitada capacidad de retención, pues nuevos ciclos no aumentan la población inmovilizada (ver razones mencionadas más arriba). En los otros sistemas, con

mayor pH inicial, la precipitación del hierro(III) no solo provoca un mayor arrastre de bacterias sino que esta inmovilización es aparentemente menos lábil que a pH 1,39 (es decir, las bacterias resisten lavados y nuevas inoculaciones).

### 4.3. CONCLUSIONES

- El pH inicial del medio influye en la producción de jarosita y consecuentemente en la magnitud de la adherencia bacteriana.
- Solo a pH superiores a 1,39 es posible lograr un incremento sucesivo de la productividad de hierro(III) con sucesivos ciclos de crecimiento utilizando como inóculo exclusivamente a las bacterias inmovilizadas sobre el soporte (perlas de vidrio-depósitos de hierro(III)). Los valores máximos de productividad a pH 1,57 y 1,80 superan el valor de 15 mM.h<sup>-1</sup>.
- La preparación de reactores con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre soportes inertes como las perlas de vidrio, debería realizarse a pH relativamente altos de modo de alcanzar altas productividades (correlacionadas con elevadas poblaciones bacterianas adheridas).
- Uno de los aparentes problemas de trabajar a altos pH es la elevada precipitación de hierro(III) que precipita que reduce la cantidad de agente oxidante soluble disponible que es, obviamente, el objetivo principal del reactor. Sin embargo, como se ha probado en experiencias que no corresponden a este trabajo de tesis, cuando se trabaja con un reactor de estas características, en columnas y con un flujo continuo de medio fresco, la precipitación de hierro(III) es sustancialmente menor sin un descenso significativo de la productividad.
- Finalmente, un pH intermedio como 1,57 permite un compromiso entre cantidad de hierro precipitado (para la retención de bacterias) y el hierro(III) soluble que lo habilita como un bio-reactor de medio oxidante. Adicionalmente, una precipitación menor de hierro(III) evita problemas operativos como transferencia de nutrientes, en especial los gaseosos, y obturaciones en las entradas y salidas de medio y de aire.

## APÉNDICE 1

La velocidades de aparición de hierro(III) en función de la velocidad de crecimiento bacteriano puede representarse por medio de la siguiente ecuación:

$$d[\text{Fe(III)}]/dt = 1/Y_{X/S} dX/dt \quad (1)$$

En la fase exponencial de crecimiento, es posible reemplazar la velocidad de crecimiento bacteriano por  $\mu \cdot X$  y luego  $X$  por  $X_i \exp(\mu \cdot t)$  ( $X_i$  representa el número de bacterias iniciales, al comenzar la fase exponencial). De ese modo, se obtiene:

$$d[\text{Fe(III)}]/dt = \exp(\mu \cdot t) \cdot X_i \mu / Y_{X/S} \quad (2)$$

Integrando, la productividad será:

$$[\text{Fe(III)}]/t = \{ \exp(\mu \cdot t) - 1 \} X_i / Y_{X/S} \quad (3)$$

Conocida la concentración de hierro(III) a diferentes tiempos, es posible mediante una regresión no lineal, calcular el número de bacterias iniciales llevado en cada cultivo.

# **CAPÍTULO 5**

Exopolímeros de *Thiobacillus ferrooxidans*

Efecto en la adherencia de las células

## 5.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 3 se hizo referencia de modo genérico, a las etapas involucradas en la adherencia bacteriana. Luego de la etapa denominada adhesión inicial, una vez que la bacteria se ha depositado en la superficie del sólido, la secreción de sustancias poliméricas extracelulares juegan un papel muy importante, ya que pueden formar fuertes uniones entre la célula y la superficie del sólido, participando en la formación de bio-películas.

Los estudios realizados sobre adherencia para *Thiobacillus ferrooxidans* en los capítulos anteriores fueron desarrollados en medios de cultivo conteniendo hierro(II) como fuente de energía; en esos medios, y según hemos demostrado, es esencialmente la producción de jarosita la responsable de secuestrar del medio un gran número de bacterias. Sin embargo, *Thiobacillus ferrooxidans* es capaz de crecer en medios carentes de hierro(II) siempre que se encuentre presente un sustrato alternativo como pueden ser los sulfuros metálicos y/o el azufre (ver capítulo 1).

Evidencias físicas de adsorción de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre la superficie del mineral han sido descritas en varias publicaciones<sup>1,2,3,4</sup>.

Se ha encontrado que las propiedades de la superficie de la bacteria influyen en la adherencia de la misma sobre los minerales<sup>5</sup>. En este sentido, se ha probado que la parcial remoción de lipopolisacáridos de la superficie de los microorganismos afecta la adhesión del *Thiobacillus ferrooxidans*<sup>6</sup>.

---

<sup>1</sup>Pogliani, C., Curutchet, G., Donati, E. and Tedesco, P. 1990. "A need for direct contact with particle surfaces in the bacterial oxidation of covellite in the absence of a chemical lixiviant". *Biotechnology Letters* 12, 515-518.

<sup>2</sup>Rodriguez-Leiva, M. and Tributsch, H. 1988. "Morphology of bacterial leaching patterns by *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite". *Arch. Microbiol.* 149, 401-405.

<sup>3</sup>Solari, J.A., Huerta, G., Escobar, B., Vargas, T., Badilla-Ohlbaum, R. and Rubio, J. 1993. "Interfacial phenomena affecting the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to sulphide mineral surfaces". *Colloids Surfaces* 69, 159-166.

<sup>4</sup>Blake, R., Lyles, M.N. and Simmons, R. 1995. "Morphological and physical aspects of attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite and sulfur". In: *Biohydrometallurgical processing*. Vargas, T., Jerez, C.A., Wiertz, J.V. and Toledo, H. (ed) *International Biohydrometallurgy Symposium*. Chile. 1, 13-22.

<sup>5</sup>Devasia, P., Natarajan, K.A., Sathyanarayana, D.N. and Ramananda Rao, G. 1993. "Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces". *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4051-4055.

<sup>6</sup>Arredondo, R., García, A. and Jerez, C.A. 1994. "Partial removal of lipopolysaccharides from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its adhesion to solids". *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2846-2851.

Recientemente Gehrke y colaboradores<sup>7</sup> han demostrado que la presencia en las células de *Thiobacillus ferrooxidans* de una capa extracelular de polisacáridos y lípidos (exopolymeric substances: EPS), es necesaria para el pegado y luego la lixiviación de la pirita (FeS<sub>2</sub>). Esta capa puede ser removida por centrifugación a altas velocidades. Este proceso les impide adherirse a la pirita aunque dicha habilidad es restablecida si se agrega hierro(III) a las células deficientes en EPS. También se determinó que la presencia de un sustrato sólido aumenta la excreción de EPS en prácticamente un orden de magnitud.

La composición química de la fracción lipídica de extractos de EPS consiste, independientemente de la fuente de energía utilizada por el microorganismo (hierro(II), azufre o FeS<sub>2</sub>), fundamentalmente en una larga cadena de ácidos grasos. La composición de la fracción polisacárida, si las células fueron crecidas sobre hierro(II), está conformada por azúcares neutros, ácido glucurónico y hierro(III) (exclusivamente en esta forma) en la proporción de 2 moles de ácido glucurónico a un mol de hierro(III).

Dado que las conclusiones alcanzadas por los autores del trabajo mencionado adjudican un relevante papel para el hierro aun cuando se trate del mecanismo directo de biolixiviación, en este capítulo se estudiará la importancia de los exopolímeros de *Thiobacillus ferrooxidans* en la adherencia de esta bacteria a la covelita (CuS), teniendo en cuenta que este sustrato es sustancialmente más sencillo que la pirita(FeS<sub>2</sub>). En el capítulo ocho se estudiará la influencia sobre la biolixiviación de covelita. Además se analizará el efecto de los EPS extraídos de *T. ferrooxidans*, sobre la adherencia de células de *T. thiooxidans* a covelita. Mas adelante en el capítulo 8 se correlacionará la adherencia observada con la biolixiviación de covelita por células de *T. thiooxidans* (en presencia de EPS de *T. ferrooxidans*).

Por otro lado, como se ha comentado en el capítulo 1, *T. ferrooxidans* es capaz de crecer empleando al azufre elemental como sustrato. Por lo tanto resulta importante analizar la adherencia de *T. ferrooxidans* (con y sin EPS) sobre S elemental, cuando las de células provienen de medios de cultivo conteniendo hierro(II) o azufre elemental como fuente de energía.

---

<sup>7</sup>Gehrke T, R Hallmann and W Sand. 1995. Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching. In: Biohydrometallurgical processing. Vargas, T., Jerez, C. A., Wiertz, J. V. and Toledo H. (eds), International Biohydrometallurgy Symposium. Chile. 1, pp 1-11.

## 5.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 5.2.1. Adherencia de *Thiobacillus ferrooxidans* y de *Thiobacillus thiooxidans* a un sustrato insoluble (CuS). Efecto de la presencia de EPS

#### 5.2.1.1. Descripción experimental

Se utilizaron para esta experiencia tubos de ensayo de 20 ml de capacidad que contenían 5 ml de medio de cultivo 0 K mantenidos a la temperatura de 30 C. En todos los tubos se colocó CuS (a una densidad de pulpa de 0,20 %), 2,5 ml de medio 0 K y 2,5 ml del cultivo bacteriano. Según se indicará oportunamente, al medio se le adiciona suspensión de EPS mientras que el cultivo bacteriano estuvo, de acuerdo a la experiencia, células tratadas para eliminar la capa de EPS (EPS deficientes) o células no tratadas.

La preparación de los inóculos agregados a los tubos se realizó a partir de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 11477 en medio 9 K en la fase exponencial de crecimiento (95 % de consumo de hierro(II)). El cultivo fue filtrado a través de papel banda azul (S & S Runderfilter), para eliminar jarositas, luego filtradas a través de filtro de 0,22 micrones a fin de incrementar el número de bacterias destinadas a la extracción de EPS. Esto resulta necesario ya que se requiere (como fue determinada en experiencias preliminares no incluidas en esta tesis) una elevada población bacteriana para obtener una cantidad de EPS suficiente y destinarlas finalmente a la detección de hexosas. Las células fueron lavadas con medio 0 K para eliminar el hierro(III) proveniente del medio de cultivo y fueron resuspendidas en 0K (en un volumen aproximadamente 10 veces menor que el original). El número de bacterias en suspensión fue de  $3 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>.

La mitad de esta suspensión fue centrifugada a 12000 g durante 25 minutos. El pellet obtenido (que contiene las bacterias deficientes en EPS) fue suspendido en un volumen igual al original de medio 0 K de modo que el número de bacterias fuera igual al inicial. El sobrenadante, que es en realidad una suspensión con EPS, se separó para determinar hexosas y para utilizarlo en la experiencia de adherencia. Esta suspensión de EPS fue dializada, utilizando un tubo de diálisis de corte 12000 D, contra agua destilada acidificada (pH=1,50) durante 24 horas.



La otra parte de la suspensión original se utilizó directamente, sin centrifugar, como inóculo (células no tratadas) siendo la población bacteriana en suspensión semejante a la de las bacterias centrifugadas.

Para cuantificar los EPS se realizó la determinación de hexosas por el método de Dubois M. y colaboradores<sup>8</sup>. El valor determinado fue de 53 mg de glucosa por  $10^{12}$  células crecidas sobre hierro(II).

El inóculo de *Thiobacillus thiooxidans* DSM 11478 se obtuvo a partir de un cultivo sobre medio OK con agregado de 10 g/l de azufre. Las células fueron cosechadas al llegar al final de la fase exponencial y filtradas por papel de filtro banda azul para retener azufre. El número de células en suspensión fue de  $3,9 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>.

El detalle de los sistemas preparados es el siguiente (las cantidades han sido descriptas más arriba):

- 1) (Medio + covelita) + *Thiobacillus ferrooxidans* no tratados
- 2) (Medio + covelita) + *Thiobacillus ferrooxidans* deficientes en EPS
- 3) (Suspensión de EPS + covelita) + *Thiobacillus ferrooxidans* deficientes en EPS
- 4) (Suspensión de EPS + *Thiobacillus ferrooxidans* deficientes en EPS) + covelita
- 5) (Suspensión de EPS + *Thiobacillus thiooxidans* deficientes en EPS) + covelita

Los sistemas fueron preparados en el orden indicado; los dos componentes encerrados entre paréntesis fueron mezclados durante 2 minutos antes del agregado del tercer componente de la mezcla. Una vez preparados, los sistemas fueron agitados durante 15 minutos (tiempo que según estudios previos es suficiente para alcanzar el equilibrio de adherencia considerando el equilibrio físico reversible<sup>9</sup>) a 200 rpm y a 30 °C. Luego se filtraron por papel banda azul (S & S Runderfilter) y se determinó el número de bacterias en el filtrado. Para descontar las bacterias adheridas al embudo, vidrio, papel etc. se realizaron iguales experiencias pero sin el agregado de sólido (estos sistemas se denominarán blancos o controles). Las experiencias se hicieron por duplicado.

El porcentaje de adherencia se calcula como el porcentaje que representa la población residual en suspensión en un sistema cualquiera respecto de la población

---

<sup>8</sup>Dubois, M, Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers. P. A. and Smith F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugar and related substances". Analytical Chemistry 28, 350-356.

bacteriana total considerada como aquella presente en suspensión en los blancos correspondientes. Las poblaciones en suspensión se determinaron por conteo, al menos por triplicado, utilizando un microscopio con dispositivo de contraste de fase.

#### 5.2.1.2. *Discusión de los resultados experimentales*

En la figura 5.1 se encuentra representado el porcentaje de adherencia para cada uno de los sistemas y la desviación estándar correspondiente.

Como puede observarse las células de *Thiobacillus ferrooxidans* disminuyen su adherencia al sulfuro de cobre cuando son despojadas de la capa de EPS (EPS deficientes), coincidiendo por lo tanto con lo observado en los estudios sobre pirita.

La adherencia mejora substancialmente cuando a las bacterias EPS deficientes (tratadas) se le adiciona la suspensión que contiene EPS, siendo muy importante que el agregado de esta solución ocurra después del agregado de las bacterias al sustrato sólido, ya que si se coloca antes, se observa incluso un descenso en la adherencia. Una explicación cualitativa y a priori de este fenómeno, podría ser la siguiente: las bacterias sin EPS no logran adherirse al sustrato pero son capaces de volver a asociarse, al menos parcialmente, con EPS agregados externamente recuperando su capacidad para adherirse; si los EPS son agregados inicialmente, estos se asocian a la superficie del sulfuro de modo que cubren la superficie impidiendo el acercamiento de las células.

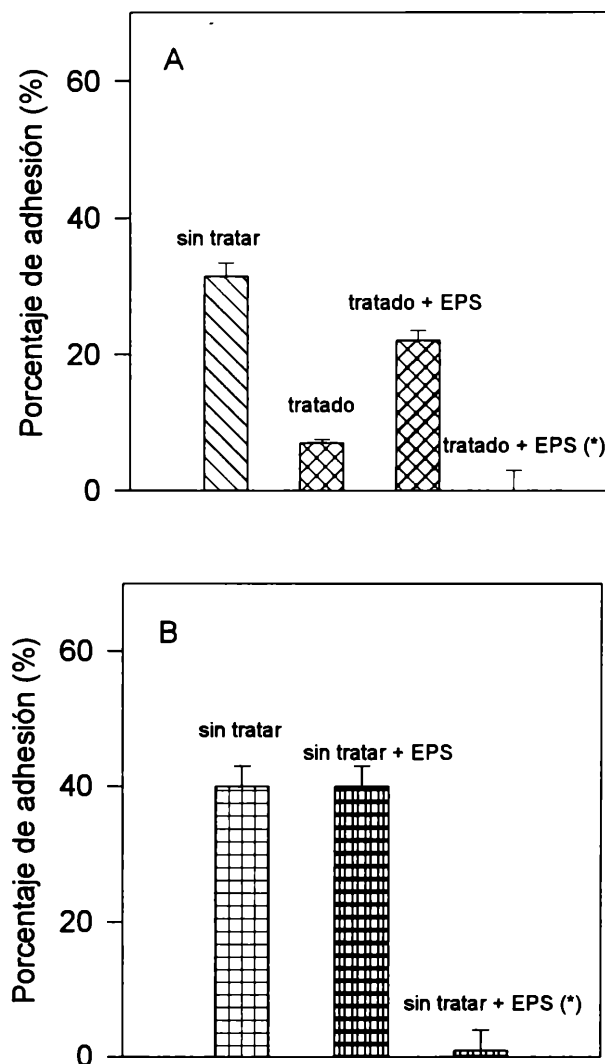
---

<sup>9</sup>Curutchet, G. 1996. "Comparación de dos especies del género *Thiobacillus* en la biolixiviación de sulfuros metálicos". Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

FIGURA 5.1. (A): Adhesión sobre covelita de células de *Thiobacillus ferrooxidans* (previamente crecidas sobre hierro(II)) deficientes en EPS y de células no tratadas.

(B): Adherencia sobre covelita de células de *Thiobacillus thiooxidans*. Influencia de la adición de EPS de células de *Thiobacillus ferrooxidans* crecidas sobre hierro(II).

(\*): EPS fue previamente puesto en contacto con covelita.



Handwritten notes and a stamp:

Stamp: INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CALABAZAR DE LA VIEJA, CALABAZAR DE LA VIEJA, VERACRUZ, MÉXICO

Handwritten: INW. ST067

Para *Thiobacillus thiooxidans* se observa que la adherencia sobre covelita es incluso mayor que la de *Thiobacillus ferrooxidans*. Además, no se produjeron cambios significativos cuando dichas bacterias se pusieron en contacto con la solución que

contiene EPS provenientes de *Thiobacillus ferrooxidans*, siempre que la solución que contiene EPS se agregue después que las bacterias. En caso contrario, y de modo semejante a lo observado para *Thiobacillus ferrooxidans*, si la solución conteniendo EPS se agrega al sistema conteniendo el sustrato sólido antes que las bacterias, éstas no se adhieren.

Este decrecimiento en el pegado sobre covelita cuando la misma estuvo previamente en contacto con una suspensión de EPS, indicaría que parte de los sitios activos del sólido (para la adhesión de células) fueron ocupados por los exopolímeros. Como este fenómeno fue observado para las dos especies bacterianas estudiadas, podría sugerir que la covelita tiene sitios activos sobre los cuales pueden adherirse indistintamente ambas especies.

## **5.2.2. Adherencia sobre sulfuro de cobre de *Thiobacillus ferrooxidans* cultivado con azufre como fuente de energía. Efecto de la presencia de EPS**

### *5.2.2.1. Descripción experimental*

Se trabajó en tubos de ensayo de 20 ml en las mismas condiciones que para 5.2.1.1, solo que las bacterias utilizadas fueron exclusivamente *Thiobacillus ferrooxidans* crecidas en un medio de cultivo 0 K utilizando azufre como fuente de energía.

El inóculo se preparó a partir de un cultivo de *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 11477 sobre azufre una vez que el pH hubiera descendido hasta 1,0 (el pH inicial fue 2,0). El cultivo fue filtrado por papel banda azul para retener azufre elemental determinándose una población en el sobrenadante de  $1 \times 10^9$  bact.ml<sup>-1</sup>. La mitad de la suspensión anterior fue centrifugada a 12000 g para separar EPS mientras que el resto fue utilizado directamente. La determinación de hexosa arrojó el valor de 60 mg de glucosa por  $10^{12}$  células crecidas en azufre (determinado por el método citado en 5.2.1.1) lo que es ligeramente mayor que para las crecidas sobre hierro(II).

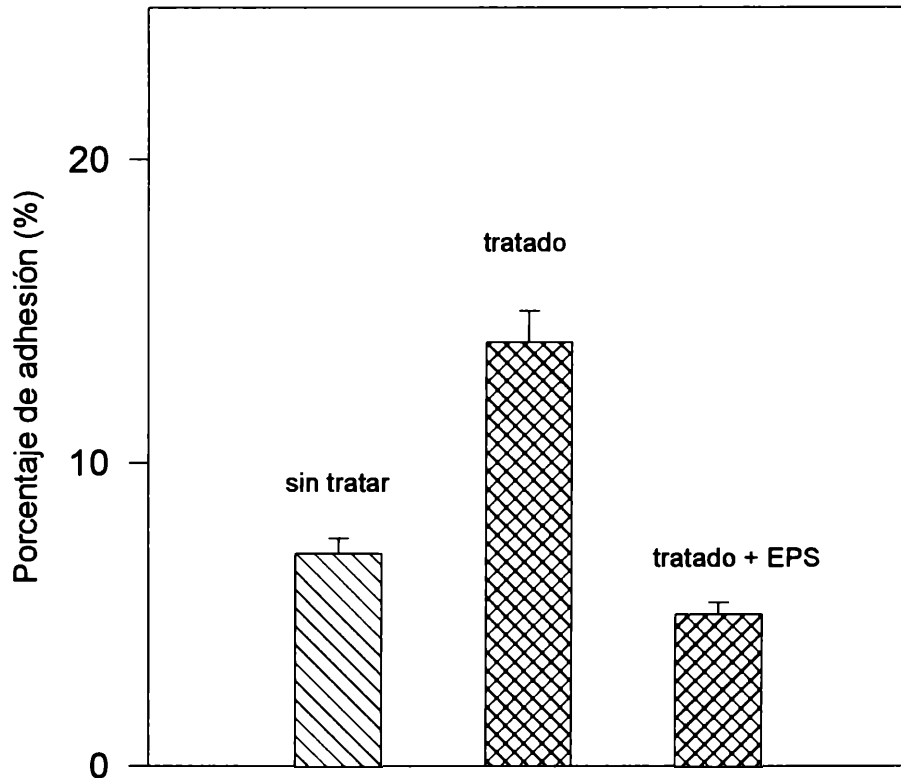
### *5.2.3.2. Discusión de los resultados experimentales*

Como puede observarse en la figura 5.2, cuando el *Thiobacillus ferrooxidans* creció en un medio de cultivo que contiene azufre como fuente de energía, la adherencia sobre covelita disminuye sustancialmente frente a la obtenida cuando la bacteria había crecido en un medio de cultivo cuya fuente de energía era el hierro(II) (ver figura 5.1).

En este caso, cuando se retira por centrifugación la capa de EPS, la adherencia aumenta (prácticamente se duplica) aunque nunca llega a los porcentajes de adherencia hallados en 5.2.2. Esta adherencia nuevamente desciende si se agregan externamente los EPS a las bacterias EPS deficientes.

FIGURA 5.2. Adhesión sobre covelita de células de *Thiobacillus ferrooxidans* (previamente crecidas sobre azufre) deficientes en EPS y de células no tratadas.

(\*): EPS fue previamente puesto en contacto con covelita.



Lo observado está en estrecha relación con lo hallado por Sand W. y colaboradores<sup>10</sup> quienes determinaron que la composición de los EPS extraídos de *Thiobacillus ferrooxidans*, cuando ha crecido en un medio que contiene azufre como fuente de energía, posee un mayor porcentaje en ácidos grasos, confiriéndole características hidrofóbicas. Es así, que estos EPS (generados cuando las bacterias crecieron sobre un sustrato esencialmente hidrófobo como el azufre<sup>11</sup>) dificultarán la

<sup>10</sup> Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. and Schippers, A. 1997. "Novel Mechanism for Bioleaching of Metal Sulfides". Internation In: Biotechnology comes of age. Australian Mineral Foundation, Glenside, pp 366-375.

<sup>11</sup>Hazeu, W., Batenburg-van der Vegter, W. H., Bos, P., van der Pas, R.K. and Kuenen, J.G. 1988. "The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reducer sulfur compounds by *Thiobacillus.ferrooxidans*. Archives of Microbiology 150, 574-579

adherencia de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre un sustrato parcialmente hidrofílico como la covelita<sup>3</sup>. Las células sin EPS, crecidas en presencia de azufre o de hierro(II), presentan una adherencia similar sobre covelita indicando que la fuente de energía no modifica las características superficiales de la bacteria por debajo de la capa de EPS.

### **5.2.3. Adherencia sobre azufre de *Thiobacillus ferrooxidans* cultivado con azufre como fuente de energía. Efecto de la presencia de EPS**

#### *5.2.3.1. Descripción experimental*

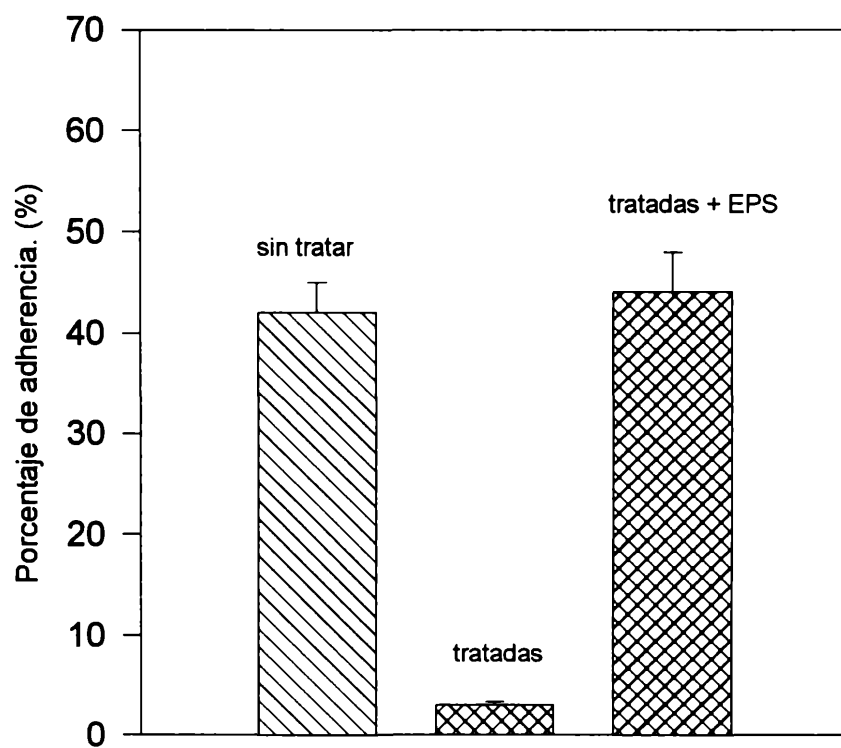
Las experiencias fueron similares a la del punto 5.2.1.1, solo que la adherencia se realizó sobre azufre (a una densidad de pulpa de 0,20 % p/v) en lugar de covelita.

#### *5.2.3.2. Discusión de los resultados experimentales*

Como puede observarse en la figura 5.3, la presencia de la capa de EPS en las células de *Thiobacillus ferrooxidans* (crecidas sobre azufre) es fundamental para la adherencia sobre azufre. Cerca del 40 % de las células no tratadas fueron adsorbidas sobre azufre. Cuando la capa de EPS fue removida, hubo una adsorción poco significativa, pero la adición de EPS restablece la habilidad para adherirse al azufre al mismo nivel que las células no tratadas.

Esto permite confirmar que la capa de EPS en células provenientes de cultivos sobre azufre, le confiere cierta hidrofobicidad a la superficie bacteriana permitiéndole una mayor adhesión a sustratos hidrófobos.

FIGURA 5.3. Adhesión sobre azufre de células de *Thiobacillus ferrooxidans* (previamente crecidas sobre azufre) deficientes en EPS y de células no tratadas





### 5.3. CONCLUSIONES

- Se demostró que la capa de EPS contribuye significativamente en la adherencia de células de *T. ferrooxidans* sobre covelita.
- Las bacterias deficientes en EPS recuperan su capacidad de adherirse generando nuevamente los exopolímeros durante el crecimiento o, simplemente, por contacto con una suspensión de EPS previamente extraídos. Este comportamiento es absolutamente independiente de la presencia o no de hierro.
- Los exopolímeros son capaces de adherirse sobre la superficie de la covelita independientemente de que estén asociados a las células o no. Sin embargo, no producen ningún tipo de disolución del sulfuro.
- La fuente de energía sobre la cual han crecido las células, influye en la hidrofobicidad de los EPS. Así, si la fuente de energía fue hierro(II), los EPS son de naturaleza más hidrofílica que si la fuente de energía fue azufre elemental.
- La adherencia sobre covelita de células deficientes en EPS, es prácticamente independiente de la fuente de energía sobre la que se desarrollaron.
- La incapacidad de *T. thiooxidans* de lixiviar covelita no está relacionada con su capacidad de adherirse al sustrato. Esta dos circunstancias no se ven alteradas por el agregado de una suspensión de EPS provenientes de células de *T. ferrooxidans*.

# **CAPÍTULO 6**

Crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* sobre  
azufre

## 6.1. INTRODUCCIÓN

### Crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* sobre azufre elemental

*Thiobacillus thiooxidans* es una bacteria acidófila, quimioautotrófica que utiliza el azufre elemental o compuestos reducidos del azufre como sustratos y que puede crecer a pH tan bajos como 0,5. La habilidad de estos microorganismos de catalizar la oxidación de compuestos reducidos del azufre, es aplicada en la industria en procesos de biolixiviación, incluyendo la recuperación de metales preciosos a partir de minerales, y en la desulfurización de carbón. El mecanismo de oxidación de sulfuros inorgánicos ha sido estudiado previamente<sup>1,2</sup> aunque las cinéticas de crecimiento de *T. thiooxidans* sobre sulfuros inorgánicos y especialmente sobre azufre elemental ha sido pobremente analizada y modelada. Un número importante de trabajos han indicado que la oxidación microbiana del azufre por *T. thiooxidans* requiere contacto directo entre la bacteria y el sustrato<sup>3,4,5</sup>.

Un trabajo previo de Konishi y colaboradores<sup>6</sup> describe la cinética de crecimiento de *Thiobacillus thiooxidans* sobre azufre elemental y la oxidación a ácido sulfúrico en cultivos en batch. Estos autores presentan un modelo tipo Langmuir para la adherencia de las células de *Thiobacillus thiooxidans* sobre el sustrato. Su modelo cinético de crecimiento sobre azufre y colonización del mismo, se centra principalmente en los estadios iniciales (a cortos tiempos). Debido a que en dicho trabajo, se ha utilizado solo un tamaño de partícula, resulta interesante avanzar un poco mas en la cuestión cinética de producción de ácido sulfúrico a distintos tamaños de partícula de azufre. Además, se pretende analizar el crecimiento en cultivos sucesivos, donde sea el azufre colonizado

---

<sup>1</sup>Susuki, I. 1974. "Mechanism of inorganic oxidation and energy coupling". *Annu. Rew. Microbiol.* 28. 85-101.

<sup>2</sup>Ehrlich, H. E. 1990. *Geomicrobiology*, 2nd Ed., Marcel Dekker, Inc.(ed), New York, 449-513.

<sup>3</sup>Takakuwa, S. Fujimori, T. and Iwasaki, H. 1979. "Some properties of cell-sulfur adhesion in *Thiobacillus thiooxidans*". *J. Gen. Appl. Microbiol.* 23. 167-173.

<sup>4</sup>Pistorio, M., Curutchet, G., Donati, E. and Tedesco, P. 1994. "Direct zinc sulphide bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*". *Biotechnology Letters*, 16, 419-424.

<sup>5</sup>Porro, S., Ramírez, S., Reche, C., Curutchet, G., Alonso, S. and Donati, E. 1997. "Bacterial attachment: its role in bioleaching processes". *Process Biochemistry*, 32, 573-578.

<sup>6</sup>Konishi, Y., Asai, S. and Yoshida, N. 1995. "Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the Surface of Elemental Sulfur". *Applied and Environmental Microbiology*", 61, 3617-3622.

por *Thiobacillus thiooxidans* el inóculo para los siguientes ciclos<sup>7</sup>. Precisamente estos son los objetivos del presente capítulo.

## 6.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### Adherencia de *Thiobacillus thiooxidans* sobre azufre elemental, cinéticas de crecimiento bacteriano y de producción de ácido sulfúrico

#### 6.2.1. Descripción experimental

Se utilizó la cepa DSM 11478 de *Thiobacillus thiooxidans* cultivada en medio OK de pH 1,8 a 30 C. Se emplearon 10 g.l<sup>-1</sup> de azufre como fuente de energía. Pasados cinco días desde la inoculación (al alcanzar dicho cultivo un pH aproximadamente igual a 1), la suspensión fue pasada cuantitativamente a través de papel de filtro banda azul para retener las partículas de azufre. El líquido sobrenadante fue centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos mientras que el pellet obtenido fue suspendido en medio OK de pH 1,8. La suspensión de células se utilizó inmediatamente como inóculo con aproximadamente 1,2x10<sup>9</sup> bact.ml<sup>-1</sup>.

Los experimentos fueron realizados, por duplicado, en frascos erlenmeyer de 250 ml de capacidad a los que adicionaron 90 ml de medio de cultivo 0 K (pH = 1,80) y 10 ml de la suspensión bacteriana preparada tal cual se ha descrito en el párrafo anterior. Los frascos fueron mantenidos a 30 C y 180 rpm. El sustrato utilizado fue azufre elemental comercial molido en mortero y separado por tamices de distinta malla; de este modo se obtuvieron 3 fracciones correspondientes a tamaños de partículas comprendidos entre 0,85-1,18 mm, 1,18-2,0 mm y 2,0-5,6 mm. Los tres tamaños de partículas se denominaron fino (S<sub>1</sub>), intermedio (S<sub>2</sub>) y grueso (S<sub>3</sub>) de acuerdo a su tamaño de partícula creciente. La densidad de pulpa empleada en los cultivos fue de 4,0 % p/v

A tiempos regulares se tomaron 2 ml de suspensión de cada cultivo. Luego del filtrado a través de papel de filtro (banda azul), se realizaron las determinaciones analíticas. El número de bacterias en solución fue estimado por medio de conteo bacteriano empleando una cámara de Petroff-Hauser y un microscopio con dispositivo de

---

<sup>7</sup> Pogliani, C., Curutchet, G. and Donati, E. 1997. "Bioleaching of sulfide ore by a combined attack with two species of Thiobacilli". 5th Southern Hemisphere Meeting on Mineral Technology. Buenos Aires, Argentina.

contraste de fase. La producción de ácido sulfúrico fue cuantificada por titulación con solución de hidróxido de potasio 0,020 N, empleando fenolftaleína como indicador<sup>8</sup>.

El número de bacterias adheridas al azufre inicialmente fue determinado por comparación (luego de 15 minutos de agitación a 180 rpm) de las poblaciones en suspensión presentes en los cultivos mencionados y en un control semejante a los anteriores pero sin agregado de azufre. Los frascos eran similares de modo que la cantidad de bacterias adheridas al vidrio también lo fueran.

Luego de un período de aproximadamente nueve días, todos los cultivos fueron filtrados a través de papel de filtro banda azul para retener el azufre. Este azufre (colonizado por bacterias) fue enjuagado dos veces con 4 ml de 0 K de pH 1,8 con una suave agitación y utilizado posteriormente como inóculo en nuevos cultivos. El mismo procedimiento se repitió durante cuatro cultivos sucesivos.

## 6.2.2. *Discusión de los resultados experimentales*

### 6.2.2.1. *Adherencia inicial del Thiobacillus thiooxidans al azufre*

En la tabla 6.1 se encuentran los resultados del conteo bacteriano, que se realizó luego de 15 minutos de haber comenzado la experiencia (que se supone suficiente para alcanzar el equilibrio de absorción-desorción). Se indica el valor promedio de los frascos duplicados (la desviación estándar no superó el 5 %).

En todos los frascos empleados para esta experiencia se utilizó la misma masa de azufre y el mismo número de bacterias iniciales. En el cultivo control no fue agregado azufre. El cultivo con mayor superficie de azufre expuesta (tamaño de partícula menor) produjo una adherencia bacteriana mayor. Si el tamaño de partícula es mayor, la adherencia es significativamente menor aunque, como se verá mas adelante, se va incrementando luego de cierto tiempo.

---

<sup>8</sup> Kolthoff, I, Sandell E., Meehan, E., Brickenstain, S. 1979. Análisis químico cuantitativo. Ed. Nigar, Buenos Aires, Argentina.

TABLA 6.1. Número de células (*Thiobacillus thiooxidans*) adheridas inicialmente a la superficie del azufre

Sistema	Nº total de bacterias libres	Nº total de bacterias adheridas	Bacterias adheridas por gramo de S
S <sub>1</sub>	65x10 <sup>8</sup>	52x10 <sup>8</sup>	13x10 <sup>8</sup>
S <sub>2</sub>	72x10 <sup>8</sup>	45x10 <sup>8</sup>	11x10 <sup>8</sup>
S <sub>3</sub>	106x10 <sup>8</sup>	11x10 <sup>8</sup>	2,8x10 <sup>8</sup>
Control	117x10 <sup>8</sup>	—	—

Debido a que el azufre utilizado presentaba una pequeña superficie expuesta (por ser no poroso), las diferencias en los resultados obtenidos en la determinación de superficie específica por BET para los tres tamaños de partículas no fueron significativas dentro del error del equipo utilizado. Por esta razón, el área de la superficie expuesta de las partículas de azufre se calculó en forma aproximada suponiendo que las partículas tienen forma esférica. Como para cada tamaño de partícula hay un radio máximo y un radio mínimo, podemos determinar un radio de partícula promedio  $r = \sqrt{r_{\min} \cdot r_{\max}}$ . Los radios máximos y mínimos fueron obtenidos de tablas<sup>9</sup>. El área expuesta total será  $A = N \cdot 4 \pi r^2$  donde N es el número de partículas esféricas de radio promedio r. Además, la masa de azufre puede escribirse como:

$$m_s = N \delta_s \frac{4}{3} \pi r^3$$

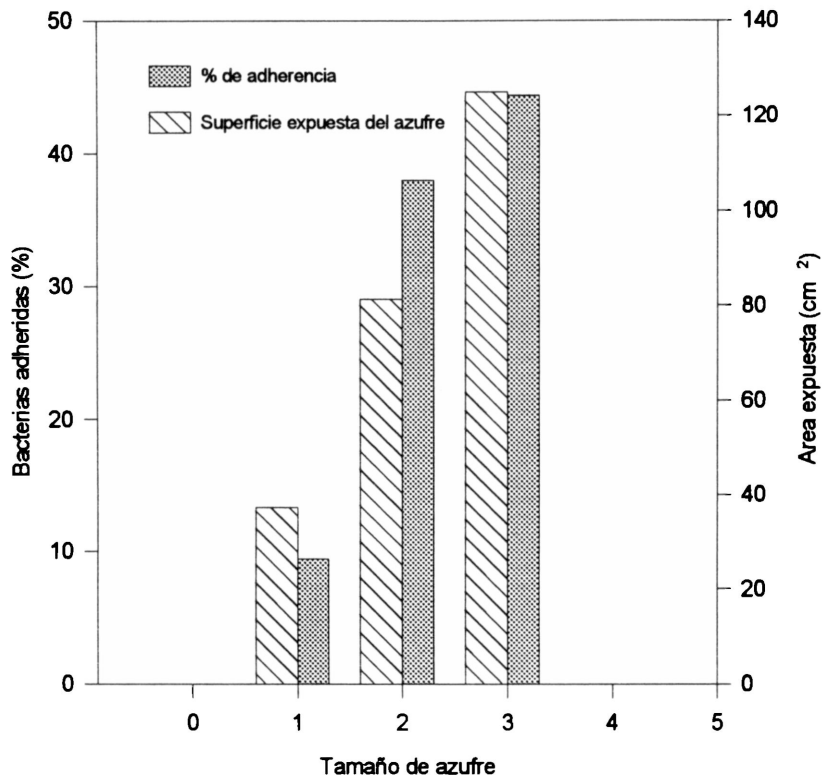
donde  $\delta_s$  es la densidad del azufre<sup>9</sup>. Utilizando ambas expresiones, podemos encontrar que el área expuesta es:

$$A = 3 m_s / \delta_s r \quad (6.1)$$

En la figura 6.1 se ha representado el porcentaje de adherencia inicial para las distintas áreas calculadas empleando la ecuación 6.1

<sup>9</sup> Handbook of Chemistry and Físic CRS press 60 edition Robert Weast (ed) Florida, U.S.A.

FIGURA 6.1. Adherencia inicial de *Thiobacillus thiooxidans* a partículas de azufre de distinto tamaño



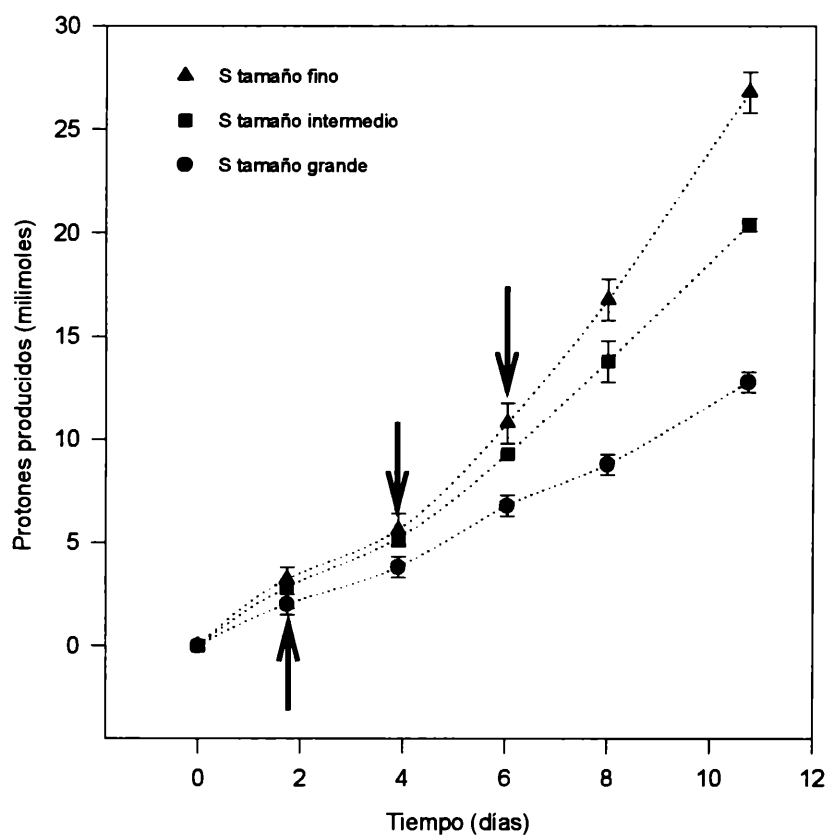
- 1 azufre de partícula gruesa
- 2 azufre de partícula fina
- 3 azufre de partícula intermedia

Al representar el número de bacterias adheridas inicialmente en función del área calculada empleando la ecuación (6.1) se obtiene una línea recta con un coeficiente de correlación de 0,92 (datos no mostrados).

6.2.2.2. Producción de ácido sulfúrico por *Thiobacillus thiooxidans* en cultivos con azufre (con diferentes tamaños de partícula) como fuente de energía. Cálculo del número de bacterias adheridas al azufre

En la figura 6.2 se representó la producción de ácido sulfúrico durante el tiempo que duró el primer ciclo de la experiencia, para cada uno de los tamaños de partícula de azufre utilizado. Las flechas en el gráfico indican los instantes a partir de los cuales las diferentes curvas indican comportamientos prácticamente lineales.

FIGURA 6.2. Producción de ácido sulfúrico por *Thiobacillus thiooxidans* utilizando azufre con distintos tamaño de partícula

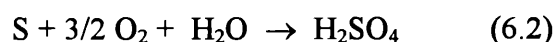


La cantidad de ácido producida en el medio es equivalente a la masa de azufre elemental transformada. De acuerdo a los resultados hallados por Konishi<sup>10</sup> el azufre

<sup>10</sup> Konishi, Y., Asai, S. and Yoshida, N. 1995. "Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the Surface of Elemental Sulfur". *Applied Environmental Microbiology*, 61, 3617-3622.



elemental es estequiométricamente oxidado a sulfato por *Thiobacillus thiooxidans* de acuerdo a la siguiente ecuación:



En realidad, el proceso anterior ocurre en una serie de etapas en las cuales se forman compuestos intermedios con características reductoras; de todos modos, la concentración de estas especies es cualquier instante del crecimiento es muy pequeña comparada con la concentración del último producto (ácido sulfúrico). Por esta razón, no se tendrán en cuenta durante la discusión de los presentes resultados.

Una manera sencilla para evaluar el número de bacterias adheridas al azufre, implica aceptar un valor para  $Y_{x/s}$  (rendimiento de células de *Thiobacillus thiooxidans* por gramo de S consumido); luego, sabiendo que la masa de azufre es transformada en ácido de acuerdo con la ecuación 6.2, se puede calcular el número de bacterias generadas. Por último, con las bacterias totales generadas y el número de bacterias en la solución, podríamos estimar el número de bacterias adheridas. En la tabla 6.2, 6.3 y 6.4 se han volcado los resultados de dichos cálculos. Para ello se ha utilizado un valor de  $Y_{x/s}$  igual a  $2,05 \times 10^{11}$  células.g<sup>-1</sup> de S oxidado<sup>10</sup>.

TABLA 6.2. Número de bacterias adheridas sobre el azufre de tamaño grueso (población bacteriana inicial:  $1,17 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>)

Tiempo (días)	H+ mmoles en 100 ml	S consumido mg en 100 ml	*células producidas	*células libres	*células adheridas
0	12,2	—	—	$106 \times 10^8$	$11 \times 10^8$
1,74	14,2	32	$65 \times 10^8$	$92 \times 10^8$	$90 \times 10^8$
3,92	16,2	64	$131 \times 10^8$	$145 \times 10^8$	$103 \times 10^8$
6,04	18,7	104	$213 \times 10^8$	$228 \times 10^8$	$102 \times 10^8$
8,00	21,0	141	$289 \times 10^8$	$308 \times 10^8$	$98 \times 10^8$
10,7	25,3	208	$426 \times 10^8$	$446 \times 10^8$	$97 \times 10^8$

\*corresponde a células totales en los 100 ml de cultivo

TABLA 6.3. Número de bacterias adheridas sobre el azufre de tamaño intermedio (población bacteriana inicial:  $1,17 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>)

Tiempo (días)	H+ mmoles en 100 ml	S consumido mg en 100 ml	*células producidas	*células libres	*células adheridas
0	12,2	—	—	$72 \times 10^8$	$45 \times 10^8$
1,74	14,5	36,8	$75 \times 10^8$	$90 \times 10^8$	$102 \times 10^8$
3,92	17,4	83,2	$171 \times 10^8$	$157 \times 10^8$	$131 \times 10^8$ 6,04
	21,5	149	$305 \times 10^8$	$282 \times 10^8$	$140 \times 10^8$
8,00	26,0	221	$453 \times 10^8$	$430 \times 10^8$	$140 \times 10^8$
10,7	32,0	316	$649 \times 10^8$	$636 \times 10^8$	$130 \times 10^8$

\*corresponde a células totales en 100 ml del cultivo

TABLA 6.4. Número de bacterias adheridas sobre el azufre de tamaño fino (población bacteriana inicial:  $1,17 \times 10^8$  bact.ml<sup>-1</sup>)

Tiempo (días)	H+ mmoles en 100 ml	S consumido mg en 100 ml	*células producidas	*células libres	*células adheridas
0	12,2	—	—	$65 \times 10^8$	$52 \times 10^8$
1,74	15,4	38,4	$79 \times 10^8$	$94 \times 10^8$	$102 \times 10^8$
3,92	17,8	89,6	$184 \times 10^8$	$142 \times 10^8$	$159 \times 10^8$
6,04	23,2	176	$361 \times 10^8$	$238 \times 10^8$	$240 \times 10^8$
8,00	29,0	269	$551 \times 10^8$	$410 \times 10^8$	$258 \times 10^8$
10,7	38,6	442	$866 \times 10^8$	$720 \times 10^8$	$263 \times 10^8$

\*corresponde a células totales en 100 ml del cultivo

El cultivo que posee azufre con el mayor tamaño de partícula genera inicialmente ácido en una proporción menor a los otros dos cultivos; esto se debe probablemente a una menor adherencia inicial de células (debido a una menor superficie expuesta) sobre el sustrato ya que dicho comportamiento comienza a observarse inmediatamente después de la inoculación. A partir de los dos días (ver flecha en el gráfico), la cantidad de ácido generada aumenta en forma prácticamente lineal con el tiempo. A partir de ese instante,

la velocidad de producción de ácido sulfúrico es constante e igual a 1,29 milimoles.día<sup>-1</sup>. Esto coincide con la constancia del número de bacterias adheridas (ver tabla 6.2) indicando que en este cultivo se ha alcanzado la máxima colonización en su superficie.

Para los primeros cuatro días, las diferencias entre las producciones de ácido en los cultivos con azufre a tamaño intermedio y tamaño fino, se encuentran dentro del error experimental). Esto es consecuente con una diferencia poco significativa entre las adherencias iniciales para ambos sistemas. En estos cultivos se necesita un tiempo mayor para alcanzar una velocidad de producción de protones constante en el tiempo (4 y 6 días para los cultivos con tamaño de partícula intermedio y fino respectivamente). Estos tiempos para los cuales se alcanzan velocidades de producción de protones iguales a 2,2 y 3,4 milimoles.día<sup>-1</sup> respectivamente, coinciden con aquellos a partir de los cuales el número de bacterias adheridas se mantiene prácticamente sin variación (ver tablas 6.3 y 6.4).

La evolución de las velocidades de producción de protones hasta alcanzar un valor constante, observada independientemente del tamaño de partícula, parece indicar que se produce una saturación de la superficie del azufre (la saturación será más rápida cuánto menor sea la superficie expuesta). Asumiendo esta hipótesis, el número máximo de bacterias adheridas por unidad de superficie de azufre es  $2(\pm 0,4) \times 10^8$  células.cm<sup>-2</sup>. Dado que solo se utilizaron 3 tamaños de partículas y que, aun entre ellos, la dispersión de este valor fue importante (25 %), este valor solo debe tomarse como una primera aproximación.

En realidad, en la discusión anterior no se ha tenido en cuenta que el ataque del azufre por células de *Thiobacillus* procede a través la formación de azufre coloidal<sup>11</sup>. Teniendo en cuenta esto, la superficie expuesta debería aumentar constantemente; sin embargo, es probable que precisamente este primer paso de formación de azufre coloidal sea el limitante y que esté en directa relación con la superficie expuesta inicialmente por el azufre. Tampoco se ha considerado limitación por nutrientes gaseosos lo que, a lo sumo, debería ser considerado para el menor tamaño de partícula donde se observó mayor velocidad.

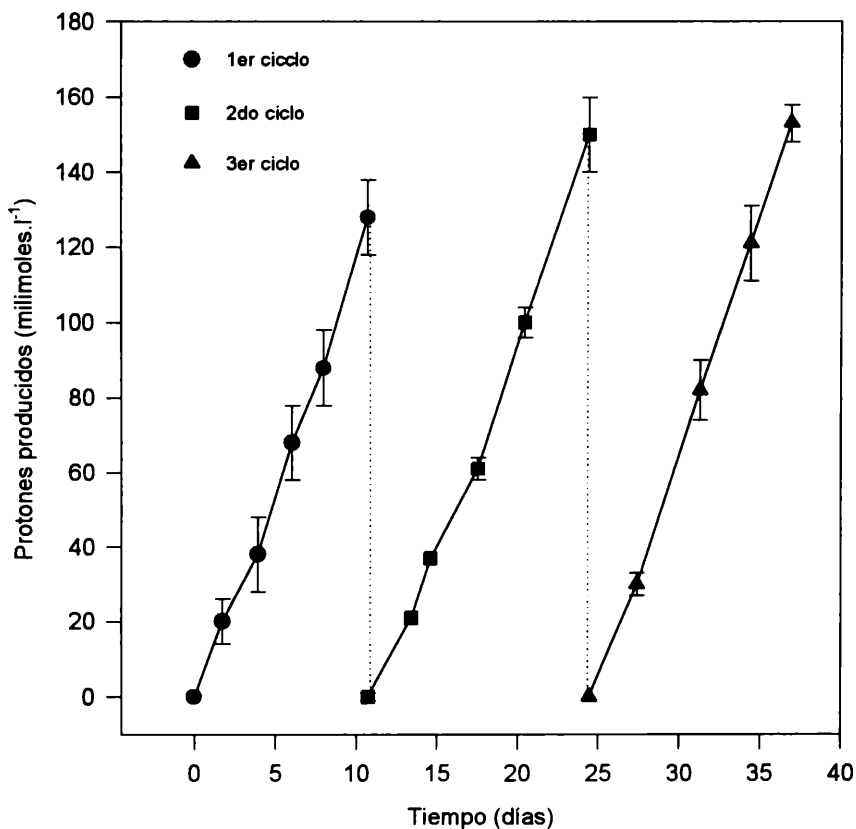
---

<sup>11</sup> Karavaiko, G., Rossi, G., Agate, A., Groudev, S. and Avakyan, Z. 1988. Biogeotechnology of metals. Centre for International Projects GKNT, Moscow.

### 6.2.2.3. Análisis de la velocidad de producción de ácido sulfúrico para ciclos sucesivos

Con el objetivo de analizar el número de bacterias realmente inmovilizados sobre el azufre, luego de 11 días se procedió a reemplazar en los cultivos anteriores, el medio de cultivo por medio fresco (sin una nueva inoculación). El procedimiento seguido fue el descrito en 6.2. En las figuras 6.3, 6.4 y 6.5 se han representado la producción de protones en los nuevos cultivos en función del tiempo, para los diferentes tamaños de partícula, y para tres ciclos sucesivos.

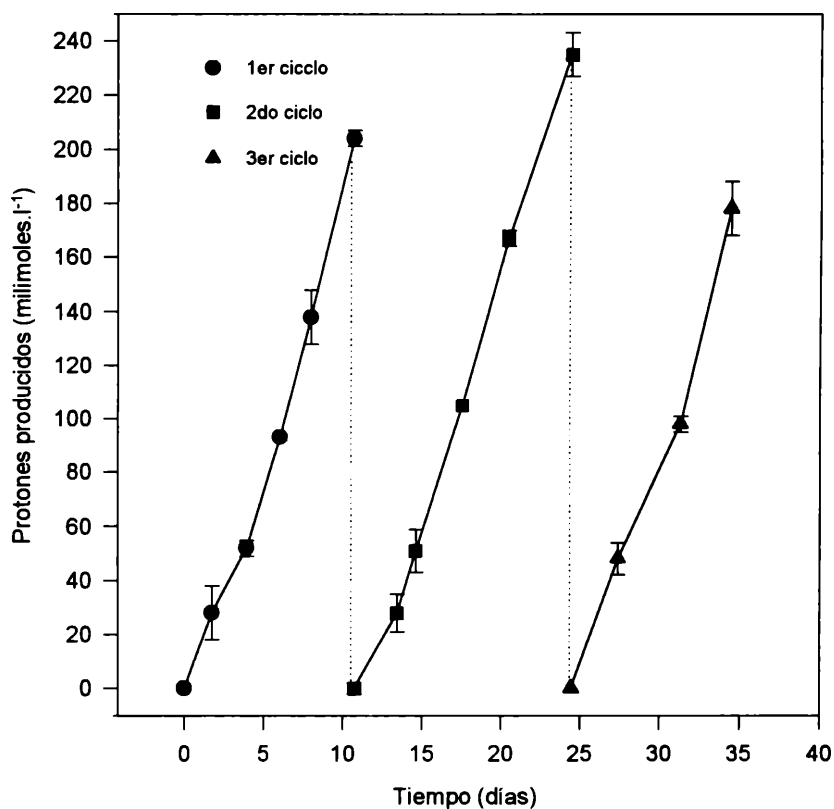
FIGURA 6.3. Producción de protones en un cultivo de *Thiobacillus thiooxidans*, empleando azufre (tamaño grande) como fuente de energía, en sucesivos ciclos



Puede observarse en las tres figuras que en cada nuevo ciclo, se vuelve a alcanzar una producción de protones muy semejante a la velocidad de producción que tenía el cultivo en la finalización del ciclo inmediatamente anterior. En el pasaje del

primer al segundo ciclo, el azufre fue lavado reiteradas veces en función de probar una eventual reversibilidad en la adherencia bacteriana. Puede observarse que, como consecuencia de ello, el segundo ciclo (y no el tercero) presenta una velocidad inicial menor a la del ciclo anterior, sin embargo, posteriormente se llega nuevamente a una velocidad constante y similar a la del primer ciclo.

FIGURA 6.4. Producción de protones en un cultivo de *Thiobacillus thiooxidans*, empleando azufre (tamaño intermedio) como fuente de energía, en sucesivos ciclos



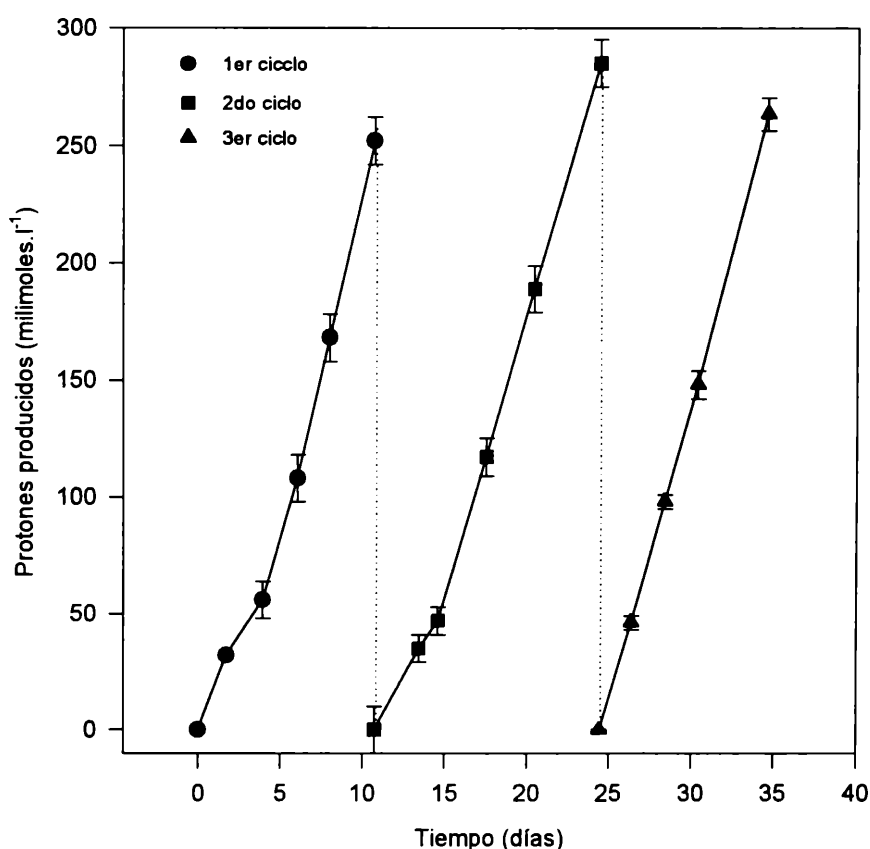
Esta situación se atribuyó fundamentalmente a la pérdida de azufre coloidal durante la filtración y lavado y no a la disminución de células por desorción.

Los cultivos sucesivos con azufre de mayor tamaño de partícula se desarrollaron a la misma velocidad final (1,29 milimoles.día<sup>-1</sup>). Para los cultivos con azufre de tamaño intermedio, se observó un descenso desde 2,2 milimoles.día<sup>-1</sup> en el primer ciclo hasta 1,8 milimoles.día<sup>-1</sup> en el tercero. Por último, cuando el azufre usado fue

el de menor tamaño de partícula, se observó un descenso desde 3,4 a 2,7 milimoles.día<sup>-1</sup>. Estos descensos pueden ser debidos al menos, a dos razones:

- 1) pérdida de azufre coloidal entre ciclos.
- 2) Disminución de la cantidad total de azufre presente

FIGURA 6.5. Producción de protones en un cultivo de *Thiobacillus thiooxidans*, empleando azufre (tamaño fino) como fuente de energía, en sucesivos ciclos



Esta última razón está reforzada por la cantidad de azufre que fue consumido: 0,21, 0,32 y 0,42 g de azufre para los tamaños grueso, intermedio y fino respectivamente, luego del primer ciclo. Estas cantidades corresponden a un 5 %, 7,5 % y 10 % del azufre inicial presente (las disminuciones de velocidad desde el primero al segundo ciclo observadas para los cultivos con azufre de tamaño intermedio y fino son prácticamente del mismo orden; sin embargo no fue observado descenso para el cultivo con mayor tamaño de partícula).

### 6.3. CONCLUSIONES

- La adherencia inicial de las células de *T. thiooxidans* al azufre es proporcional a la superficie expuesta.
- La velocidad de producción de ácido crece hasta velocidad constante requiriendo para ello un tiempo mayor cuanto menor es el tamaño de partícula del azufre utilizado.
- El comportamiento de los cultivos sugiere una saturación de la superficie del azufre con células siendo el valor de saturación del orden de  $2 \times 10^8$  bact.cm<sup>-2</sup>
- La adherencia sobre azufre es prácticamente irreversible dado que lavados sucesivos dejaron prácticamente constante la velocidad de producción de protones (y, por lo tanto, de bacterias adheridas).

# CAPÍTULO 7

Bioremediación anaeróbica de covelita utilizando  
*Thiobacillus ferrooxidans* en presencia de  
hierro(III)



## 7.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado en los capítulos anteriores los *Thiobacillus* son un grupo de bacterias gram-negativas, quimioautotróficas, que pueden obtener su energía a partir de la oxidación de una variedad compuestos reducidos del azufre, fundamentalmente sulfuros metálicos.

*Thiobacillus ferrooxidans* es probablemente el microorganismo más importante en las operaciones de lixiviación de minerales sulfurados de baja ley<sup>1</sup>. *T. ferrooxidans* puede atacar las especies sulfuradas directa o indirectamente<sup>2,3</sup>, (ver capítulo 1).

*T. ferrooxidans* es considerado generalmente como un organismo aeróbico, empleando el oxígeno como el último aceptor de electrones para el crecimiento bacteriano. Sin embargo, existen trabajos en los cuales se demuestra que *T. ferrooxidans* es capaz de reducir hierro(III) a hierro(II) bajo condiciones anaeróbicas en presencia de azufre<sup>4,5</sup>; además, se ha encontrado que ese proceso ocurre aun en condiciones aeróbicas si el pH del medio es suficientemente bajo (pH menor a 1,20) como para inhibir la oxidación aeróbica del hierro(II)<sup>6</sup>. Sin embargo, no se han comunicado trabajos donde se ponga de manifiesto el crecimiento de *T. ferrooxidans* sobre sulfuros insolubles (el sustrato más común encontrado en los minerales metálicos) bajo condiciones anaeróbicas.

Por otro lado, se ha verificado que en las pilas de lixiviación, la concentración de oxígeno baja rápidamente llegando a valores casi insignificantes a 0,5 m por debajo de la superficie. Debido a que la concentración de dióxido de carbono es aun suficientemente alta en esas zonas, resulta importante estudiar la existencia de un mecanismo anaeróbico de biolixiviación que opere cuando hay algún aceptor alternativo de electrones.

---

<sup>1</sup>Torma, A.E. 1977. "The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in biohydrometallurgical processes". *Adv. Biochem. Eng.* 6, 1-37.

<sup>2</sup>Donati, E., Porro, S. and Tedesco, P. 1988. "Direct and indirect mechanisms in the bacterial leaching of covellite". *Biotechnology Letters* 10, 889-894.

<sup>3</sup>Sand, W., Gerke, T., Hallmann, R. and Schippers, A. 1995. "Sulfur chemistry, biofilm and the (in)direct attack mechanism -a critical evaluation of bacterial leaching". *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 961-966.

<sup>4</sup>Pronk, J.T., de Bruyn, J.C., Bos, P. and Kuenen, J.G. 1992. "Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*". *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2227-2230.

<sup>5</sup>Brock, T.D. and Gustafson, J. 1976. "Ferric ion reduction by sulfur and iron-oxidizing bacteria". *Applied and Environmental Microbiology* 32, 567-571.

<sup>6</sup>Sand, W. 1989. "Ferric ion reduction by *Thiobacillus ferrooxidans* at extremely low pH-values". *Biogeochemistry* 7, 195-201.

En este capítulo se estudió la posibilidad de que *T. ferrooxidans* creciera bajo condiciones anaeróbicas sobre sulfuro de cobre sintético. El hierro(III) fue el aceptor de electrones utilizado ya que su papel como tal ha sido confirmado por estudios previos (aunque en cultivos con azufre como dador) y, además, porque se encuentra generalmente presente en las pilas de lixiviación.

## 7.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### Biolixiviación de sulfuro de cobre en condiciones anaeróbicas

#### 7.2.1. Descripción experimental

Se realizaron experiencias de lixiviación bacteriana empleando frascos de 250 ml que contenían 200 ml de medio de cultivo conteniendo  $6 \text{ g.l}^{-1}$  de hierro(III) (preparado a partir de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ), con pH inicial igual a 1,80. El medio fue previamente esterilizado por filtración a través de filtro de  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ .

El diseño de los frascos utilizados puede verse en el esquema de la figura 1. Los frascos fueron agitados en un incubador orbital a 130 rpm y la temperatura durante toda la experiencia fue de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . En todos los frascos se agregaron 0,40 g de sulfuro de cobre sintético (Strem Chemicals Inc.) en polvo del 99 % de pureza, de modo de conseguir una densidad de pulpa de 0,20 %. 1 ml de una solución al 1 % de bicarbonato de sodio (esterilizado por filtración) fue adicionado en un pequeño reservorio sobre el medio de cultivo (ver figura 1). Los frascos fueron inoculados al 5 % v/v con células de *T. ferrooxidans* de modo de alcanzar una población bacteriana inicial de aproximadamente  $10^7 \text{ células.ml}^{-1}$ . El inóculo provenía de un cultivo sobre hierro(II) que, al alcanzar la fase exponencial de desarrollo, fue filtrado para eliminar jarositas, el pellet recogido por filtración a través de un filtro de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ , lavado varias veces con agua acidificada de pH 1,50 y suspendido finalmente en medio sin hierro.

Para poder obtener condiciones anaeróbicas, nitrógeno estéril (pasado a través de una solución alcalina de pirogalol para retener trazas de oxígeno) se hizo burbujear en la solución de todos los frascos durante 15-20 minutos. El flujo de nitrógeno fue detenido cuando las lecturas efectuadas con un electrodo galvánico (situado dentro de un frasco posterior a los frascos de interés en el tren de circulación) arrojó un valor insignificante. Finalmente, se cerraron las válvulas y se sellaron los frascos. Luego de la circulación de nitrógeno, la solución de bicarbonato de sodio que había sido introducida en el reservorio, se dejó caer sobre la solución inclinando ligeramente los frascos. De este modo, fue asegurada la presencia de dióxido de carbono (como fuente de carbono) durante la experiencia.

Controles inoculados pero en medios sin hierro(III) permitieron para excluir la posibilidad que el crecimiento bacteriano pueda deberse a pequeñas cantidades de oxígeno dentro de los frascos. También se realizaron controles estériles, bajo las mismas condiciones que los frascos inoculados, reemplazando el inóculo por un volumen igual de una solución 2 % p/v de timol en metanol<sup>7</sup>. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

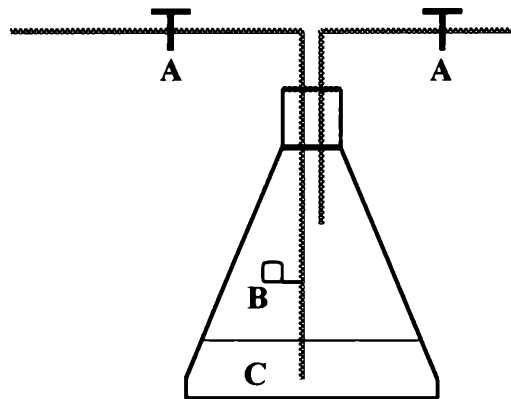


FIGURA 7. 1. Esquema de un frasco utilizado para ensayos en anaerobiosis.

A: válvula; B: solución de bicarbonato de sodio;

C: medio de cultivo y sulfuro de cobre.

Durante la experiencia se hicieron muestreos preservando las condiciones anaeróbicas de los sistemas (expulsando una muestra por burbujeo de nitrógeno). En estas muestras, se determinó la concentración de hierro(II) por titulación con solución valorada de permanganato de potasio<sup>8</sup>. El hierro total soluble (tanto hierro(II) como hierro(III)) y el cobre disuelto fueron determinados por espectrofotometría de absorción atómica. La producción de ácido fue determinada por titulación con solución valorada de hidróxido de sodio y el pH de los cultivos fue medido con un electrodo de vidrio. El número de bacterias en la solución se determinó por conteo directo con cámara de Petroff-Hausser<sup>9</sup>.

<sup>7</sup>Agate A. D. and Khinvasara. 1986. Biorecovery of Copper Ores and Concentrate of Malanjkhand Area, India. In *Biotechnology and Bioengineering Symp.* Ehrlich H and Holmes D (ed) 83-90.

<sup>8</sup>Kolthoff, I., Sandell E., Meehan E., Brickenstein S. 1979. *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Nigar, Buenos Aires, Argentina.

<sup>9</sup>Cooney, C.L. 1981. "Growth of microorganisms". In: Rehm H.J. and Reed G. (eds). *Biotechnology*. VCH Publishers, Berlin, 73-111.

### 7.2.2. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 7.2 se muestra la concentración de cobre(II) en los sistemas inoculados y estériles (con y sin el agregado de hierro(III)) durante los 35 días de duración de la experiencia.

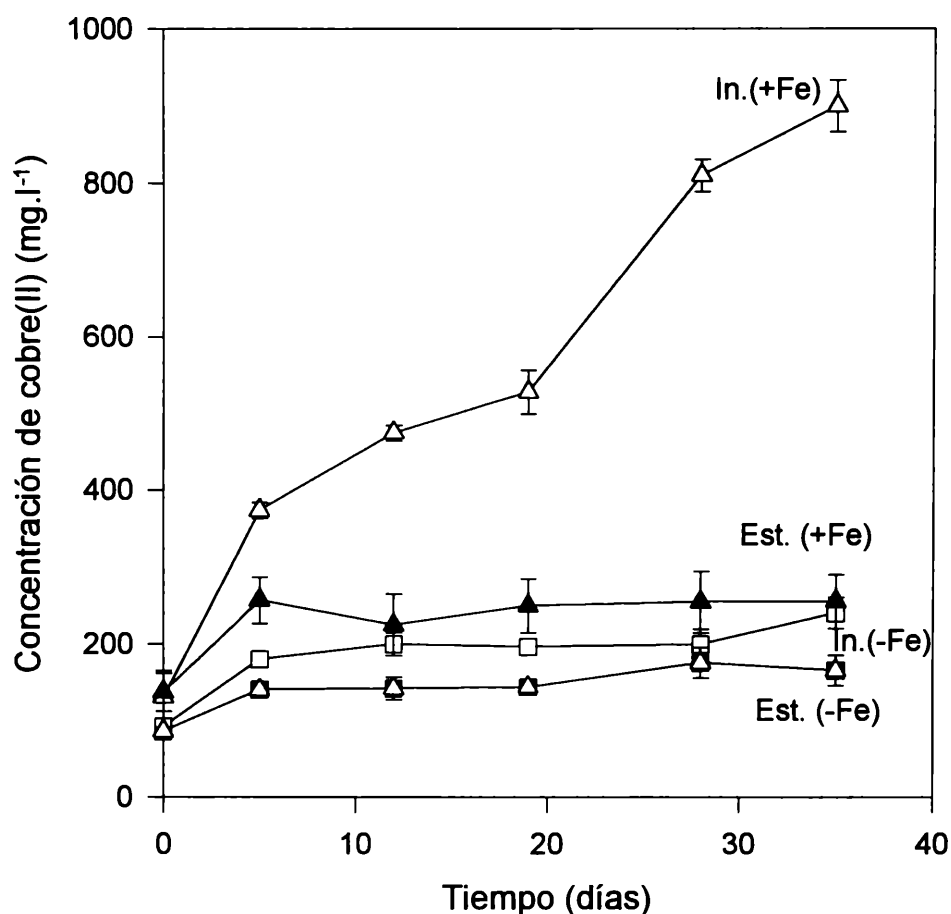


FIGURA 7.2: Extracción de cobre durante la lixiviación bajo condiciones anaeróbicas.

In(+Fe): Cultivos con hierro(III) inoculados con *Thiobacillus ferrooxidans*; In(-Fe): Cultivos sin hierro(III) inoculados con *Thiobacillus ferrooxidans*; Est(+Fe): Control estéril con hierro(III); Est(-Fe): Control estéril sin hierro(III).

La extracción en el cultivo con hierro(III) fue del 68 % superando ampliamente a la obtenida en el resto de los sistemas. La extracción en el cultivo sin hierro(III) fue similar a la obtenida en el control respectivo confirmando que los frascos se encontraban bajo condiciones anaeróbicas (en caso contrario, en el sistema inoculado debería haberse

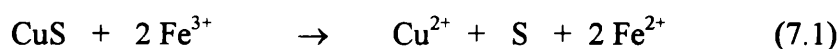
producido una alta disolución del sulfuro de cobre). Las extracciones de cobre en estos sistemas (18 y 13 % respectivamente) se deben esencialmente a la disolución ácida producida por el medio (pH inicial igual a 1,80).

Por último, la disolución producida en el control estéril con hierro(III) fue ligeramente superior a la del control estéril sin hierro(III), confirmando que existe un ataque oxidante del medio sobre el sulfuro, aun en condiciones abióticas.

Mediante la diferencia entre las extracciones del sistema inoculado y el control correspondiente (sin hierro), se determinó que 10,3 milimoles de cobre fueron solubilizados por acción bacteriana después de 35 días; para ello se ha supuesto que se produce igual disolución ácida en ambos cultivos.

La figura 7.3 muestra la correlación entre el crecimiento de la población bacteriana en los cultivos con hierro(III) y el aumento de la concentración de hierro(II).

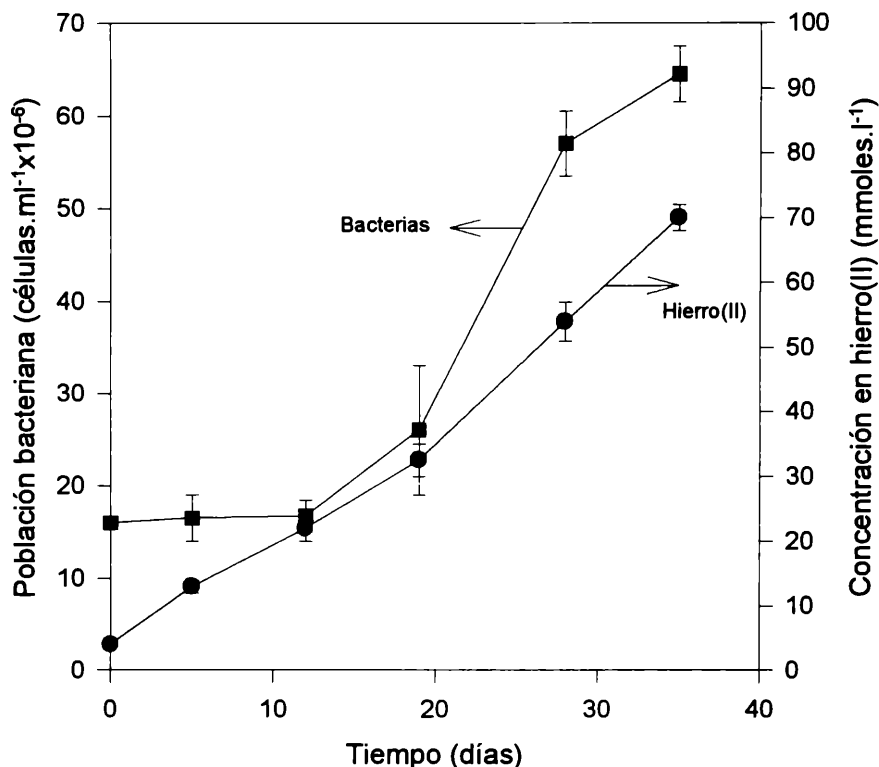
El comportamiento observado puede ser interpretado del siguiente modo: en los sistemas estériles e inoculados que contenían hierro(III) inicialmente, el sulfuro de cobre es oxidado de acuerdo a la reacción:



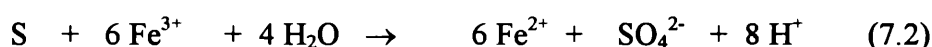
Los incrementos de ion cobre y hierro(II) en solución (figuras 7.2 y 7.3) confirman que el proceso indicado por la ecuación 7.1 ha ocurrido muy rápido. Sin embargo, posteriormente no continúa la disolución en el sistema estéril, siendo la reducción del hierro(III) muy baja (3 mmoles a los 5 días que se mantiene prácticamente sin cambios hasta el final de la experiencia). La reacción 7.1 se detiene debido al azufre elemental que, producido durante la misma reacción, recubre la superficie del sulfuro, protegiéndolo de una futura oxidación química.

Un proceso similar debería ocurrir en los sistemas inoculados, sin embargo, se observa que la concentración de cobre(II) en solución se incrementa de modo prácticamente continuo. Para que la disolución del sulfuro de cobre haya continuado a través de la reacción 7.1, es necesario que, previamente, la película de azufre depositada haya sido atacada, seguramente, por un proceso bacteriano ya que en los estériles correspondientes no ocurrió.

FIGURA 7.3: Población bacteriana y concentración de hierro(II) durante la biolixiviación de covellita bajo condiciones anaeróbicas



En ausencia de oxígeno, el ataque bacteriano tiene que haber ocurrido a través de la reacción representada por la siguiente ecuación:



Esta reacción es obviamente espontánea aun en ausencia de bacterias, pero ocurre a velocidades muy bajas. La relación entre moles de hierro(III) reducidos y de cobre(II) solubilizados en el cultivo fue aproximadamente 7 hacia el final de la experiencia. Esta relación es muy superior a la que debería obtenerse si el único mecanismo a través del cual el hierro se reduce fuera el indicado en la ecuación 7.1. Si todo el sulfuro oxidado a través de la reacción 7.1 fuese llevado finalmente a sulfato por la reacción 7.2, debería haberse encontrado una relación algo mayor a la experimental (8 a 1). Esto podría explicarse suponiendo que la reacción 7.2 ha generado parcialmente

intermediarios que no fueron finalmente oxidados. Es probable que la relación hierro(III) reducido/cobre(II) solubilizado, hubiese crecido si la experiencia no se hubiera discontinuado a los 35 días.

El mecanismo de acción bacteriana propuesto que implica esencialmente una “limpieza” de la superficie del sulfuro permitiendo la continuidad de la acción oxidante del hierro(III) sobre el sulfuro, es consistente con la evolución del pH en el cultivo: se registró un descenso del pH desde 1,80 hasta 1,62. Esta producción de protones ocurriría a través de la reacción 7.2.

El crecimiento de los cultivos bacterianos muestra una inicial fase lag la cual es seguida por una fase exponencial de crecimiento (fig. 7.3). El número de células formadas en la suspensión líquida fue de  $1 \times 10^9$  células por mmol de ion hierro(II). La larga fase lag inicial sugiere que la reacción 7.1 no es catalizada por las bacterias (no hubo crecimiento bacteriano hasta que la capa de azufre fue producida, que debe coincidir con el detenimiento en la extracción de cobre en el estéril con hierro(III)).

La recuperación de cobre bajo condiciones anaeróbicas fue comparada con la obtenida de cultivos similares bajo condiciones aeróbicas. En condiciones aeróbicas, la disolución de sulfuro de cobre(II) en cultivos con hierro(II) y hierro(III) iniciales fue 42 % y 55 % respectivamente. La disolución en estos casos fue muy rápida (se obtuvieron los valores máximos en 10 y 8 días respectivamente) y luego permaneció constante<sup>10</sup>. Según se ha discutido previamente, la disolución de sulfuro de cobre no continúa en estos cultivos porque la superficie del sustrato es cubierta por depósitos de hierro(III)<sup>11</sup>. La formación de jarosita en los cultivos con ion hierro(II) inicial es más importante que en los cultivos con hierro(III) ya que la oxidación bacteriana de hierro(II) aumenta el pH (capítulo 2) favoreciendo la precipitación. Además, el ion hierro(II) es principalmente oxidado sobre la superficie del mineral produciéndose la precipitación de jarositas sobre el sustrato<sup>12</sup>.

Bajo condiciones anaeróbicas, la producción de ácido (ecuación 7.2) y la ausencia de oxidación de hierro(II) (ya que en estas condiciones no se puede oxidar), previene

---

<sup>10</sup> Donati E. 1991. “Estudios de los factores químicos y fisicoquímicos en el crecimiento del *Thiobacillus ferrooxidans* y su utilización en la biolixiviación”. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

<sup>11</sup> Curutchet, G., Pogliani, C., Donati, E. and Tedesco, P. 1992. “Effect of iron (III) and its hydrolysis products (jarosites) on *Thiobacillus ferrooxidans* growth and on bacterial leaching”. *Biotechnology Letters* 14, 329-334.



significativamente la producción de jarositas. La solubilización de cobre bajo condiciones anaeróbicas (68 % después de 35 días) fue tan alta como la que se ha obtuvo bajo condiciones aeróbicas sin hierro (71 % después de 40 días).

---

<sup>12</sup>Donati, E., Curutchet, G., Pogliani, C. and Tedesco, P. 1996. "Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*". *Process Biochemistry* 31, 129-134.

### 7.3 CONCLUSIONES

- Se ha demostrado que *Thiobacillus ferrooxidans* es capaz de catalizar la disolución de sulfuro de cobre, aún en condiciones anaeróbicas, siempre que exista hierro(III) presente.
- El mecanismo de acción bacteriana consiste esencialmente en la oxidación del azufre elemental con hierro(III) como aceptor final de electrones, dejando expuesta la superficie del sulfuro de cobre para la continuidad de la acción oxidante del hierro(III).
- La extracción de cobre por este mecanismo es mayor, aunque más lenta, que la encontrada en cultivos aeróbicos con hierro(II) o hierro(III) y similar a la obtenida en cultivos aeróbicos sin hierro.
- Este mecanismo indicaría que la extracción de cobre en las pilas de lixiviación se produce en la zona aeróbica a través de los conocidos mecanismos de acción bacteriana denominados directo e indirecto y que, en la zona por debajo de la superficie, donde la concentración de oxígeno declina rápidamente, la lixiviación bacteriana se produce a través de un mecanismo anaeróbico utilizando el hierro(III) producido en la zonas oxigenadas.

# **CAPÍTULO 8**

**Influencia de exopolímeros en la biolixiviación  
de covelita**

## 8.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 5 se ha comprobado que la adherencia de las células sobre azufre y sobre sulfuro de cobre(II) se ve modificado por la presencia o no de la capa de exopolímeros (EPS) unida a la superficie de las células. De acuerdo a experiencias previas<sup>1</sup>, el ataque bacteriano sobre sulfuros muy poco solubles exige una previa interacción entre la bacteria y la superficie.

Las experiencias con pirita realizadas por Sand W. y colaboradores<sup>2</sup> indican que la habilidad de *Thiobacillus ferrooxidans* para catalizar la lixiviación de pirita, depende de la presencia de los EPS y, además, del hierro(III) contenido. Ellos comprobaron que las células a las que se les eliminó su capa de EPS (deficientes en EPS) producen su material capsular nuevamente en pocas horas; sin embargo, solo comienzan la disolución de la pirita si existe una cantidad mínima de hierro(III) en el medio (por lo menos igual a 0,2 g/l). Estos investigadores concluyeron que el mecanismo directo, estrictamente no existe ya que en todos los casos es necesaria la presencia de hierro. Las supuestas evidencias a favor de la existencia de un mecanismo directo son, según indican en su trabajo, producto de que el hierro presente en los EPS no ha sido extraído<sup>3</sup>.

Sin embargo, algunos resultados previos en este laboratorio<sup>4</sup> prueban, a través de sucesivas generaciones de *T.ferrooxidans* cultivadas en medio sin hierro, que la presencia de hierro no es realmente necesaria para la biolixiviación de covelita. Por otro lado, las experiencias de Sand y colaboradores con pirita podrían estar enmascaradas por una primera oxidación de esta por la adición de ion hierro(III) y una consecuente generación de compuestos intermediarios (ion ferroso, politionatos) que podrían ser usados

---

<sup>1</sup>Pogliani C., Curutchet G., Donati E. and Tedesco P. 1990. "A need for direct contact with particle surfaces in the bacterial oxidation of covellite in the absence of a chemical lixiviant". *Biotechnology Letters* 12 (7), 515-518.

<sup>2</sup>Sand W, Gehrke T, Jozsa P and Schippers A. 1997. "Novel Mechanism for Bioleaching of Metal Sulfides". *International Biohydrometallurgy Symposium IBS 97 Biomine 97*, pp182-188.

<sup>3</sup>Gehrke T, R Hallmann and W Sand. 1995. "Importance of exopolymers from *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* for bioleaching". In: *Biohydrometallurgical processing* (Vargas T, CA Jerez, JV Wiertz. and H Toledo, eds), pp 1-11, University of Chile, Santiago de Chile.

<sup>4</sup>Porro S, S Ramírez, C Reche, G Curutchet, S Alonso and E Donati. 1997. Bacterial attachment: its role in bioleaching processes. *Process Biochemistry* 32, 573-578.

posteriormente por *T. ferrooxidans*<sup>5</sup>. La producción de ion hierro(III) permitiría luego la continuidad de la disolución de pirita.

Debido a estas razones, se considera que resulta indispensable probar los experimentos realizados sobre pirita, utilizando un sustrato como la covelita que no es capaz de aportar hierro.

Por otro lado, sería importante poder evaluar la influencia de la presencia o no de EPS obtenidos a partir de *Thiobacillus ferrooxidans* en la acción de bacterias como *Thiobacillus thiooxidans* que no manifiestan capacidad (a pesar de poseer una maquinaria enzimática similar a de *Thiobacillus ferrooxidans*) de lixiviar directamente a sulfuros muy insolubles<sup>6,7</sup>.

El objetivo de este capítulo fue, entonces, determinar la importancia de los exopolímeros de *Thiobacillus ferrooxidans* en la biolixiviación de covelita sintética. Además, se estudió si las células de *T. thiooxidans* son capaces de lixiviar covelita cuando se adiciona una suspensión de EPS provenientes de *T. ferrooxidans*.

---

<sup>5</sup>Schippers A, P Jozsa and W Sand. 1996. "Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite". Appl Environ Microbiol 62, 3424-3431.

<sup>6</sup>Donati E., Curutchet G, Pogliani C. y Tedesco P. 1996. "Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*". Process Biochemistry, 31 (2)129.

<sup>7</sup>Donati E., Curutchet G., Pogliani C. 1995. "Indirect bioleaching of covellite by *Thiobacillus thiooxidans* in presence of an oxidant agent". Biotechnology Letters. 17 (11), 1251.

## 8.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 8.2.1. Biolixiviación de covelita por *Thiobacillus ferrooxidans* y por *Thiobacillus thiooxidans*. Efecto de la presencia de EPS

#### 8.2.1.1. Descripción experimental

Los sistemas preparados fueron los siguientes:

Frasco	OK	EPS	T.f.	T.f.(defic)	T.t.
A	95 ml	–	5 ml	–	–
B	95 ml	–	–	5 ml	–
C	90 ml	5 ml	–	5 ml	–
D	90 ml	5 ml	5 ml	–	–
E	95 ml	–	–	–	5 ml
F	90 ml	5 ml	–	–	5 ml
G	95 ml	5 ml	–	–	–
H	100 ml	–	–	–	–

EPS: suspensión de EPS previamente extraídos de células de *Thiobacillus ferrooxidans*

T.f.: *Thiobacillus ferrooxidans*. T.f.(defic): *Thiobacillus ferrooxidans* deficientes en EPS (células centrifugadas). T.t.: *Thiobacillus thiooxidans*.

La experiencia se realizó en frascos de 250 ml agitados (180 rpm) y termostatizados (30 °C). A cada uno de ellos se le agregaron 0,2 g de sulfuro de cobre(II) sintético (99% puro, tamaño de partícula < 74 µm, Strem Chemicals Inc.) y 95 ml de medio de cultivo 0 K excepto en los frascos donde se reemplazaron 5 ml del medio por igual volumen de solución de EPS suspendidos en medio 0 K.

Se utilizaron células de *T. ferrooxidans* DSM 11477 previamente cultivadas en medio 9 K<sup>8</sup>. Las células de *Thiobacillus thiooxidans* utilizadas correspondían a la cepa DSM 11478 cultivadas previamente en medio 0K con agregado de 10 g/l de azufre. Los

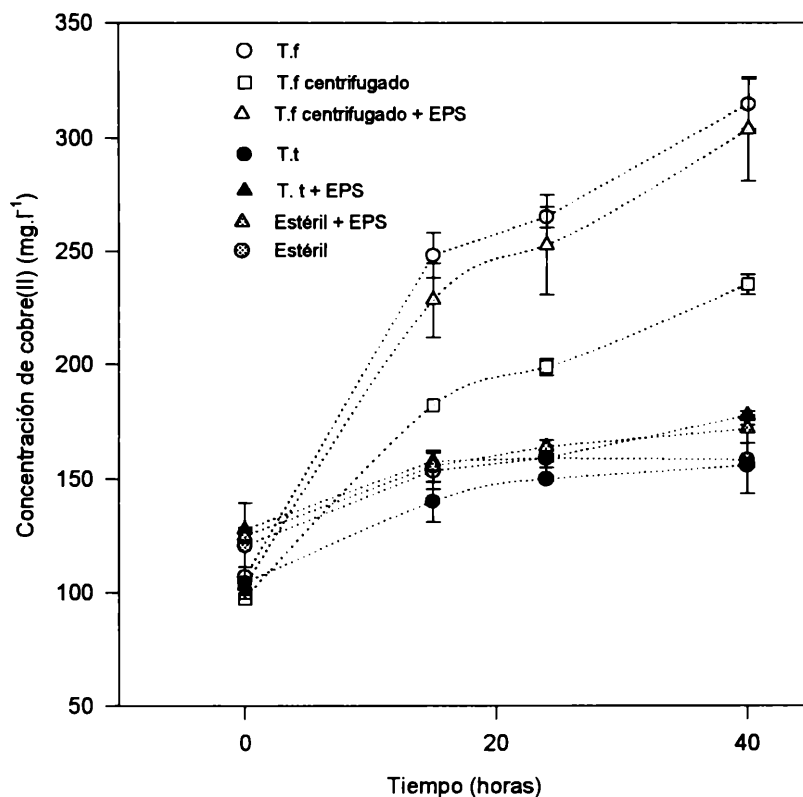
inóculos fueron preparados como se describió en el capítulo 5.2.1.1 (experiencia de adherencia). Todos los sistemas fueron realizados por duplicado. Durante la experiencia se midió cobre(II) en solución por medio de un equipo de absorción atómica y se determinó el número de bacterias por conteo bacteriano por medio de un microscopio con dispositivo de contraste de fase.

La cuantificación de EPS se realizó del mismo modo que el descrito en el capítulo 5 con valores semejantes de glucosa (53 mg de glucosa por  $10^{12}$  células crecidas sobre hierro(II)).

### 8.2.1.2. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 8.1 se ha representado la aparición de cobre(II) en solución en función del tiempo.

FIGURA 8.1. Biolixiviación de sulfuro de cobre(II) con bacterias deficientes en EPS



<sup>8</sup>Silverman, M.P. and Lundgren, D.G. 1959. "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cellular yields". J. Bacteriol. 77, 642-647.

Las células de *Thiobacillus ferrooxidans* no tratadas (que retienen su capa original de EPS) y aquellas tratadas a las cuales se les adicionó la suspensión de EPS antes de la inoculación en los cultivos, oxidan el sulfuro de cobre a velocidad semejante. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en la experiencia de adherencia (capítulo 5.2.1.2) donde se mostró que el agregado de EPS a las células tratadas logra restituir casi completamente la adherencia a la covelita. La pequeña disminución observada entonces en la adherencia, también se manifiesta en la solubilización de cobre que muestra la figura 8.1.

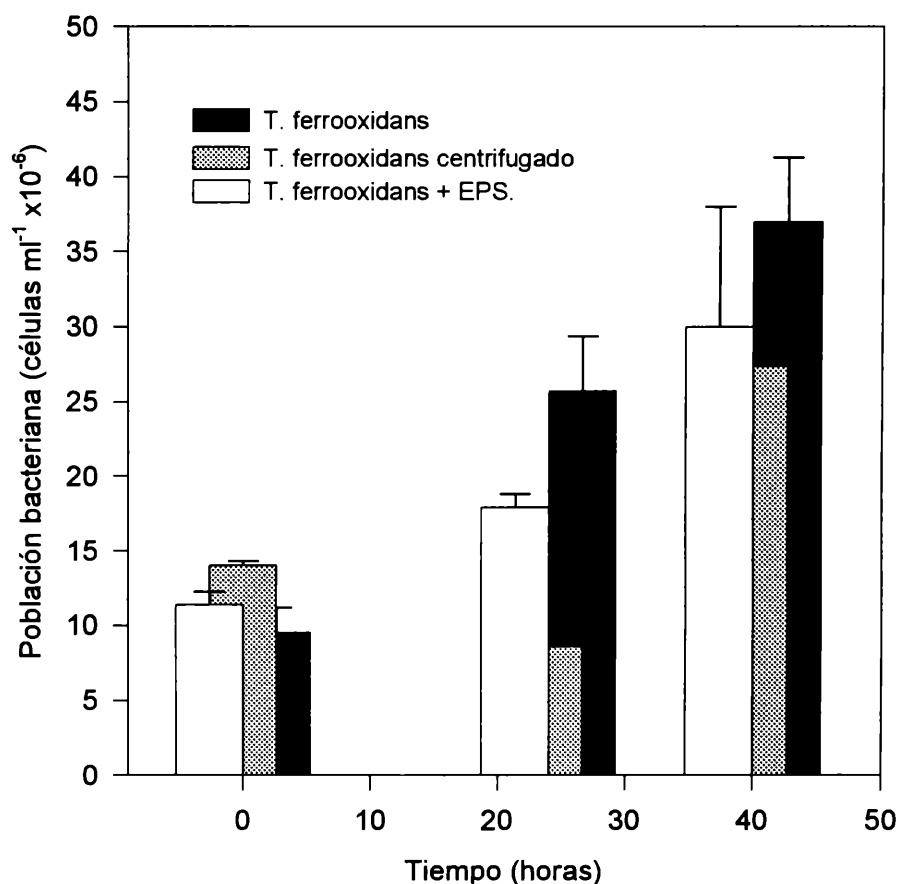
La disolución inicial de cobre en la biolixiviación con células de *T. ferrooxidans* tratadas (células deficientes en EPS) fue menor que para los otros cultivos con *T. ferrooxidans*. Esto puede ser explicado por las diferencias en la adhesión a la covelita. Una correlación lineal (de orden 1 coeficiente de regresión de 0,987) fue hallado entre el porcentaje de adherencia y la velocidad inicial de disolución de cobre calculada en las primeras veinte horas. No obstante después de las primeras veinte horas se encontraron similares velocidades de disolución de cobre indicando que las células producen EPS nuevamente. Estos resultados también muestran una estrecha relación con las conclusiones obtenidas en (5.2.1.2) ya que al no poder adherirse las células al sustrato sólido o hacerlo en una proporción mucho menor (con respecto a las bacterias sin centrifugar) no se produce el ataque o éste se ve disminuido.

El comportamiento del cultivo con células deficientes en EPS a las que se les agregó una suspensión de EPS, permite asegurar que la desaparición de la capa de EPS y/o del tratamiento realizado no alteraron la viabilidad de estas células. Sin embargo, esto fue verificado en forma independiente, inoculando estas células sobre medio 9 K (con hierro(II)) comprobando que no hubo pérdida de velocidad de oxidación de hierro(II) respecto de células no tratadas.

Si tenemos en cuenta el número de bacterias en la solución al comienzo de la experiencia (figura 8.2), el valor hallado para las células deficientes en EPS fue semejante al inóculo y mayor comparado con aquellas células que no fueron tratadas o que siendo tratadas se les adicionó EPS. Esto también concuerda con los resultados obtenidos en 5.2.1.2, ya que la adherencia en las células deficientes en EPS debe ser menor (y, por lo tanto, mayor el número de bacterias en solución). Posteriormente, dentro de las primeras veinte horas de iniciada la experiencia, la cantidad de bacterias libres deficientes en EPS descende, indicando que se está regenerando su capa de EPS y permitiéndoles adherirse



FIGURA 8.2. Población bacteriana en suspensión durante la experiencia de biolixiviación de sulfuro de cobre.



al sustrato. Esto implica una regeneración rápida del material capsular independientemente del hierro (ya que el medio utilizado no lo contenía ni se han agregado los EPS previamente extraídos que podrían haberlo tenido complejado internamente). En los cultivos con células no tratadas o las tratadas y previamente puestas en contacto con la suspensión de EPS, se observa un permanente incremento de la población en suspensión coincidente con el crecimiento bacteriano y con la disolución de sulfuro de cobre (visualizada por el incremento de cobre(II) en solución).

La velocidad de disolución de sulfuro de cobre, en el sistema con células deficientes en EPS, alcanza finalmente el mismo valor que en los otros cultivos confirmando que las células han recuperado un comportamiento absolutamente normal.

En cuanto al comportamiento de las células de *Thiobacillus thiooxidans*, se comprueba una vez más que no son capaces de atacar el sulfuro de cobre (la cantidad de

cobre soluble es similar a los controles estériles). La adición de una suspensión de EPS no afecta esta capacidad y, adicionalmente demuestra que los EPS por sí mismos no son capaces de lixiviar covelita (deberían serlo al menos en una pequeña proporción si contuviesen hierro(III) complejado. En definitiva, los EPS están relacionados solo con la adherencia pero no participan directamente en la biolixiviación de los sulfuros metálicos. Además, la imposibilidad de las células de *Thiobacillus thiooxidans* para lixiviar covelita no está relacionada con la interacción superficie-bacteria sino con algún otro aspecto no dilucidado.

### 8.3. CONCLUSIONES

- Las células de *Thiobacillus ferrooxidans* a las que se les extrajo su capa de EPS no son capaces de lixiviar sulfuro de cobre. La influencia de la presencia de la capa de EPS sobre la biolixiviación es consecuencia de su influencia sobre la adherencia, confirmando una vez más que la biolixiviación de sulfuros muy poco solubles exige previa adherencia bacteriana.
- Al cabo de unas pocas horas, la adherencia y la capacidad biolixivante comienzan a ser normales, por lo que la capa de EPS debe haber sido sintetizada nuevamente.
- La nueva generación de EPS es absolutamente independiente de la presencia de hierro.
- La capa de EPS no produce, por sí misma, ninguna acción lixivante por lo que, probablemente no contiene hierro(III).
- El agregado de EPS provenientes de células de *Thiobacillus ferrooxidans* a células de *Thiobacillus thiooxidans* (no tratadas) no cambia la incapacidad de estas de lixiviar sulfuros muy poco solubles.

# **CAPÍTULO 9**

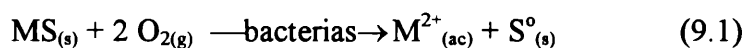
**Biolixiviación directa de algunos minerales  
sulfurados argentinos con agregado de fuentes  
alternativas de energía**

## 9.1. INTRODUCCIÓN

La recuperación de ciertos metales por vía biohidrometalúrgica se ha convertido prácticamente en el único proceso rentable especialmente cuando se trata de minerales de los cuales se recuperan metales de bajo valor en el mercado (Cu, Zn, entre otros), sobre todo si son de muy baja ley<sup>1,2,3,4</sup>.

En la actualidad, la biolixiviación se aplica a nivel industrial en diferentes países del mundo, para la recuperación de cobre, níquel y uranio así como para incrementar las recuperaciones de oro y plata.

Como se ha discutido en el capítulo 1, los principales microorganismos involucrados en estas recuperaciones son *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. Las ecuaciones que describen los procesos más importantes en la interacción de estas bacterias con los minerales sulfurados son las siguientes:



*M representa a un catión bivalente.*

En realidad, el primer proceso no puede ser catalizado por *T. thiooxidans* si el sulfuro es muy poco soluble.

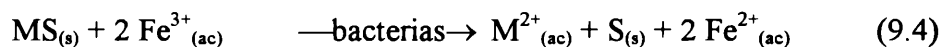
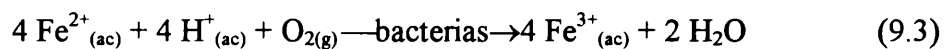
Por otro lado, debido a que normalmente en los minerales sulfurados está presente el hierro, existe la posibilidad de un ataque adicional sobre los sulfuros, en el cual tiene un lugar preponderante *T. ferrooxidans*. Este microorganismo, según se ha visto, cataliza la oxidación de hierro(II) (ecuación 9.3) generando un oxidante en el medio, el ion hierro(III), que puede atacar a los sulfuros facilitando la disolución (ecuación 9.4):

---

<sup>1</sup>Torma, A. 1977. "The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hidrometallurgical processes". Adv. Biochem. Eng. 6, 1-37

<sup>2</sup>Curutchet, G., Donati, E. y Tedesco P. 1992. "Recuperación de cobre de varios minerales argentinos mediante el uso de la biolixiviación". II Jornadas Argentinas de Tratamiento de minerales, La Plata, 139- 141.

<sup>3</sup>Rawlings, D. E. and Woods. 1995. "Mining with Microbes". BioTechnology 13, 773-778.



Este último mecanismo de oxidación puede reciclarse indefinidamente (capítulo 1 página 10). Debido a la posibilidad de más de un tipo de ataque sobre los sulfuros y, especialmente porque este último mecanismo, aparece como potencialmente muy eficaz (dado su carácter cíclico), *T. ferrooxidans* ha sido el microorganismo más utilizado en los estudios sobre biolixiviación.

Sin embargo en un trabajo reciente<sup>5</sup>, se comprobó que, en ciertas condiciones (en particular si hay hierro presente), *T. thiooxidans* permite una mayor recuperación de cobre que *T. ferrooxidans*.

El objetivo de este capítulo es comprobar si los resultados obtenidos en dicho trabajo para sistemas modelo (sulfuros puros) puede extrapolarse a un sistema complejo como un mineral. Los estudios realizados fueron dirigidos a analizar la posible acción cooperativa de ambas especies de *Thiobacillus* y la influencia de la presencia de alguna fuente alternativa de energía durante la recuperación metálica en lixiviaciones directas. Esta acción puede tener lugar aún con el uso de la metodología de las bio-películas, a través de las bacterias que no quedaran adheridas al soporte

En el marco de lo anteriormente mencionado, se discutirán los resultados obtenidos en biolixiviaciones realizadas con varios minerales sulfurados argentinos utilizando *T. ferrooxidans* o *T. thiooxidans*, con y sin agregado inicial de hierro (II) o hierro(III). Sobre la base de los resultados obtenidos, se diseñaron estrategias para la recuperación de metales utilizando una metodología más fácilmente asociable a técnicas de biolixiviación a nivel industrial.

---

<sup>4</sup>Agate, D. A. 1996. "Recent Advances in Microbial Mining". World Journal of Microbiology and Biotechnology 12, 487-495.

<sup>5</sup>Donati, E. Curutchet, G., Pogliani, C. y Tedesco, P. 1996. "Bioleaching of covellite using pure and mixed cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*. and *Thiobacillus thiooxidans*". Process Biochemistry 31, 129-134.

## 9.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### **Biolixiviación de minerales argentinos a nivel de frascos agitados empleando *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* con agregado de fuentes alternativas de energía**

#### 9.2.1. Descripción experimental

Se trabajó con minerales de baja ley procedentes de tres yacimientos argentinos con las siguientes características:

- Pachón: este yacimiento de cobre porfirico, probablemente el de mayor reserva en el país, se halla situado en el valle del mismo nombre, sobre la cordillera del límite con Chile, en la provincia de San Juan (República Argentina) a una altura de 3600 a 3900 m sobre el nivel del mar. El área en consideración está integrada por una secuencia volcánica estratificada suavemente plegada que define dos zonas. Una de ellas es la formación Pachón compuesta por una secuencia de volcanitas porfirínicas y afanitas andesíticas<sup>6</sup>, que se denominará en adelante *Andesita*. Esta zona descansa sobre un conjunto de sedimentos jurásicos fuertemente plegados y estos a su vez, sobre un basamento representado por granitos y pórfidos de cuarzo; esta zona representa la formación Choyoi, que la constituyen varios plutones de naturaleza diorítica-granodiorítica<sup>6</sup> que denominaremos en adelante *Diorita*. El yacimiento de cobre porfirínico Pachón, orientado en su eje mayor ONO-ESE, tiene una longitud de 1950 m y un ancho de 1500 m. Su superficie mineralizada, dentro del "cut off" de 0,3 % Cu, es de 2,3 Km<sup>2</sup> <sup>7</sup>.
- Bajo La Alumbra: el mineral procedente de este yacimiento fue descrito en el capítulo 2.
- Capillitas. Este mineral pertenece al yacimiento de Capillitas, situado en la sierra del mismo nombre en la provincia de Catamarca (República Argentina). Las reservas probables alcanzan la cifra de 387x10<sup>3</sup> toneladas con leyes medias de 2,6 g/t de Au, 108 g/t de Ag, 2,32 % de Cu, 1,62 % de Pb y 3,1 % de Zn. El mineral utilizado para

---

<sup>6</sup> Dana E - Hurlbut C. 1972. Manual de Mineralogía 2da edición. Editorial Reverté. 510-518.

<sup>7</sup> Angelelli, V. 1984. "Yacimientos metalíferos de la República Argentina". C.I.C. Tomo I, 188-189.

estos ensayos procedió de las vetas *9 de Julio* y *25 de Mayo*, compuestas principalmente por pirita, esfalerita (ZnS), galena (ZnS) y calcopirita (FeCuS<sub>2</sub>)<sup>8</sup>.

Después del molido y cuarteado de los minerales, se procedió a determinar el contenido de cobre, hierro y cinc. Para ello se realizó un ataque en caliente (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado + HNO<sub>3</sub> concentrado a ebullición suave), determinándose posteriormente los iones metálicos en los lixiviados por absorción atómica. Los resultados obtenidos están descriptos en la tabla 9.1:

TABLA 9.1. Contenido de cobre, hierro y cinc de los distintos minerales

Procedencia del mineral	Pachón Andesita	Bajo La Alumbraera	Capillitas	Pachón Diorita
% Cu	0,40	1,25	1,49	1,05
% Zn	0,045	0,035	10,0	0,37
% Fe	4,00	6,99	9,20	1,40

Estos valores responden a las concentraciones medias indicadas anteriormente y los porcentajes de recuperación se realizaron sobre la base de los mismos

Las experiencias de biolixiviación se realizaron en frascos agitados (180 rpm) y termostatizados a 30 °C. En los frascos se agregaron 150 ml de medio y mineral suficiente para alcanzar una densidad de pulpa del 5 % p/v. El mineral fue previamente molido hasta un tamaño de partícula menor a 200 mesh; para eliminar posibles especies microbianas nativas, el mineral fue esterilizado en microondas en tres ciclos consecutivos.

Para cada uno de los minerales, se prepararon 9 sistemas distintos: tres inoculados con *Thiobacillus thiooxidans*, otros tres inoculados con *Thiobacillus ferrooxidans* y otros tres estériles.

De los tres de cada serie, uno contenía medio 0 K, otro 6 K (hierro (II)) y el tercero 6 K (hierro (III)), todos a pH inicial igual a 1,8.

<sup>8</sup>Porro, S. Boiardi, J. L. y Tedesco, P. H. 1988. "Biolixiviación de minerales argentinos de cobre". Rev.



Los inóculos fueron preparados del modo que fue descrito previamente: *T. ferrooxidans* fue previamente cultivado en medio 9 K, cosechado al final de fase exponencial de crecimiento (95 % de consumo de hierro(II)), filtrado por papel banda azul (S & S Runderfilter) para retener jarositas, posteriormente filtrado a través de filtros de 0,2 µm y finalmente suspendidas en medio 0 K de pH igual a 1,8; *T. thiooxidans* fue previamente cultivado en medio 0 K con azufre elemental como fuente de energía, filtrado por papel banda azul para separar el azufre, centrifugado a 4500 rpm durante 20 minutos y finalmente suspendido en medio 0 K de pH igual 1,8. En ambos casos las poblaciones finales en el inóculo fueron de  $7,5 \times 10^7$  bacterias.ml<sup>-1</sup>. Todos los cultivos fueron inoculados al 10 % v/v.

Los sistemas estériles fueron preparados de modo semejante a los cultivos, excepto que el inóculo fue reemplazado por igual volumen de medio de cultivo estéril.

Durante la experiencia se midió cobre(II), hierro total soluble y cinc(II) con un equipo de absorción atómica. El consumo de hierro(II) se siguió mediante titulación con una solución valorada de MnO<sub>4</sub>K. El pH fue medido con un equipo Altronix.

También se realizaron controles para detectar posibles contaminaciones. Para ello, se tomó una muestra de los cultivos con *T. thiooxidans* y se inoculó un sistema con medio 9 K; la ausencia de oxidación de hierro(II) en el término de 1 semana fue señal de ausencia de contaminación con *T. ferrooxidans*. Para detectar posibles contaminaciones con *T. thiooxidans* de los cultivos de *T. ferrooxidans*, se sembraron en medio sólido de Waskman<sup>9</sup> (indicado para el desarrollo de *T. thiooxidans*) 0.5 ml de los cultivos que contenían *Thiobacillus ferrooxidans*, previamente filtrado por papel banda azul (S & S Runderfilter) estéril. Como este medio contiene agar, *T. ferrooxidans* no desarrolla. Las cajas por triplicado fueron incubadas a 30 °C. No se observó desarrollo bacteriano hasta diez días después de terminada la experiencia. Mientras que un testigo positivo desarrolló en cuatro días. Las colonias de *Thiobacillus thiooxidans* sobre la placa de agar se observan como diminutos puntos redondos (0.5 a 1 mm de diámetro) brillantes y transparentes.

---

Metal. Madrid 24, 297-302.

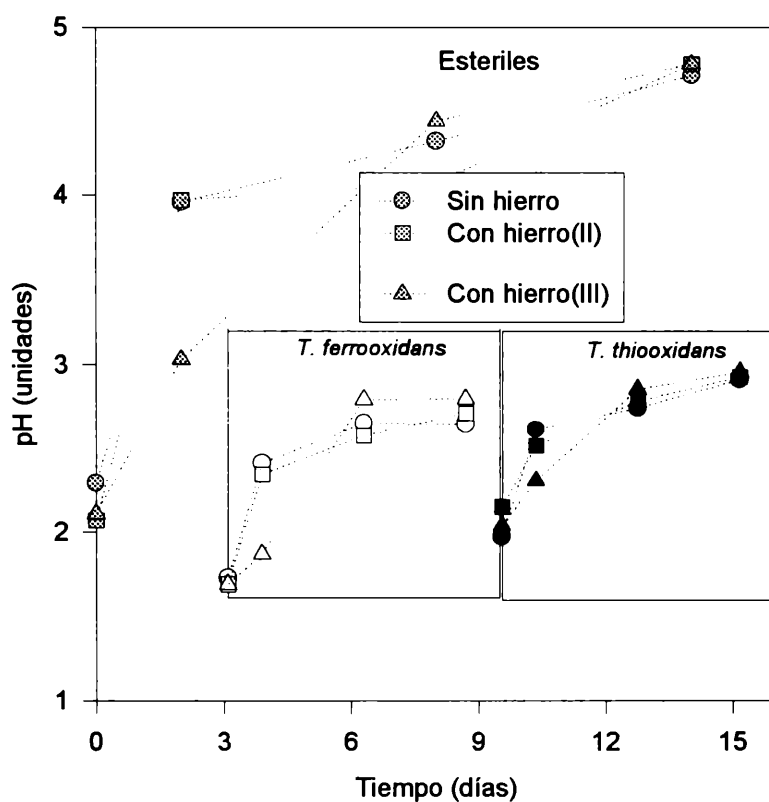
<sup>9</sup> Karavaiko G. I. 1988. In: "Biotechnology of metals" Karavaiko G. I. Rossi G. Agate A. Groudev S. N. and Avakyan Z. A. Editors. pag. 50, Moscow.

## 9.2.2. Discusión de los resultados experimentales

### 9.2.2.1. Mineral de Capillitas

Este mineral tuvo un comportamiento lo suficientemente particular como para ser tratado en primer término. En la figura 9.1 se muestra la evolución del pH en los sistemas estériles (figura externa) notándose un rápido incremento hasta valores cercanos a 5.

FIGURA 9.1. Evolución del pH en los sistemas de lixiviación del mineral de Capillitas

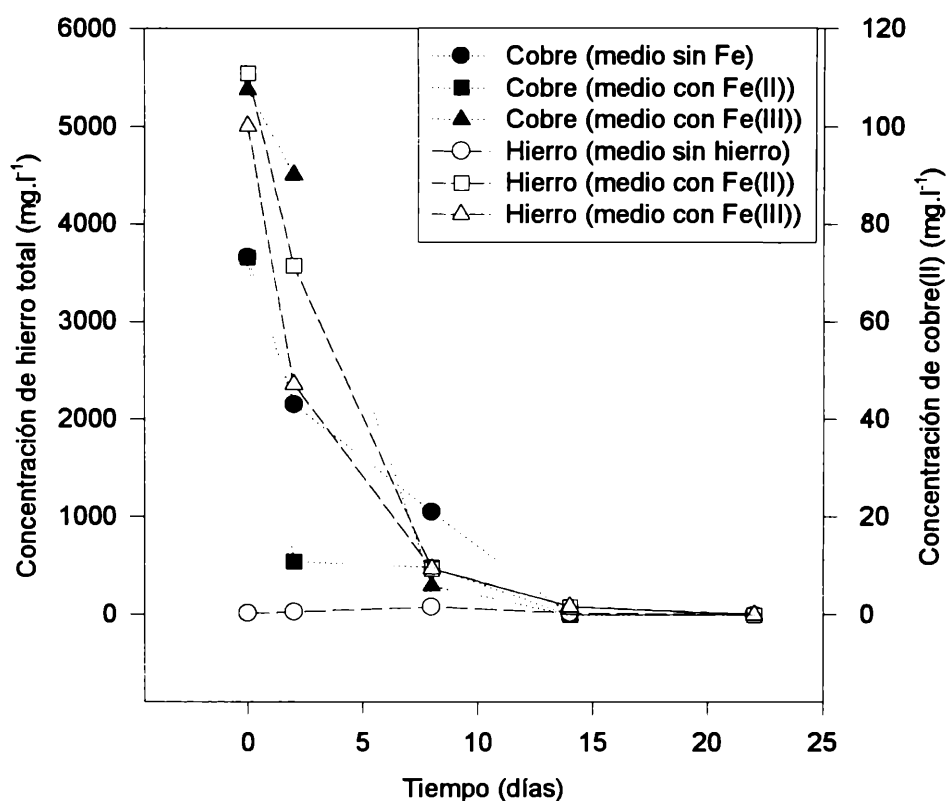


Este incremento puede ser explicado por la alta cantidad de carbonatos presentes en el mineral (como puede observarse en el capítulo 13). Los sistemas inoculados tuvieron un comportamiento absolutamente semejante tal cual muestran las dos figuras internas. Este comportamiento fue casi independiente de la presencia inicial de hierro

agregado externamente; en los sistemas con hierro(III), el ascenso del pH es algo más lento producto de la hidrólisis del hierro(III).

Este inmediato aumento de pH impidió el desarrollo bacteriano independientemente de la especie inoculada. También provocó la ausencia de cobre(II) en solución. Incluso la pequeña cantidad de cobre disuelta inicialmente por la acidez del medio fue rápidamente precipitada. Esto se muestra en la figura 9.2 junto con la evolución del hierro en solución.

FIGURA 9.2. Evolución de hierro y cobre en solución durante la lixiviación del mineral de Capillitas



La figura anterior corresponde al comportamiento en los sistemas independientemente de que estuvieran inoculados o fueran estériles. Estos resultados muestran que este mineral no puede ser sometido a biolixiviación sin un tratamiento ácido previo.

### 9.2.2.2. Minerales de Bajo La Alumbarrera y Pachón (andesita y diorita)

En la tabla 9.2 se muestran los porcentajes finales para la extracción de cobre y cinc obtenidos en las lixiviaciones del mineral de Bajo La Alumbarrera (luego de 35 días), Andesita (luego de 14 días) y Diorita (luego de 32 días). Las experiencias para cada mineral se detuvieron cuando las concentraciones de los metales en solución alcanzaron un valor prácticamente constante.

TABLA 9.2. Porcentajes de extracción de cobre y cinc en las biolixiviaciones de los minerales: Bajo La Alumbarrera, Pachón (andesita) y Pachón (diorita)

	Bajo La Alumbarrera		Pachón (andesita)		Pachón (diorita)	
	% Cu	% Zn	% Cu	% Zn	% Cu	% Zn
<i>T.t.</i> (s/Fe inicial)	46	44	39	9	52	55
<i>T.t.</i> (c/Fe(II) inicial)	87	50	91	16	53	62
<i>T.t.</i> (c/Fe(III) inicial)	68	67	95	19	58	72
<i>T.f.</i> (s/Fe inicial)	73	50	91	16	67	52
<i>T.f.</i> (c/Fe(II) inicial)	71	72	85	21	62	71
<i>T.f.</i> (c/Fe(III) inicial)	68	89	85	25	65	61
Est.(s/Fe inicial)	30	7	28	8	14	25
Est.(c/Fe(II) inicial)	35	8	50	8	16	23
Est.(c/Fe(III) inicial)	41	6	50	17	20	32

*T.f.*: *T. ferrooxidans*.      *T.t.*: *T. thiooxidans*

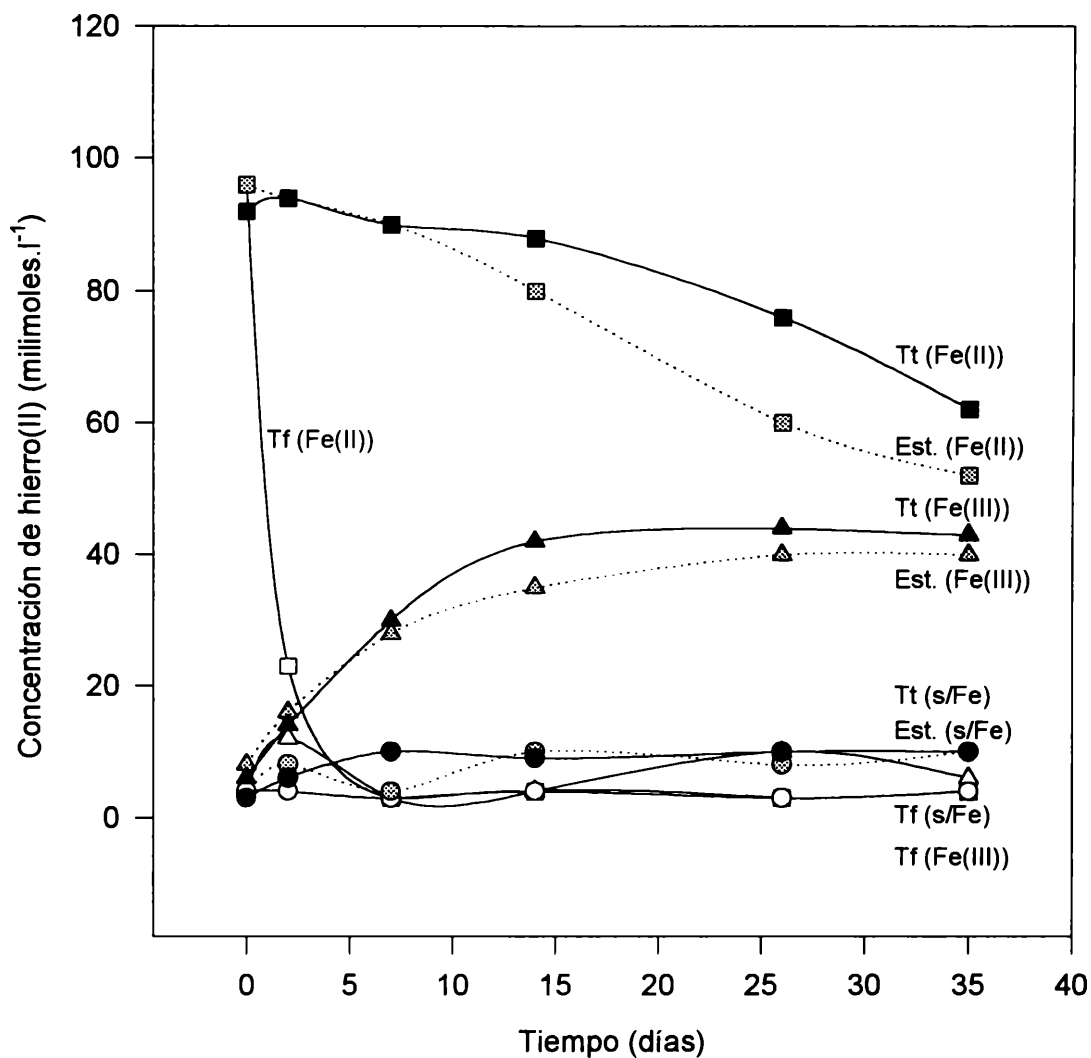
En la tabla, se observa que, para cada condición, siempre los cultivos tuvieron una extracción mayor que los estériles correspondientes, confirmando que la metodología de la biolixiviación es aplicable, en principio, para su aplicación sobre estos minerales en la recuperación de cobre y cinc

En los resultados obtenidos para Bajo La Alumbarrera (en forma semejante a lo comprobado previamente para un sulfuro puro<sup>5</sup>) la extracción de cobre en los sistemas

con *Thiobacillus thiooxidans* es muy importante e incluso mayor a la extracción con *Thiobacillus ferrooxidans* cuando el hierro está presente.

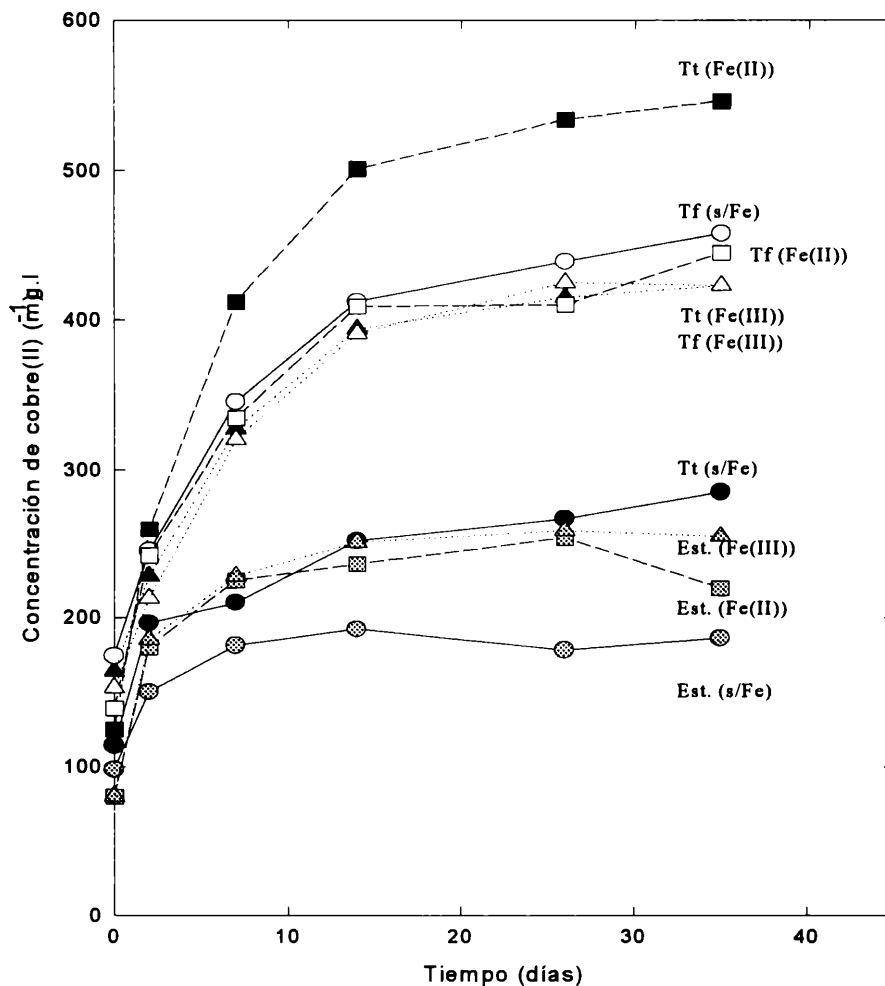
En los sistemas con hierro (II) inoculados (figura 9.3) con *T. ferrooxidans* se observó una rápida oxidación del mismo, mientras que la evolución del hierro(II) en los cultivos con *T. thiooxidans* fue muy similar a la observada en los controles estériles. Esto confirma que la pequeña oxidación observada se debe esencialmente a la oxidación química por el oxígeno del aire, es decir, no hubo contaminaciones con *T. ferrooxidans*. Más aún, desde los siete días se observa que el descenso de la concentración del hierro(II) en el estéril es incluso mayor a la del cultivo con *T. thiooxidans*.

FIGURA 9.3. Evolución de la concentración de hierro(II) durante el transcurso de la experiencia de lixiviación para el mineral de Bajo La Alumbraera



La evolución de la concentración de cobre(II) en solución para todos los sistemas puede observarse en la figura 9.4.

FIGURA 9.4. Extracción de Cobre(II) en las lixiviaciones del mineral de Bajo La Alumbra



El comportamiento de los cultivos sin hierro es el esperado teniendo en cuenta que solo *T. ferrooxidans* es capaz de oxidar sulfuros muy poco solubles por mecanismo directo. El cultivo con *T. thiooxidans* se comporta igual que los estériles con hierro, extrayendo incluso algo más hacia el final de la experiencia, debido tal vez a la liberación de hierro del mineral que pudo habilitar algún mecanismo similar al que ocurre en presencia de este elemento.

En los cultivos de *T. ferrooxidans* y de *T. thiooxidans* con hierro(III) y de *T. ferrooxidans* con hierro(II), la evolución de cobre en solución es semejante. Estos

resultados sugieren que el mecanismo de extracción en los tres casos, es similar e independiente de las características diferenciales entre ambas bacterias. Es decir, la extracción no está relacionada seguramente con el mecanismo directo (solo habilitado para *T. ferrooxidans*) ni con el mecanismo indirecto clásico (oxidación de hierro(II) y posterior ataque de hierro(III) sobre el sulfuro, que es también exclusivo del *T. ferrooxidans*).

La extracción en el cultivo con *T. thiooxidans* en presencia de hierro(II) es claramente superior a la de todos los sistemas y es, en principio, difícil de explicar. Sin embargo, todos los comportamientos observados para la biolixiviación de este mineral se corresponden exactamente con lo reportado sobre sulfuro de cobre (según referencia indicada previamente). En dicho trabajo, donde se utilizó un sistema mucho menos complejo (un sulfuro puro), fue posible deducir el mecanismo por el cual, una bacteria como *T. thiooxidans*, incapaz de oxidar hierro, logra una extracción elevada en su presencia. El mecanismo indirecto propuesto y comprobado entonces, y que ajusta perfectamente también en este caso, es el siguiente:

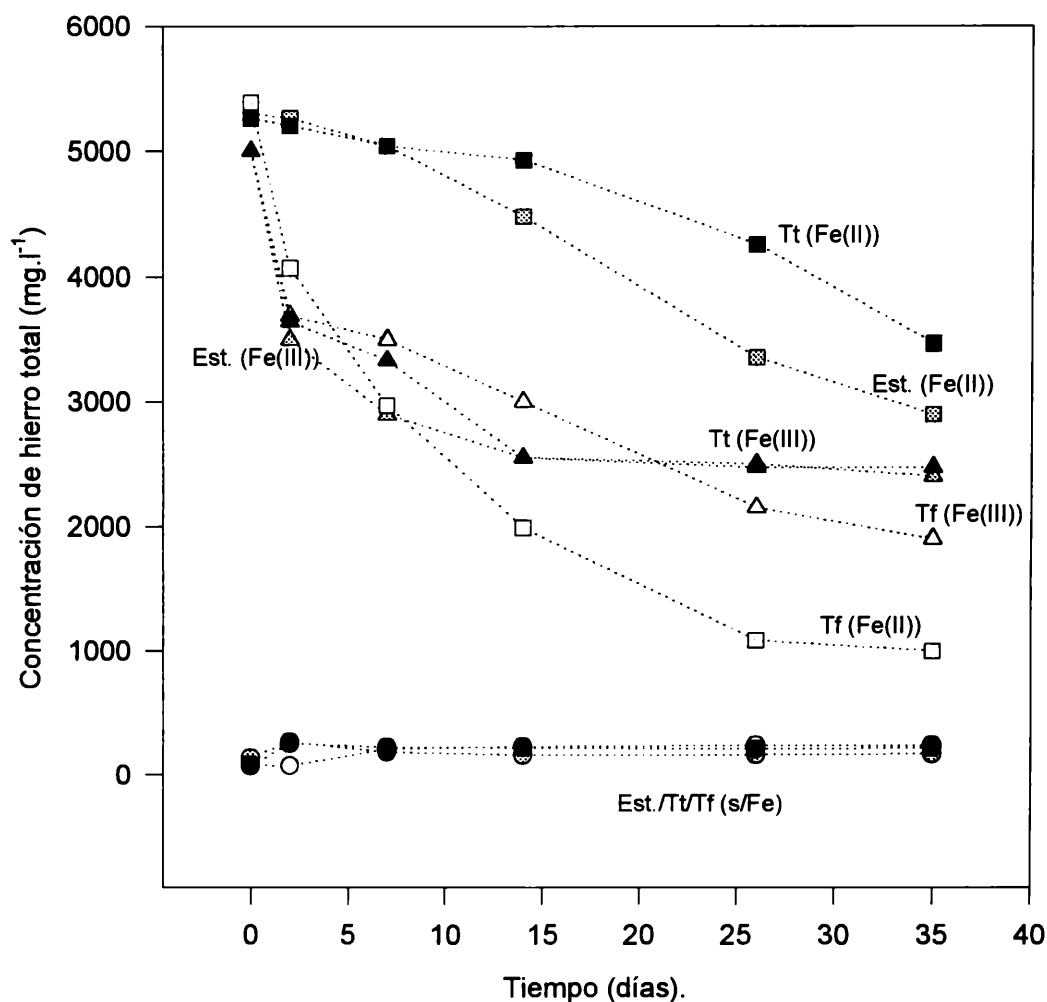
- a) Lenta oxidación del hierro por el oxígeno del aire (similar a la del estéril).
- b) Ataque químico del hierro(III) formado sobre el sulfuro (similar a la del estéril).
- c) Disolución de la capa de azufre formada por el proceso anterior por oxidación aeróbica catalizada por la bacteria (es demasiado lenta en el estéril).
- d) Continuidad del ataque del hierro(III) sobre el sulfuro.

Este mecanismo podría ser producido, en principio, también por *T. ferrooxidans*, pero la rápida oxidación del hierro(II) y el consecuente depósito de jarosita sobre el mineral, detienen relativamente pronto la etapa c) y, consecuentemente, la etapa d). Algo semejante ocurre en ambos cultivos con hierro(III) inicial; la mayor extracción observada en ellos respecto del control respectivo, confirma que está ocurriendo el mecanismo propuesto (aunque seguramente en menor medida que en el cultivo de *T. thiooxidans* con hierro(II)). La similitud de extracción en los cultivos de ambas bacterias, sugiere una muy baja influencia del mecanismo indirecto cíclico (página10).

El papel atribuido a los depósitos de hierro queda evidenciado en la figura 9.5.

La extracción de cinc aumenta en forma progresiva a medida que colocamos hierro y es muy superior a los estériles. En este caso, los cultivos de *T. ferrooxidans* logran extracciones mayores que los cultivos de *T. thiooxidans*.

FIGURA 9.5. Evolución del hierro total durante las lixiviaciones del mineral de Bajo La Alumbraera



Para el mineral de Pachón (andesita) se registró el mayor porcentaje de extracción (superior al 90 %), indicando presencia de especies de cobre más fácilmente biolixiviables. El comportamiento de los diferentes sistemas sigue las líneas generales que se vieron en las lixiviaciones de Bajo La Alumbraera, aunque por ser la extracción de cobre más rápida y prácticamente completa,

En los estudios con muestras de andesita, el comportamiento es semejante a lo observado para las muestras procedentes de Bajo La Alumbraera, aunque los mecanismos claramente evidenciados en este último caso, han quedado enmascarados porque la extracción de cobre es prácticamente total y en un tiempo más corto. Esto se puede ver en la figura 9.6.



FIGURA 9.7. Evolución de la concentración de cobre(II) durante las lixiviaciones del mineral de Pachón (diorita)

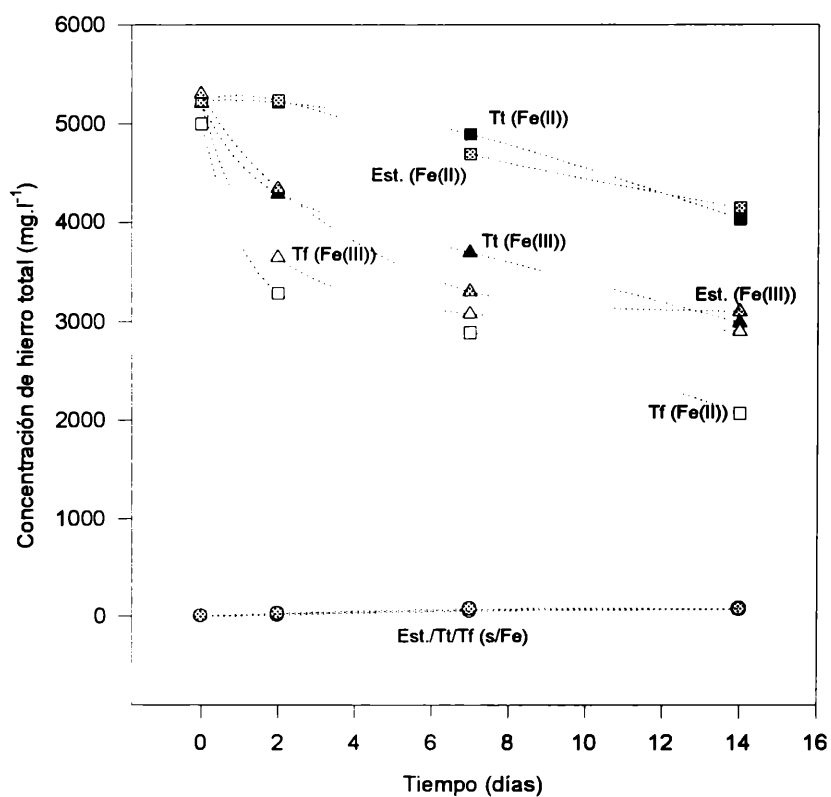


FIGURA 9.8. Evolución del pH en las lixiviaciones del mineral de Pachón (andesita)

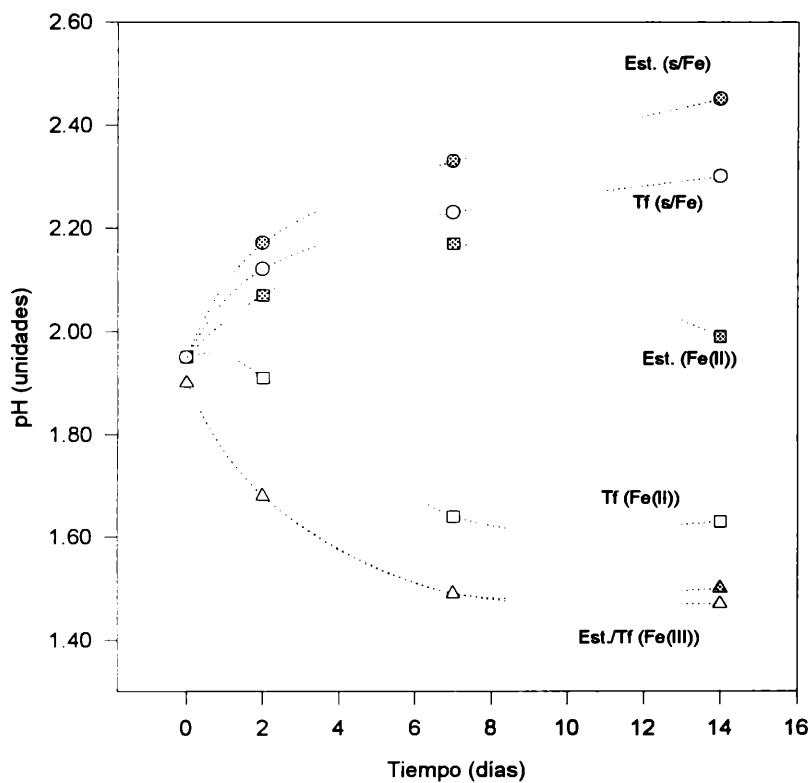
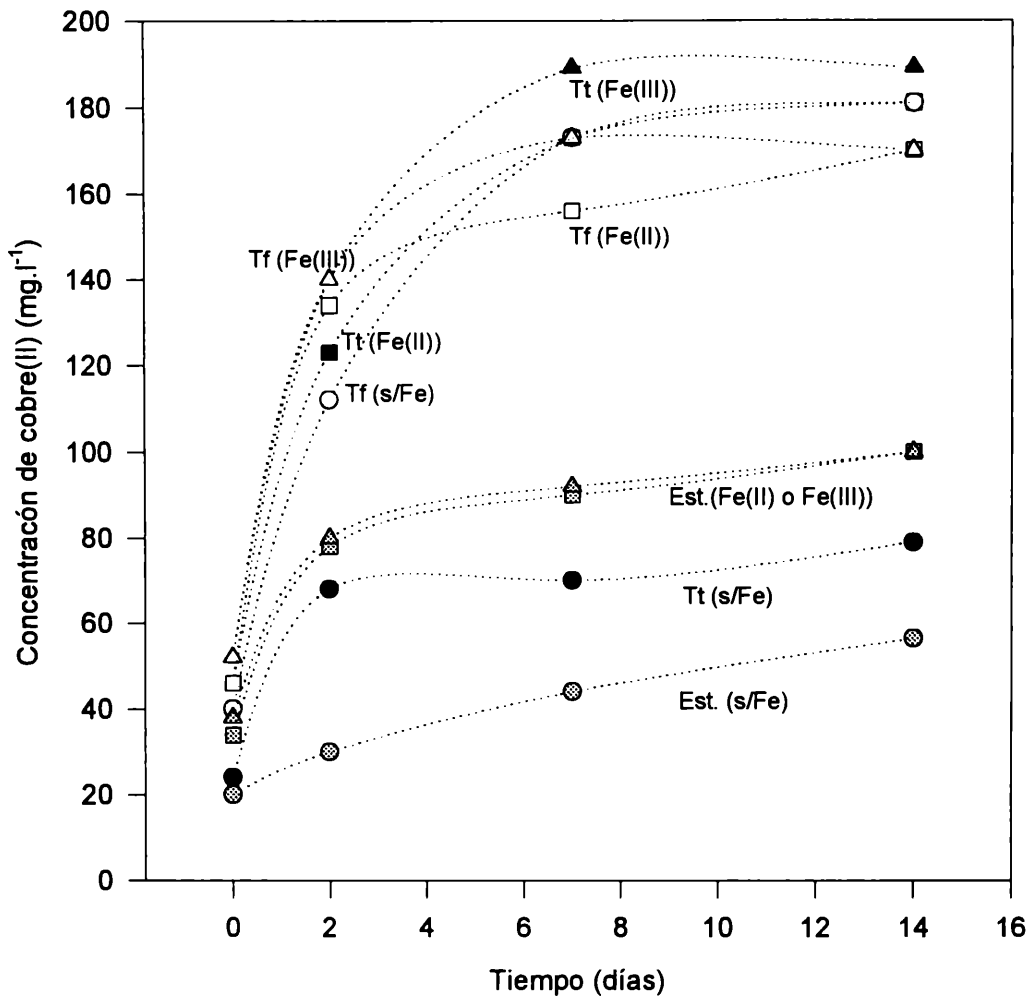


FIGURA 9.6. Evolución de la concentración de cobre(II) en las lixiviaciones del mineral de Pachón (andesita)



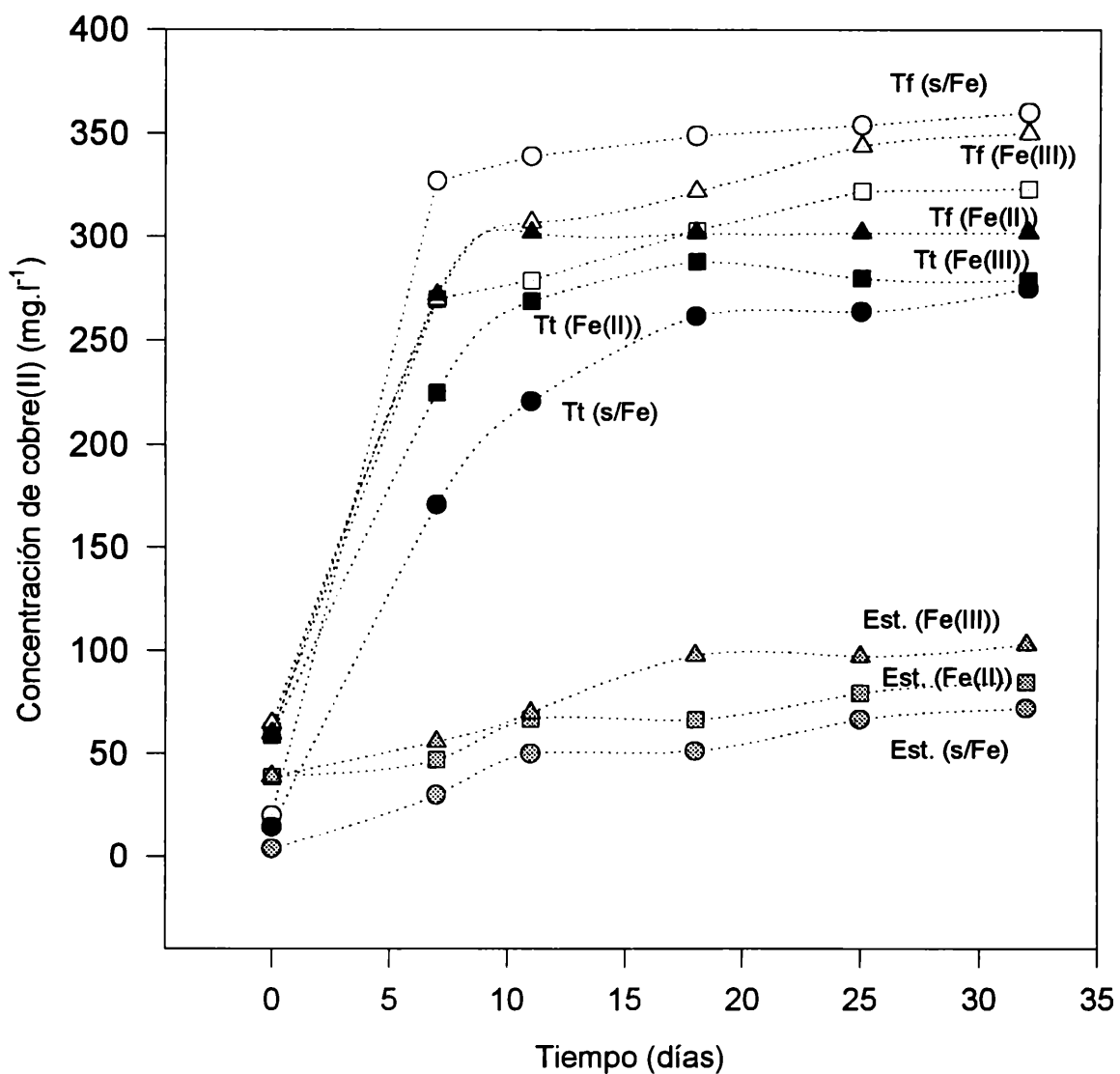
En este caso, y a diferencia de lo observado para Bajo La Alumbraera, es el cultivo de *T. thiooxidans* con hierro(III), el de mayor extracción. Esta diferencia puede estar relacionada con la menor precipitación de hierro(III), producto del menor contenido de hierro del mineral y del menor tiempo de lixiviación necesario para alcanzar altas extracciones de cobre, que puede observarse en la figura 9.7. Debe observarse que en los cultivos con *T. ferrooxidans* siempre se produce mayor cantidad de depósitos. En cambio, los cultivos con *T. thiooxidans*, la evolución del hierro soluble es semejante a la de los controles estériles.

La evolución de la concentración de hierro en solución concuerda con la evolución del pH en los sistemas (figura 9.8).

Solo en los sistemas sin hierro (tanto estériles como inoculados) se observa un incremento en el pH, ocasionado por el ataque ácido sobre el mineral. La extracción de cinc fue prácticamente insignificante; esto sugiere una especie mineralógica de cinc refractaria al ataque bacteriano, diferente a la de los otros minerales y que no pudo ser identificada por difracción de rayos X.

En la figura 9.9 se muestra la evolución de cobre(II) en solución durante las lixiviaciones del mineral de Pachón (diorita).

FIGURA 9.9. Evolución de la concentración de cobre(II) durante las lixiviaciones del mineral de Pachón (diorita)



Para este mineral, se ha comprobado una mayor extracción en el caso de *T. ferrooxidans* sin hierro, aunque solo apenas superior a la encontrada para todos los otros cultivos, incluso el de *T. thiooxidans* sin hierro. Una posible explicación a esta observación, es la disolución de hierro del mineral que, en realidad, provocó que todos los sistemas contasen con hierro presente. De este modo, si bien todos contaban con hierro presente, los sistemas con agregado externo tenían mayor posibilidad de formación de depósitos de hierro(III) lo cual detendría el proceso de biolixiviación. Las figuras 9.10 (de hierro(II)) y 9.11 (de hierro total) confirman estas presunciones: significativa concentración de hierro en solución para los sistemas sin hierro externo.

FIGURA 9.10. Evolución de la concentración de hierro(II) en las lixiviaciones del mineral de Pachón (diorita)

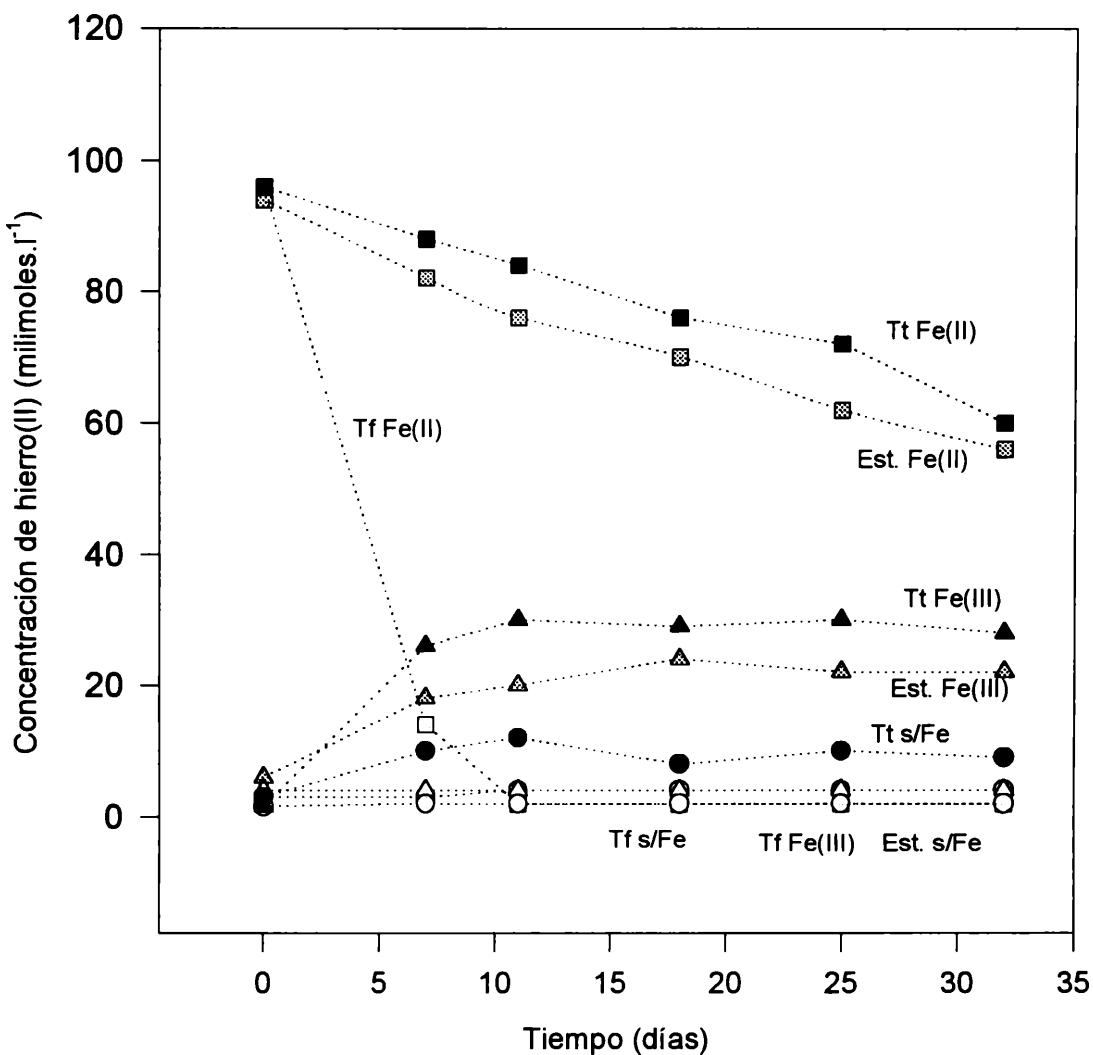
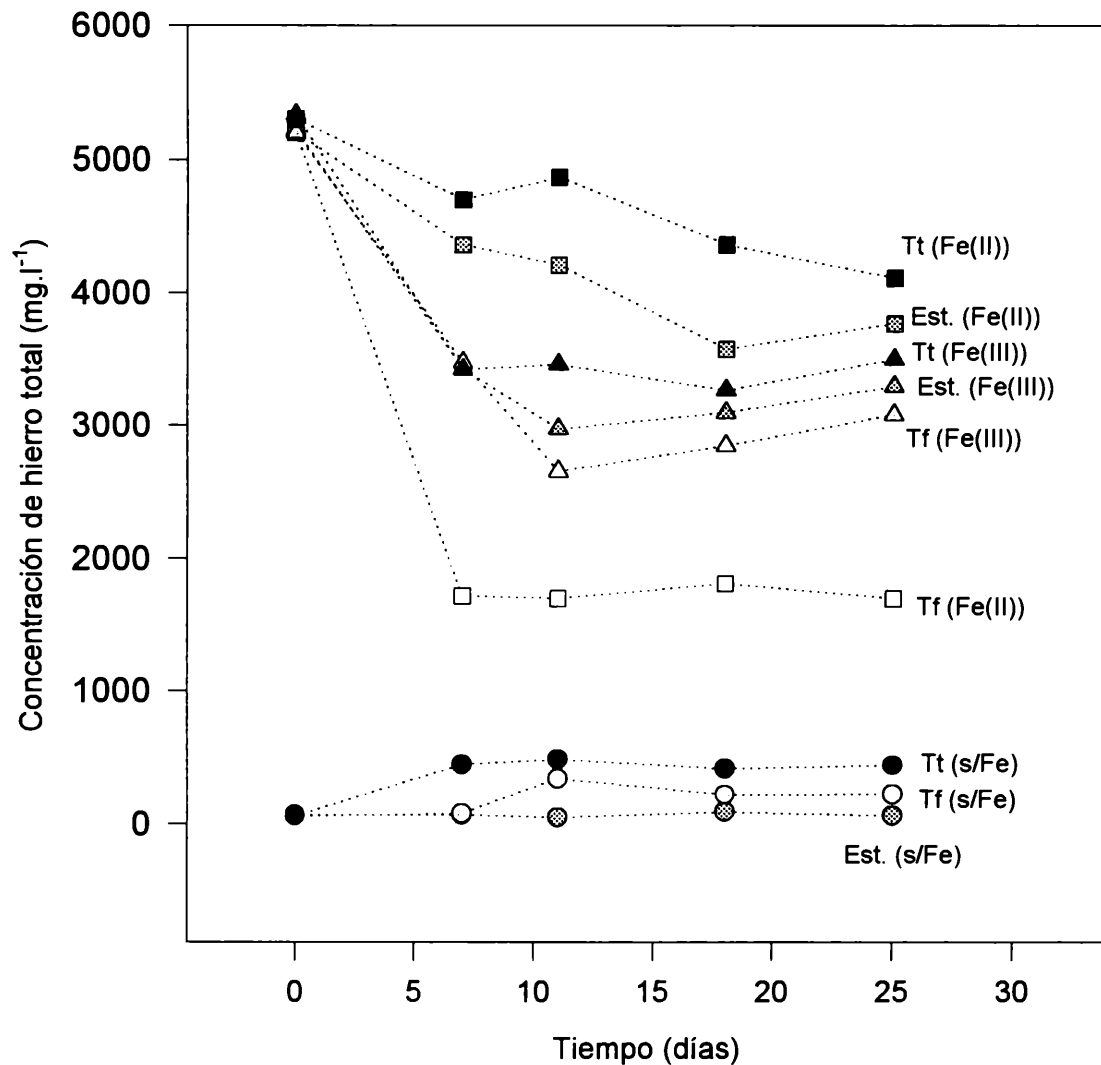


FIGURA 9.11 Evolución de la concentración de hierro total en las lixiviaciones del mineral de Pachón (diorita)



Por otro lado, es poco probable que la alta extracción de *T. ferrooxidans* en ausencia de hierro externo, sea debido a una participación importante del mecanismo directo ya que también el cultivo con *T. thiooxidans* (que no puede establecer este mecanismo para sulfuros muy insolubles) extrajo apreciablemente.

La extracción de cinc para este mineral fue sustancialmente mayor a la observada para los otros minerales, aun para los sistemas estériles. Seguramente, esto obedece a la existencia de alguna especie fácilmente lixiviable, probablemente, wurzita o esfalerita, (la composición química de ambas corresponde al ZnS) en el mineral aunque esto no pudo ser confirmado por difracción de rayos X.

### 9.3. CONCLUSIONES

- El mineral de Capillitas no puede ser lixiviado sin un previo tratamiento ácido para neutralizar las especies básicas.
- Hubo una extracción importante de cobre y cinc en las biolixiviaciones de los minerales de Bajo La Alumbreira y Pachón (andesita y diorita). La extracción mayor de cobre, en términos de porcentaje, se encontró para el mineral de Pachón (andesita), mientras que la mayor extracción de cinc, también en términos de porcentaje, se determinó para el mineral de Pachón (diorita).

- Los resultados encontrados para Bajo La Alumbreira y, en menor medida, para Pachón (andesita) responden a lo esperado de acuerdo a biolixiviaciones realizadas en sistemas modelo (sulfuro de cobre puro):

A pesar de la ineficacia de las células de *T. thiooxidans* para atacar sulfuros muy poco solubles, la extracción de los cultivos de esta bacteria en presencia de hierro es muy grande e, incluso, superior a la detectada en cultivos de *T. ferrooxidans*. Esto puede explicarse por un mecanismo indirecto donde la bacteria tan solo “limpia” la superficie oxidando el azufre depositado y permitiendo la continuidad de la oxidación química del hierro(III) sobre el sulfuro. La menor extracción en los sistemas con *T. ferrooxidans* obedece a una mayor precipitación de jarosita sobre el mineral.

- En el mineral de Pachón (diorita) debido probablemente a una mayor disolución de hierro por parte del medio, todos los cultivos actúan como si tuviesen hierro, por lo que se detecta una importante disolución en el cultivo con *T. thiooxidans* en ausencia de hierro. Además, debido a que los sistemas con hierro externo agregado tienen mayor precipitación, es el cultivo con *T. ferrooxidans* en “ausencia” de hierro el que presenta mayor extracción de cobre.

# **CAPÍTULO 10**

Preparación de reactores con células de  
*Thiobacillus ferrooxidans* inmovilizadas sobre  
diferentes soportes

## 10.1. INTRODUCCIÓN

El hierro(III) en forma soluble es uno de los agentes oxidantes más importantes en la lixiviación química de minerales. Es posible obtener grandes volúmenes de soluciones de elevadas concentraciones de hierro(III), de modo económico, a partir de la oxidación bacteriana de hierro(II). Debido a que la velocidad de oxidación de este ion en el caso de bacterias suspendidas es relativamente baja<sup>1</sup>, la producción continua requiere altos tiempos de residencias y grandes volúmenes de reactores, que implican una alta inversión y altos costos de operación. La natural tendencia de *T. ferrooxidans* a crecer sobre superficies, lo convierte en microorganismo ideal para su inmovilización. De este modo puede incrementarse el número de células respecto del que puede alcanzarse en medio líquido y, consecuentemente, puede incrementarse la velocidad de producción de hierro(III)<sup>2</sup>. De hecho así lo han realizado previamente otros investigadores utilizando células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre distintos soportes y en variadas condiciones.

Por otro lado, en la metodología de biolixiviación habitualmente utilizada, es decir la inoculación “in situ”, suelen presentarse algunos problemas como los siguientes:

- Los depósitos de jarosita (sulfatos básicos de hierro(III)) se producen sobre el mineral impidiendo la continuidad de la biolixiviación.
- La concentración de los iones metálicos en los lixiviados, suele alcanzar niveles inhibitorios para la actividad bacteriana.
- Los parámetros del proceso (aireación, pH) no son fácilmente controlables.

Los bio-reactores con bacterias inmovilizadas son una solución alternativa a estos problemas<sup>3,4,5,6,7</sup>. La alta concentración de bacterias sobre la superficie de un soporte

---

<sup>1</sup> Nemati, M. and Webb, C. 1996. “Effect of ferrous iron concentration on catalytic activity of immobilized cells of *Thiobacillus ferrooxidans*”. Applied and Microbiology Biotechnology 46, 250-255.

<sup>2</sup> Webb, C. and Dervakos, G. A. 1996. “Studies in Viable Cell Immobilization”. R.G. Landes Company Austin, Texas U.S.A.

<sup>3</sup> Porro, S., Pogliani, C., Donati, E. and Tedesco, P. 1993. “Use of Packed Bed Bioreactors Application to Ores Bioleaching”. Biotechnology Letters 15, 207-212.

<sup>4</sup> Grishin, S. and Tuovinen, O.H. 1988. “Fast kinetic of Fe<sup>++</sup> oxidation in packed-bed reactor”. Applied and Environmental Microbiology 54, 3092-3100.

<sup>5</sup> Lancey, E. and Tuovinen, O. 1984. “Ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* immobilised calcium alginate”. Applied and Microbiology Biotechnology 20, 94-99.

<sup>6</sup> Garcia, M. J., Palencia, I. and Carranza, F. 1989. “Biological ferrous oxidation in packed-bed columns with low-grade sulphide mineral as support”. Process Biochemistry 24, 84-87.



inerte o activo, permite una rápida y continua producción del medio requerido, con un adecuado control de los parámetros de crecimiento, y sin establecer contacto directo bacteria-mineral o bacteria-lixivados.

Las experiencias realizadas en los primeros capítulos (capítulos 2, 3 y 4) nos permitieron seleccionar los soportes más adecuados y las condiciones que deben elegirse para preparar bio-reactores con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas.

En las experiencias realizadas en el capítulo 2, se determinó que no ocurren cambios en los parámetros cinéticos de la oxidación de hierro(II) cuando las bacterias se encuentran adheridas a soportes inertes como perlas de vidrio y sílicagel, mientras que para el mineral proveniente de Bajo de la Alumbrera, las productividades en hierro(III) disminuían (respecto del control) a medida que aumentaba la densidad de pulpa. Por otro lado el carbón activado no fue un soporte adecuado debido a la elevada oxidación abiótica del hierro(II) que se presenta sobre su superficie.

En el capítulo 3 se determinó la importancia de la jarosita formada in situ para la formación de la bio-película de *T. ferrooxidans*, y en el capítulo 4 se ha corroborado el papel relevante de la formación de jarosita para la obtención de altas productividades en hierro(III). Además se determinó la dependencia de las productividades de hierro(III) con el pH.

En este capítulo se reportan los resultados obtenidos en experiencias en las cuales se intentó preparar bio-películas de *T. ferrooxidans* en columnas utilizando diferentes soportes.

---

<sup>7</sup> Corral, M. T., Gonzalez, F. Blázquez, M. L. Ballester, A. and Muñoz J.A 1993. "Continuous bioleaching of mineral sulphides". In Biohydrometallurgical Technologies. Bioleaching Processes vol 1. Torma, A. E., Wey, J. E. and Lakshmanan, V. I. (ed.) 65-75.

## 10.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### 10.2.1. Formación de bio-películas de *T. ferrooxidans* sobre perlas de vidrio

En la formación de bio-películas se utilizó un medio 9 K modificado. La cantidad de hierro(II) fue de  $6 \text{ g.l}^{-1}$  (6K). Una vez formada la bio-película se aumentó la concentración de hierro hasta  $9 \text{ g.l}^{-1}$  para contar con una importante concentración en solución.

#### 10.2.1.1. Descripción experimental

Las experiencias se realizaron en columnas percoladoras de vidrio, con un tamaño de 4 cm de diámetro por 25 cm de longitud, esterilizadas en autoclave. 160 g de perlas de vidrio de tamaño comprendido entre 2-4 mm, previamente tratadas del modo descrito en 3.2.1.1., fueron colocadas en la columna; posteriormente se adicionaron 180 ml de medio de cultivo 6K (medio 9K<sup>8</sup> con solo  $6 \text{ g.l}^{-1}$  de hierro(II)) de pH = 1,8 y 20 ml de un inóculo de *T. ferrooxidans*. El inóculo fue obtenido a partir de un cultivo de *T. ferrooxidans* DSM 11477 cultivado sobre 9 K y preparado como se ha descrito en los capítulos anteriores. Un flujo de aire de  $120 \text{ l.h}^{-1}$  se utilizó para permitir la recirculación del medio en la columna, además de proporcionar los nutrientes gaseosos. El sistema fue mantenido a 30 °C en cuarto estufa. Cuando en el sistema se detecta oxidación total del hierro(II), el medio es reemplazado por medio de cultivo fresco.

Este último procedimiento se repitió hasta alcanzar valores constantes de productividad de hierro(III); en ese instante se reemplazó el medio por medio 9 K fresco.

Durante las experiencias se determinó la concentración hierro(II) por titulación con solución de permanganato de potasio. La población bacteriana libre fue determinada por conteo en una cámara de Petroff-Hausser empleando un microscopio con dispositivo de contraste de fase. El pH de la solución fue medido por un equipo Altronix. El hierro total soluble se determinó por un equipo de absorción atómica.

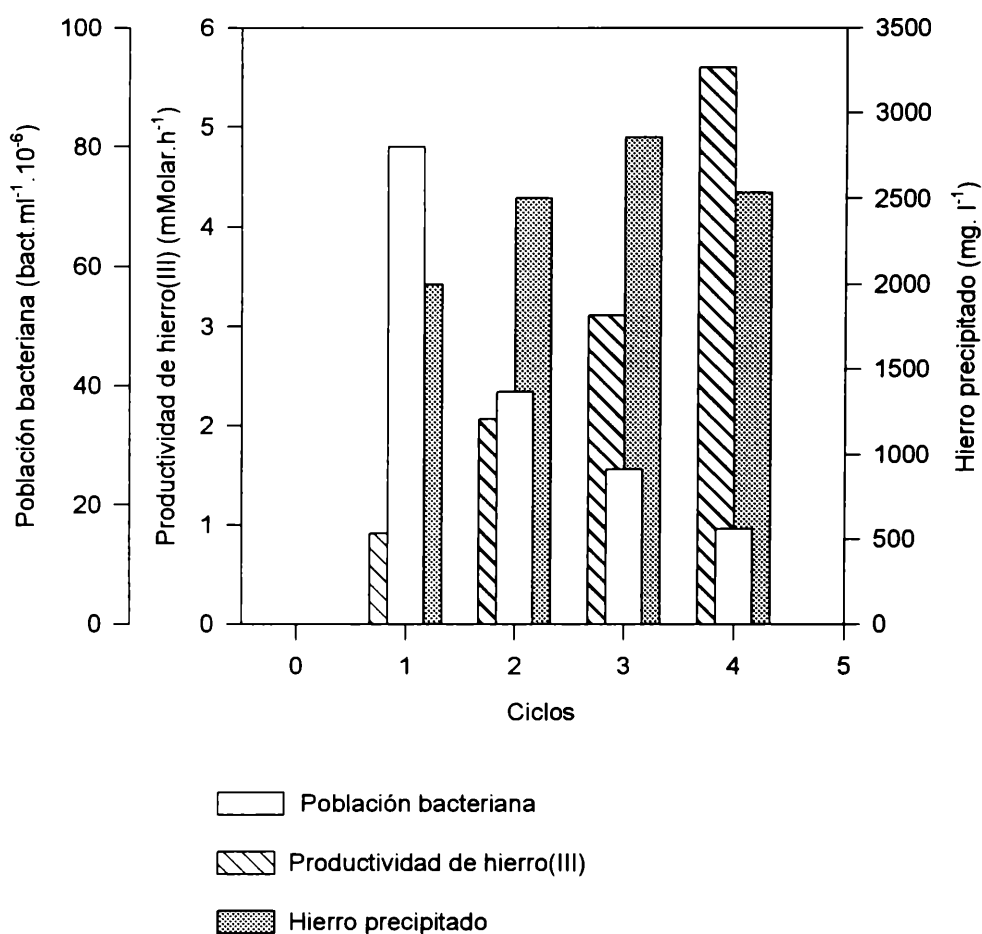
---

<sup>8</sup> Silverman, M. P. and Lundgren. 1959. "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium, *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields". J Bacteriol. 77, 326-331.

### 10.2.1.2. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 10.1 se encuentran representadas las productividades de hierro(III), hierro precipitado y población bacteriana en suspensión en los cuatro primeros ciclos de crecimiento en el sistema descrito anteriormente. Cada ciclo comienza con el recambio de medio. Los datos de cada ciclo se representan al final del mismo, esto es, cuando todo el hierro(II) ha sido oxidado. Puede observarse que la productividad aumenta a medida que aumenta el número de ciclos. El número de bacterias en solución disminuye en cada ciclo del mismo modo que la cantidad de hierro soluble.

FIGURA 10.1. Evolución de la productividad de hierro(III), hierro precipitado y población bacteriana en suspensión, en una columna con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre perlas de vidrio



En el transcurso de un ciclo cualquiera, se observa una evolución del pH tal cual es esperada en base a las ecuaciones discutidas en el capítulo 2: un aumento inicial del pH hasta aproximadamente 1,84-1,85, debido a la oxidación de hierro(II), luego el pH se mantienen prácticamente constante para posteriormente sufrir un descenso debido a la parcial precipitación del hierro(III).

Luego del cuarto ciclo (datos no mostrados), la población bacteriana en suspensión es tan baja que puede atribuirse la oxidación de hierro(II) exclusivamente a las bacterias adheridas. La productividad de hierro(III) se mantuvo aproximadamente constante luego del cuarto ciclo. También a partir de este ciclo, la cantidad de hierro precipitada se mantiene constante en un valor de aproximadamente 2500 mg.l<sup>-1</sup> que es intermedio a lo observado en los ciclos previos (2100 a 2800 mg.l<sup>-1</sup>). El porcentaje de hierro que se mantiene soluble (si el recambio de medio se realiza apenas agotado el hierro(II) tal cual se hizo en estas experiencias) es 68, 60, 54 y 59 % del total presente.

Es decir que cuando el sistema alcanza una productividad constante se aprovecha aproximadamente el 60 % del hierro total que se colocó en la columna.

Luego de estos ciclos necesarios para alcanzar productividad constante, se realizaron recambios con mayor concentración de hierro (9 K), estabilizándose la productividad en aproximadamente 7,3 milimolar.h<sup>-1</sup> con un porcentaje de hierro soluble igual a 54 %. Esta disminución en hierro soluble puede ser compensado por el incremento en la productividad.

## **10.2.2. Formación de bio-películas de *T. ferrooxidans* sobre silicagel**

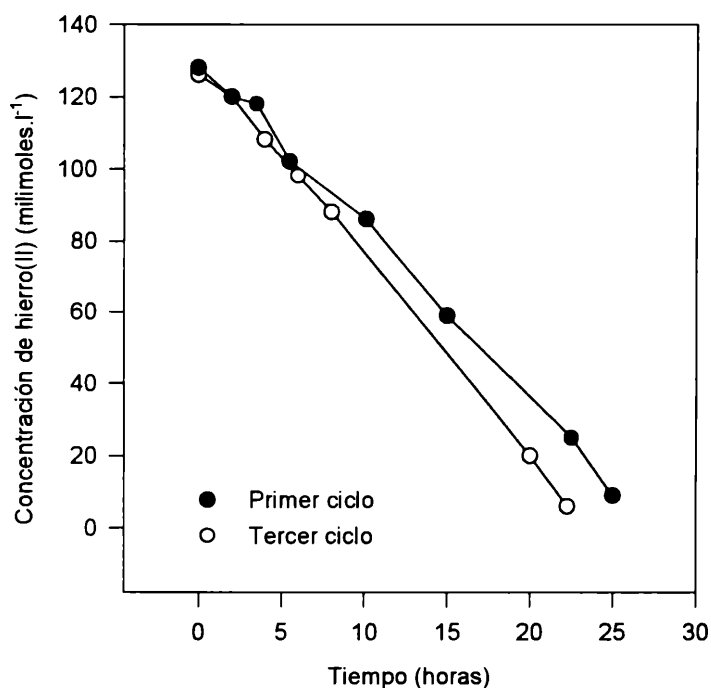
### *10.2.2.1. Descripción experimental*

El diseño experimental fue similar al utilizado en el caso anterior excepto que las perlas de vidrio fueron reemplazadas con 80 g silicagel (tamaño de partícula se encontraba comprendido entre 2 y 3,4 mm) tratadas previamente como se ha descrito en capítulos anteriores y en cuya superficie ya se había formado un bio-película de *T. ferrooxidans* durante una experiencia en batch.

### 10.2.2.2. Discusión de los resultados experimentales

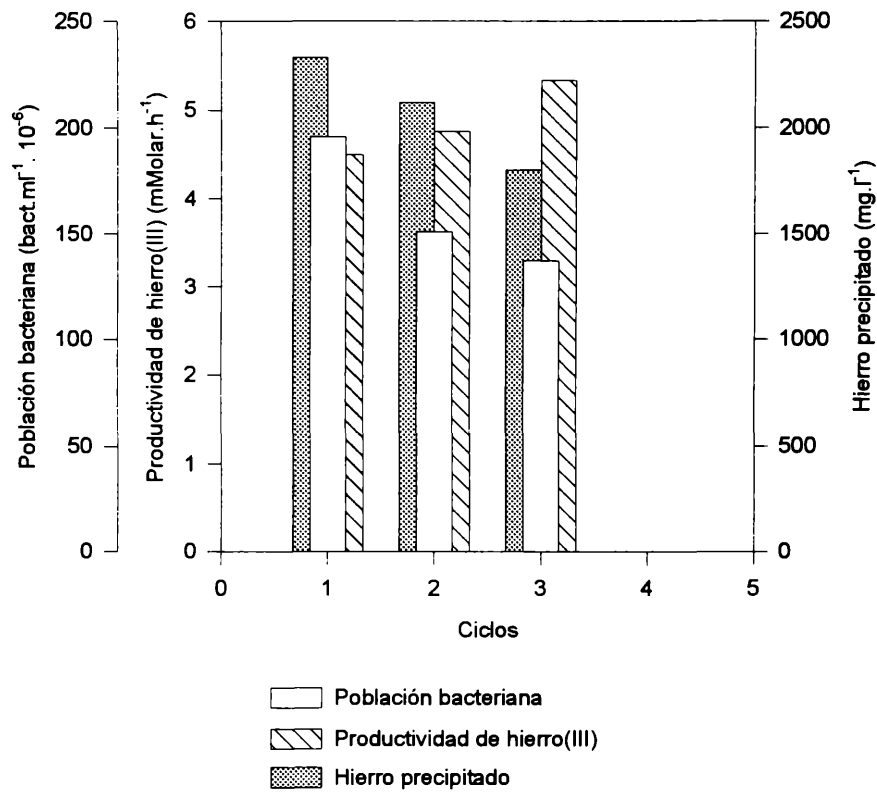
En la figura 10.2 puede observarse el consumo de hierro(II) en función del tiempo, para el primer ciclo y el tercer ciclo. El segundo ciclo tuvo un consumo intermedio y no fue graficado para una mayor claridad de la figura. Como puede observarse las bacterias comienzan a oxidar inmediatamente hierro(II) (no se observa fase lag), compatible con el hecho de que el soporte utilizado en este caso había sido previamente colonizado por *T. ferrooxidans*.

FIGURA 10.2. Evolución de la concentración de hierro(II) para el primer y tercer ciclo de formación de bio-película sobre silicagel



En la figura 10.3 se observa la evolución del hierro(III) en solución y precipitado, como también la población bacteriana para los distintos ciclos (aquí se incluyeron las medidas correspondientes al segundo ciclo).

FIGURA 10.3. Evolución de hierro(III), hierro precipitado y población bacteriana en suspensión, en una columna con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre silicagel.



Como puede observarse, la productividad aumenta hasta el tercer ciclo y luego se mantiene aproximadamente constante en 5,5 mM.h<sup>-1</sup>.

### 10.2.3. Formación de bio-películas de *T. ferrooxidans* sobre mineral de Bajo La Alumbreira

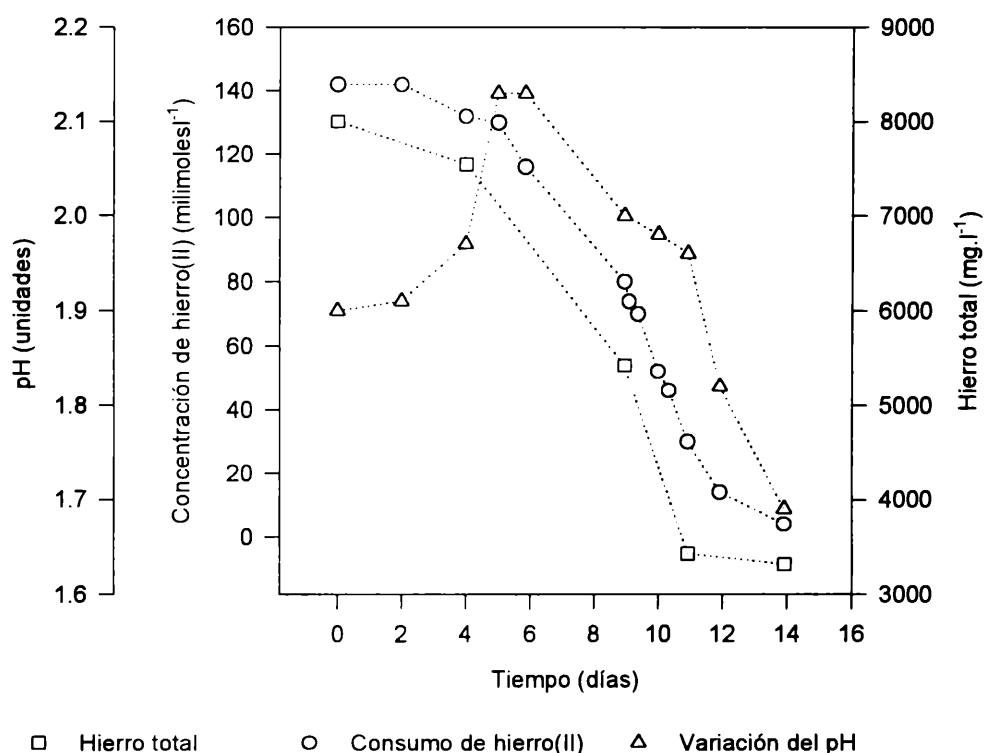
#### 10.2.3.1. Descripción experimental

El diseño experimental fue el mismo que con los otros soportes, excepto que aquí se utilizaron 80 g de mineral proveniente de Bajo la Alumbreira, con un 0,41 % de cobre (capítulo 2.4.4.1.) previamente colonizado por *T. ferrooxidans* (la jarosita no adherida fue separada antes del agregado a los cultivos finales).

### 10.2.3.2. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 10.4 se ha representado las variaciones de hierro(II) y hierro total soluble y de pH en función del tiempo.

FIGURA 10.4. Evolución de hierro(II), hierro total y pH en una columna con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre mineral de Bajo La Alumbreira



La productividad de hierro(III) en este cultivo fue de 9,9 mM.día<sup>-1</sup> (0,4 mM.h<sup>-1</sup>) que es significativamente más baja que las detectadas en todas las columnas anteriores. Además, hubo una precipitación de hierro prácticamente cuantitativa que acompañó a la

oxidación de hierro(II); paralelamente, hubo siempre una población bacteriana en suspensión muy pequeña. En los siguientes ciclos hubo un descenso permanente de la productividad, por lo que se considera que este soporte no es adecuado para una correcta formación de una biopelícula. Al menos existen cuatro razones que, individual o conjuntamente, podrían justificar este comportamiento:

- El número inicial de bacterias colocadas en el sistema es demasiado bajo (la colonización del mineral, como se ha visto en capítulos anteriores, es muy pobre).
- La alta precipitación de jarosita posterior sobre el mineral impide que las células adheridas tengan acceso a los nutrientes gaseosos y en solución.
- El hierro(III) formado puede estar permanentemente reduciéndose sobre el mineral manteniendo elevadas las concentraciones de hierro(II).
- Las células pueden estar utilizando como fuente de energía los sulfuros presentes en el mineral, provocando un retardo en la oxidación de hierro(II).

Por estas razones, se procedió a realizar una experiencia similar pero utilizando mineral previamente bio-lixiviado de modo que su contenido superficial en sulfuros haya disminuido lo suficiente para no influir reduciendo al hierro(III) o actuando como fuente alternativa de energía para las bacterias. El uso del mineral previamente lixiviado, disminuirá el hierro que podría disolverse a partir del mineral y con ello, la cantidad de jarosita que podrá formarse durante los ciclos de crecimiento. También se decidió la colonización de la jarosita “in situ” de modo de que la población inicial sea suficientemente elevada.

#### **10.2.4. Formación de bio-películas de *T. ferrooxidans* sobre ganga del mineral de Bajo la Alumbra**

##### *10.2.4.1. Descripción experimental*

Las experiencias se realizaron en las mismas condiciones que en el 10.2.3.1 pero con el mineral previamente lixiviado: su contenido inicial en cobre fue disminuido a 0,2 %. El mineral fue previamente esterilizado en tres ciclos de 5 minutos en microondas (no se observó desarrollo bacteriano cuando se realizaron los controles de esterilidad

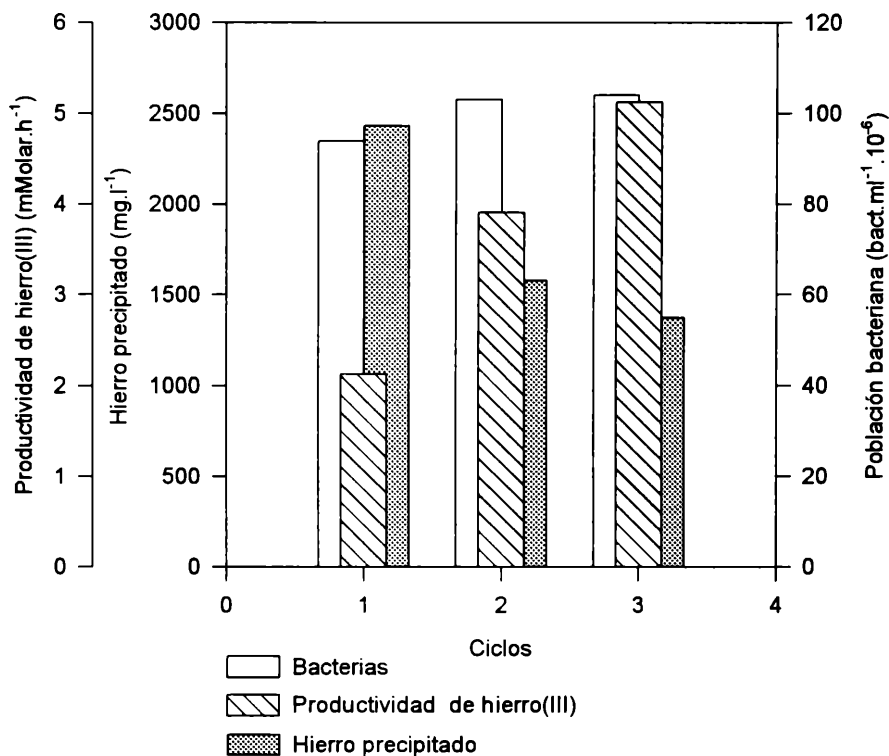


respectivos) y luego se realizó una inoculación al 5 % v/v con células de *T. ferrooxidans* preparadas como se ha descrito reiteradas veces (el inóculo inicial contenía  $128 \times 10^6$  bact.ml<sup>-1</sup>). Solo se inoculó en el primer ciclo.

#### 10.2.4.2. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 10.5 se observa la evolución de la productividad de hierro(III), el hierro precipitado y la población en suspensión para los primeros ciclos de crecimiento.

FIGURA 10.5. Evolución de la productividad de hierro(III), hierro precipitado y población bacteriana en suspensión durante 3 ciclos consecutivos de una columna con *T. ferrooxidans* inmovilizados sobre ganga del mineral de Bajo la Alumbraera



En esta experiencia se nota un incremento de la productividad hasta valores semejantes a los obtenidos sobre los otros soportes: el máximo valor alcanzado (tercer ciclo) y que se mantiene prácticamente constante es  $5,1 \text{ mM}\cdot\text{h}^{-1}$  con una muy buena cantidad de hierro total soluble (el tercer ciclo termina con una cantidad de  $7000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  aproximadamente de hierro(III) soluble). Consecuentemente se observan poblaciones bacterianas en suspensión muy elevadas (no ha existido una gran precipitación que secuestre un número importante de células).

Con el fin de comprobar si la adherencia inicial de bacterias sobre el mineral lixiviado es diferente que sobre el mineral original, se hicieron estudios de adherencia con la metodología descrita en el capítulo 3. Los resultados no mostraron diferencias significativas: sobre el mineral no tratado la adherencia fue del 39 % mientras que sobre el mineral lixiviado no superó el 37 % en promedio (la desviación estándar fue del orden del 5 %). Los espectros de difracción de rayos X sobre el mineral tratado y sin tratar solo permitió detectar un incremento paulatino en las señales de diversos silicatos identificables; sin embargo, dada la pequeña proporción en la que están presentes, no pudo obtenerse información significativa sobre los sulfuros que fueron eliminados durante la lixiviación. Los espectros de los precipitados después de cada ciclo confirma que los precipitados de hierro(III) obtenidos son esencialmente de jarosita (aproximadamente en un 99 %).

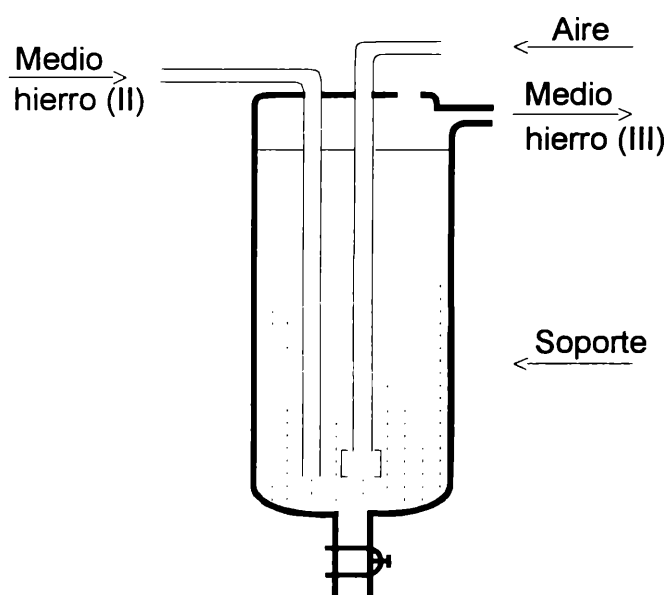
#### **10.2.5. Bio-películas de *T.ferrooxidans* utilizando vidrio o silicagel como soportes y operando en modo continuo**

Desde el punto de vista industrial, será seguramente más adecuado que un reactor con células inmovilizadas funcione en modo continuo. Además, y debido a que la precipitación de hierro(III) se produce esencialmente cuando el hierro(III) se mantiene en contacto con los soportes, el modo continuo de operación permitirá mantener una concentración de hierro(III) soluble mucho mayor que en los sistemas en batch.

##### *10.2.5.1. Descripción experimental*

Se empleó un bio-reactor como el mostrado en la figura 10.6 (5 cm de diámetro y 20 cm de longitud). Dentro de la columna se colocaron 62 g de cilindros de vidrio (2 mm de diámetro por 4 mm de longitud) ó 60 g de silicagel (tamaño entre 2 y 3 mm).

FIGURA 10.6. Esquema del bio-reactor empleado en la experiencia de formación de una bio-película de *T. ferrooxidans*, para ser utilizado en modo continuo

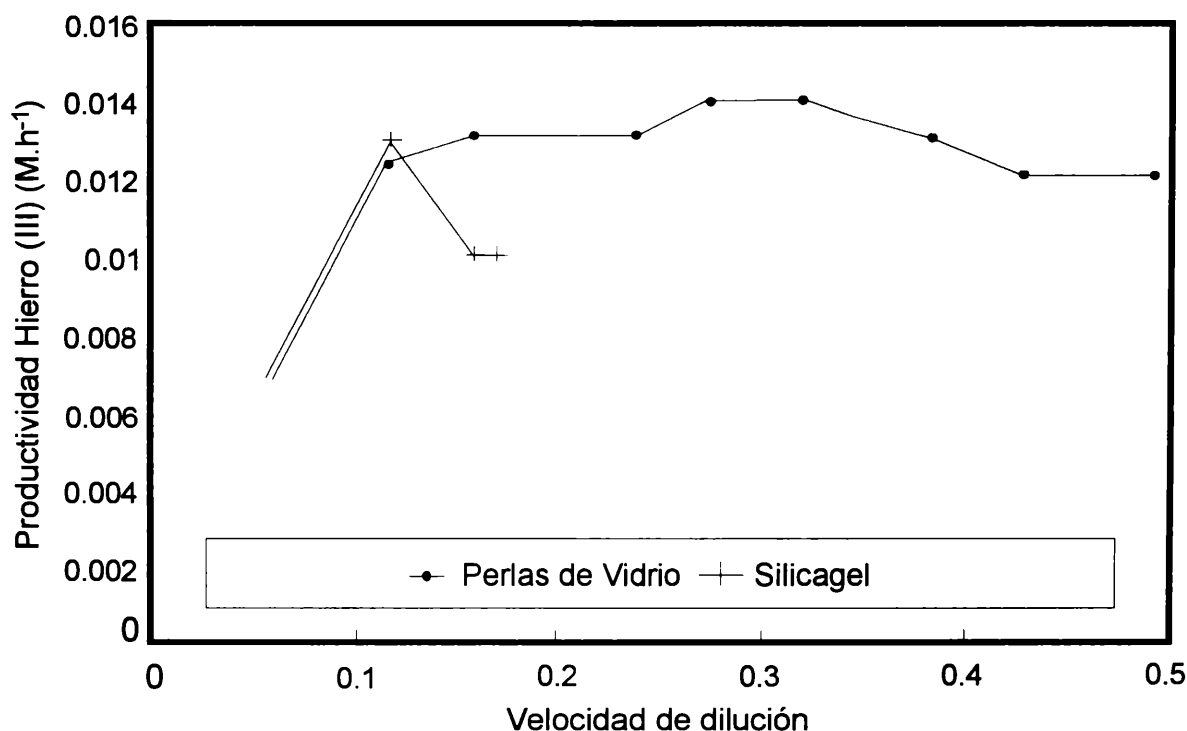


La preparación de la bio-película sobre el soporte inerte, se realizó dentro del bio-reactor del mismo al indicado en 10.2 1.1. Se utilizaron 110 ml de medio 9 K (pH inicial 1,50), a una temperatura de 30 °C y el inóculo inicial de *T. ferrooxidans* fue preparado del mismo modo que habitualmente. Una vez alcanzada una productividad aproximadamente constante se procedió a los ensayos en modo continuo. Para ello se incorporó medio 9 K fresco en forma continua regulado por una bomba peristáltica.

#### 10.2.5.1. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 10.7 se representan las productividades de hierro(III) en  $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}$  en función de la velocidad de dilución (expresadas como el cociente entre el volumen incorporado por hora y el volumen de medio) en  $\text{h}^{-1}$ .

FIGURA 10.7. Productividad de hierro(III) a diferentes velocidades de dilución



Puede observarse que la columna conteniendo silicagel se lava a velocidades de dilución relativamente bajas (no mayores a  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ) mientras que el reactor con cilindros de vidrio se mantiene operativo aun a velocidades de dilución mayores a  $0,5 \text{ h}^{-1}$  y con una alta productividad promedio. Este último hecho indica que no hay pérdida importante de la biomasa adherida aun actuando en modo continuo. Además, la concentración de hierro(III) en solución fue muy elevada durante todos los ensayos (superior al 70 –80 % del total presente). Las máximas productividades halladas ( $13$  y  $14 \text{ mM.h}^{-1}$ ) son muy superiores a las halladas cuando los sistemas operaron en batch ( $5,5$  y  $7,3 \text{ mM.h}^{-1}$ ) para vidrio y silicagel como soportes, respectivamente.

Utilizando una relación lineal como una primera y semicuantitativa aproximación, es posible calcular las máximas productividades alcanzables en función de la masa de soporte: 210 y posible calcular la máxima productividad de hierro (III) por kg de cada uno de los soportes empleados, los resultados obtenidos fueron  $217$  y  $226 \text{ mM.h}^{-1}.\text{kg}^{-1}$  para silicagel y vidrio, respectivamente.

### 10-3 CONCLUSIONES

- La preparación de bio-película de *T. ferrooxidans* (indicada por una productividad de hierro(III) mayor a la del cultivo inicial y que ya no se modifica apreciablemente en posteriores recambios de medio) requirió entre 3 y 4 ciclos de recambio de medio, cuando los soportes usados fueron perlas de vidrio, silicagel o ganga del mineral de Bajo La Alumbraera.
- El mineral original (no lixiviado) no sirvió como soporte (se observó un descenso de la productividad entre ciclos sucesivos) debido probablemente a la fuente alternativa de energía presente (sulfuros) y/o a la posibilidad de reducción de hierro(III) sobre el mineral.
- La máxima productividad alcanzada en el modo batch para los soportes anteriores fue del orden de 5 mM.h<sup>-1</sup> (silicagel y mineral) y ligeramente superior a 7 mM.h<sup>-1</sup> (vidrio).
- Los reactores bio-película actuando en modo continuo permiten alcanzar mayores productividades que en batch (aproximadamente 13 y 14 mM.h<sup>-1</sup> para silicagel y vidrio respectivamente) con mayores concentraciones de hierro(III) soluble.
- Las células inmovilizadas sobre silicagel fueron lavadas a bajas velocidades de dilución (del orden de 0,2 h<sup>-1</sup>) mientras que las inmovilizadas sobre vidrio resistieron velocidades de dilución tan altas como 0,5 h<sup>-1</sup>.

# **CAPÍTULO 11**

Formación de reactores con células de  
*Thiobacillus thiooxidans* inmovilizadas sobre  
azufre

## 11.1. INTRODUCCION

En capítulos anteriores se han mencionado las características más importantes del *T. thiooxidans*. Este microorganismo es, esencialmente, un productor de ácido sulfúrico a partir de la oxidación aeróbica de azufre elemental. Respecto de este proceso, se han realizado gran número de estudios, tanto a nivel básico como aplicado<sup>1 2 3,4</sup>. En este último contexto se han realizado experiencias donde el ácido sulfúrico (producido en un bio-reactor a partir del ataque del azufre por *T. Thiooxidans*), fue empleado para mejorar la biolixiviación de minerales sulfurados de cobre<sup>5</sup>. En este caso el ácido generado permite una disolución rápida del hierro oxidado presente en el mineral y mantiene el pH lo suficientemente bajo durante toda la experiencia, evitando de ese modo los precipitados de hierro(III) que podrían detener la extracción de iones metálicos.

En este capítulo se han introducido los resultados sobre estudios de la producción de ácido sulfúrico a partir de células de *T. thiooxidans* inmovilizadas sobre partículas de azufre elemental.

---

<sup>1</sup> Susuki, I. 1974. "Mechanism of inorganic oxidation and energy coupling". *Annu. Rew. Microbiol.* 28, 85-101.

<sup>2</sup> Ehrlich, H. E. 1990 *Geomicrobiololy*, 2nd Ed., Marcel Dekker, Inc (ed), New York, 449-513.

<sup>3</sup> Konishi, Y., Asai, S. and Yoshida, N. 1995 Growth Kinetics of *Thiobacillus thiooxidans* on the Surface of Elemental Sulfur. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3617-3622.

<sup>4</sup> Jaworska, M. and Urbanek, A. 1998. "The influence of concentration in liquid medium on elemental sulphur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*". *Bioprocess Engineering* 18, 201-205.

<sup>5</sup> Donati, E., de La Fuente, V., Giaveno, A., Chiacchiarini, P., Lavalle, L. y Tedesco, P. 1995. "Leaching of a copper ore by microbiological production of acid and oxidant media using two bioreactors". In *Biohydrometallurgical Processing*. Vargas, T. Jerez, C. A. Wiertz, J. V. And Toledo, H. (ed.). Universidad de Santiago de Chile. Chile. 1, 293-299.





## 11.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### Formación de la bio-película de *T.thiooxidans* sobre azufre elemental

#### 11.2.1. Descripción experimental

Las experiencias fueron realizadas en una columna percoladora de vidrio de 3,5 cm de diámetro y una altura de 25 cm. En esta columna fueron agregados 160 g de azufre elemental (tamaño de partícula: 2-4 mm), 180 ml de medio 0 K<sup>6</sup> (pH = 2.0) y 20 ml de un cultivo de *T. thiooxidans* en estado exponencial de crecimiento. La solución fue obligada a recircular mediante una corriente de aire de 120 l.h<sup>-1</sup>. El sistema se mantuvo a 30 °C. Cuando el pH alcanzó un valor entre 0,7-1,0, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco sin una nueva inoculación. Denominaremos ciclo al periodo comprendido entre un recambio de medio de cultivo y el próximo.

El inóculo fue preparado (de modo semejante a lo descrito en capítulos anteriores) a partir de un cultivo de *T. thiooxidans* DSM 11478 utilizando medio 0 K y azufre elemental como fuente de energía. El número de células en el inóculo fue de 5x10<sup>8</sup> bact.ml<sup>-1</sup>.

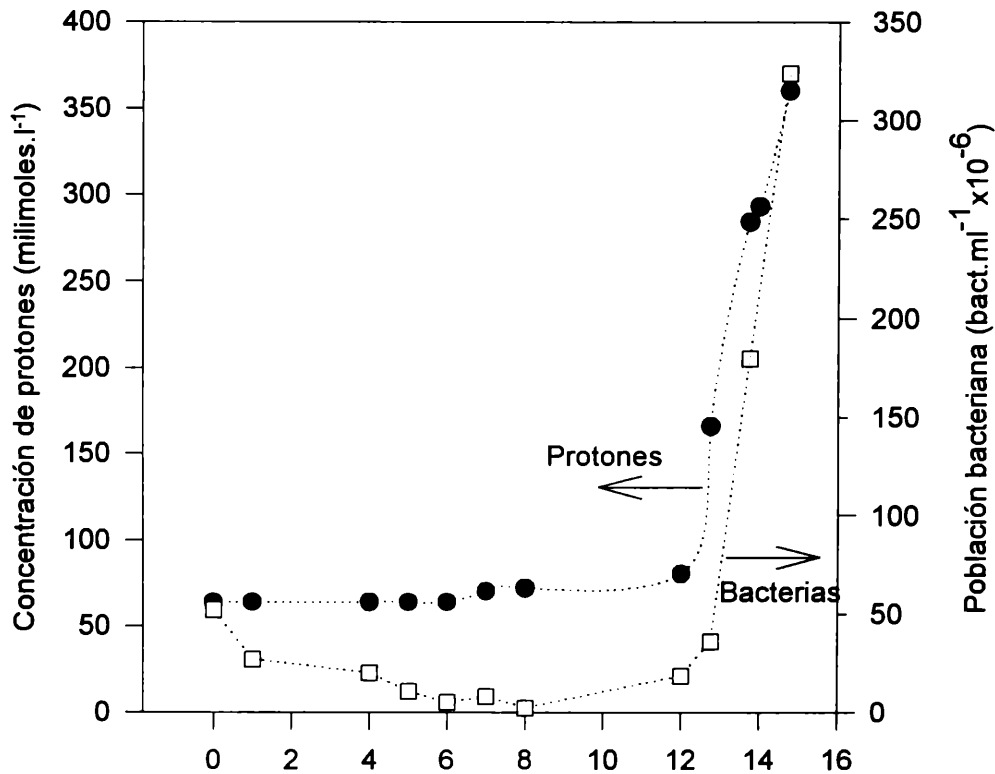
Durante la experiencia se determinó la concentración de iones hidrógeno por titulación con hidróxido de sodio 0,020 N. La población bacterianas en solución se cuantificó en una cámara de Petroff-Hausser utilizando un microscopio con dispositivo de contraste de fase. El pH fue medido con un electrodo de vidrio y un equipo Altronix.

Las imágenes de células de *T. thiooxidans* inmovilizadas sobre azufre fueron obtenidas por observación empleando un microscopio electrónico de barrido.

#### 11.2.2. Discusión de los resultados experimentales

La figura 11.1 muestra la evolución de la concentración protones y de la población bacteriana en solución durante el primer ciclo de crecimiento.

FIGURA 11.1. Concentración de protones y población bacteriana en solución en un cultivo de *T. thiooxidans* en columna (primer ciclo).



Se observa una fase lag de aproximadamente siete días. Esta fase, mucho mayor que la observada en los cultivos en frascos agitados, podría estar relacionada con la menor relación de células a sustrato: esta relación fue  $3 \times 10^9$  bacterias por gramo de azufre en los frascos y  $6 \times 10^7$  bacterias por gramo de azufre en la columna.

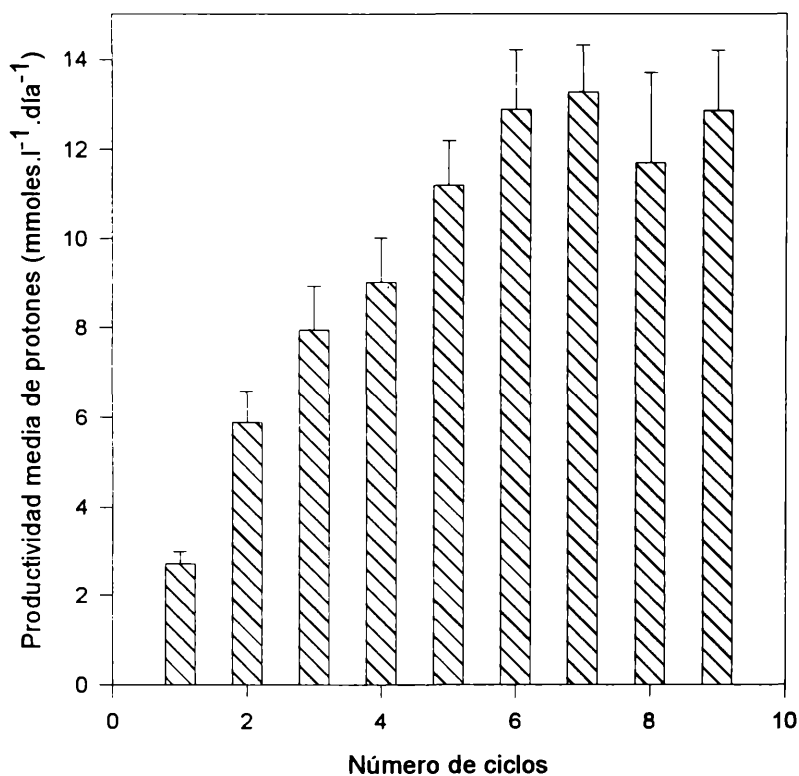
La población bacteriana va disminuyendo gradualmente durante los primeros ocho días, indicando un incremento en la adherencia bacteriana sobre el azufre. Esto había sido detectado también en frascos cuando se utilizó un tamaño de partícula semejante (denominado oportunamente “grueso”).

En la figura 11.2 se ha representado la productividad en función del número de ciclos. Para el séptimo ciclo se observa la máxima productividad, que permanece aproximadamente constante para los siguientes ciclos.

---

Silverman, M. and Lundgren, G. 1959. "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I: An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology* 77, 642-647.

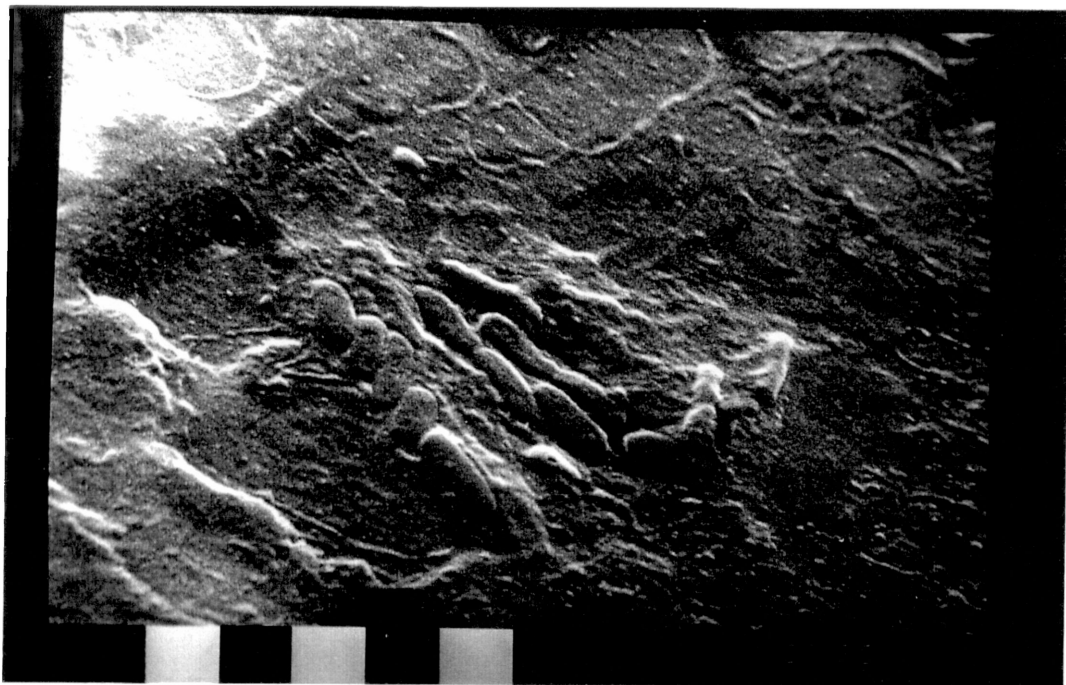
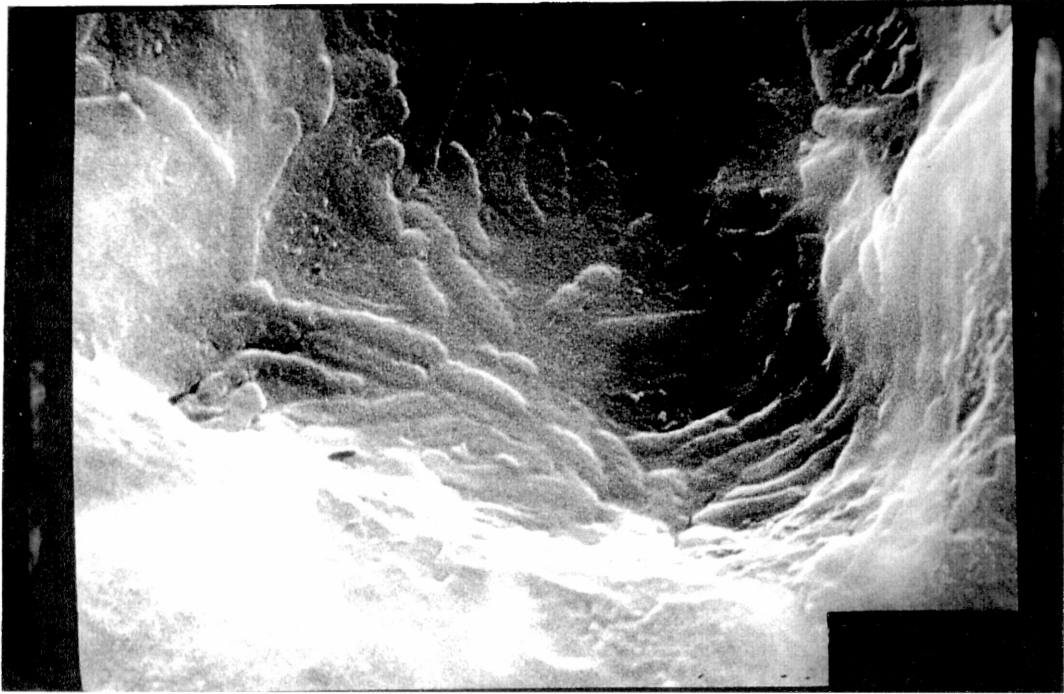
FIGURA 11.2. Productividad media de protones ( $\text{mmoles.l}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ) en ciclos sucesivos



La productividad aumenta hasta un valor máximo (aproximadamente 13  $\text{mmoles.l}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ) a partir del sexto ciclo (35 días) y luego se mantiene aproximadamente constante. En torno al decimoquinto ciclo comienza a notarse un descenso paulatino de la productividad asociado, probablemente, a la pérdida de sustrato.

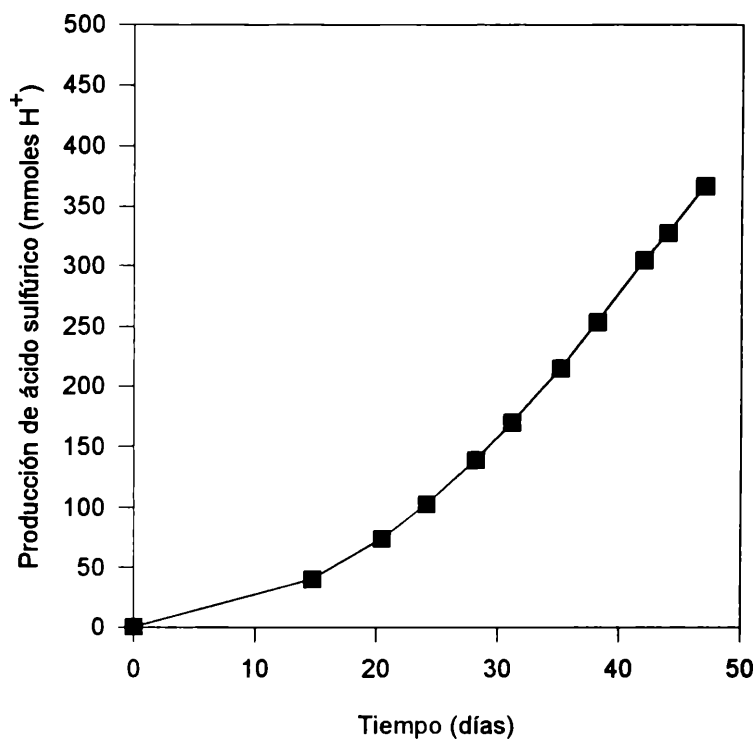
En todos los ciclos posteriores al primero, no se observó fase lag lo que parece indicar que el azufre ya se encuentra colonizado por las células de *T. thiooxidans*. La figura 11.3 muestra una microfotografía electrónica de células de *T. thiooxidans* adheridas al azufre elemental.

FIGURA 11.3 Microfotografía electrónica de células de *T. thiooxidans* adheridas a azufre elemental (aumento 20000 X)



La figura 11.4 nos muestra la producción total de ácido sulfúrico obtenida en el bio-reactor con *T. thiooxidans*.

FIGURA 11.4. Producción total de ácido sulfúrico por *T. thiooxidans* inmovilizados sobre azufre en función del tiempo



La producción de este reactor con células inmovilizadas alcanzó un valor máximo de  $80 \text{ mmoles H}^+ \cdot \text{día}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Esta producción fue calculada suponiendo que existe una relación lineal entre cantidad de soporte y productividad lo que probablemente no se cumple en reactores de estas características.

### 11.3. CONCLUSIONES

- La producción de ácido sulfúrico en un reactor con células de *T. thiooxidans* mostró una etapa lag muy larga en el primer ciclo, mostrando que es necesaria una previa adherencia de las células sobre las partículas de azufre y que ésta es suficientemente lenta en un sistema con una baja interacción medio-azufre.
- La productividad de ácido sulfúrico aumenta a medida que transcurren los ciclos llegándose a un valor máximo de 13 milimoles.l<sup>-1</sup>.día<sup>-1</sup>.

# **CAPÍTULO 12**

**Biolixiviación indirecta de un  
mineral (Bajo La Alumbarrera) con bacterias  
inmovilizadas  
Comparación con una lixiviación directa**

## 12.1. INTRODUCCIÓN

Durante la exposición del capítulo 1 y también en el capítulo 10 se ha hecho referencia al tratamiento de minerales empleando las denominadas técnicas de lixiviación bacteriana. En el capítulo 9 se realizaron experiencias de biolixiviación empleando *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans* a nivel de frascos agitados, con medios de cultivo de distinta composición.

La técnica de frascos agitados no tiene un equivalente real y suficientemente rentable a nivel industrial, salvo en casos excepcionales donde el valor de los metales así lo permita. El uso de columnas percoladoras en el laboratorio resulta de mayor interés cuando se pretende evaluar ya no mecanismos sino factibilidad de la explotación, ya que puede ser asociado a metodologías del tipo de las lixiviaciones en pilas. Otra metodología de reciente aplicación, se refiere a lixiviaciones indirectas de minerales utilizando medios generados por reactores con bacterias inmovilizadas. Esto permite una optimización de la actividad bacteriana y evita un contacto directo bacteria-mineral-solución que pudiera detener o perturbar el desarrollo bacteriano.

En el desarrollo de este capítulo y en el siguiente se harán aplicaciones de estas técnicas utilizando algunos minerales sobre los cuales existe un amplio interés económico en la República Argentina. Uno de los ellos, el mineral de Bajo la Alumbra que es probablemente la mayor mina de oro y cobre del país, ha adquirido cierta relevancia recientemente ya que se ha cedido su explotación a un grupo de empresas multinacionales (dos empresas australianas, Mount Isa Miners Ltd. (MIN) y North Ltd., y una canadiense, Rio Algom Ltd.) que, en realidad, se limitan a la concentración y exportación de concentrados. Esta explotación implica la mayor inversión extranjera del país y dejará aproximadamente 600 millones anuales en exportaciones<sup>1</sup>. Como indicamos, el mineral no se industrializa en la zona, sino que se concentra y la extracción final del cobre y el oro se realiza en países como Estados Unidos, Japón, Canadá, Brasil, Corea o España<sup>2</sup>. Por lo tanto, el efecto socioeconómico en el país, y en particular en Catamarca, no será de la magnitud que se sugiere a nivel oficial.

---

<sup>1</sup> Clarín. 23 de noviembre de 1997. Suplemento de economía y negocios. Buenos Aires.

<sup>2</sup> Nueva. 1996. Año 6. número 274. ADISA. Buenos Aires. Argentina.



En este capítulo se realizarán experiencias de biolixiviación del mineral proveniente de esta mina, empleando dos modalidades distintas: columna percoladora y un bio-reactor, generador de hierro(III), acoplado a una columna percoladora.

## 12.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### **Biolixiviación del mineral Bajo la Alumbreira en columna y en un sistema que incluye un bioreactor con células de *T. ferrooxidans* adheridas a un soporte inerte**

#### *12.2.1. Descripción experimental*

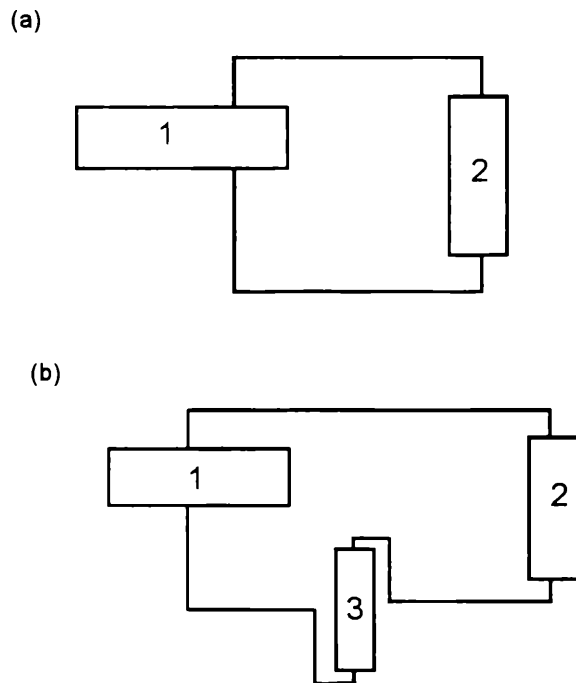
En la figura 12.1 se indican los dos esquemas de lixiviación que se realizaron sobre el mineral.

El esquema (a) de la figura corresponde a una biolixiviación “in situ”, es decir, las bacterias están en contacto directo con el mineral. La columna de vidrio (2), con un diámetro de 4 cm y 25 cm de longitud se rellenó con 100 g del mineral de Bajo La Alumbreira (las características y composición de este mineral ya fue proporcionada en capítulos previos) con un tamaño de partícula comprendido entre 2 y 4 mm. Se adicionaron 300 ml de medio de cultivo 9 K inoculado al 10 % con *T. ferrooxidans*. El medio fue recirculado a través del mineral por medio de una bomba de diafragma (1), a una velocidad de flujo de 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. La temperatura de la experiencia se mantuvo en 30 °C. Las células de *T. ferrooxidans* provenían de un cultivo en medio 9 K (pH inicial de 1,5) que fueron cosechadas al alcanzar el final de la fase exponencial de crecimiento, tal cual se ha descrito en capítulos anteriores.

El esquema (b) de la figura corresponde a una lixiviación “indirecta” del mineral utilizando un reactor con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre perlas de vidrio (3). Las condiciones y el contenido de la columna (2) fueron similares a las descritas para el esquema (a) salvo que el medio no fue inoculado.

La preparación del reactor con células inmovilizadas se realizó de modo semejante al descrito en el capítulo 10. Este reactor contenía 300 ml de medio 9 K y 260 g de perlas de vidrio (tamaño entre 2 y 4 mm).

FIGURA 12.1. Biolixiviación del mineral Bajo La Alumbraera.



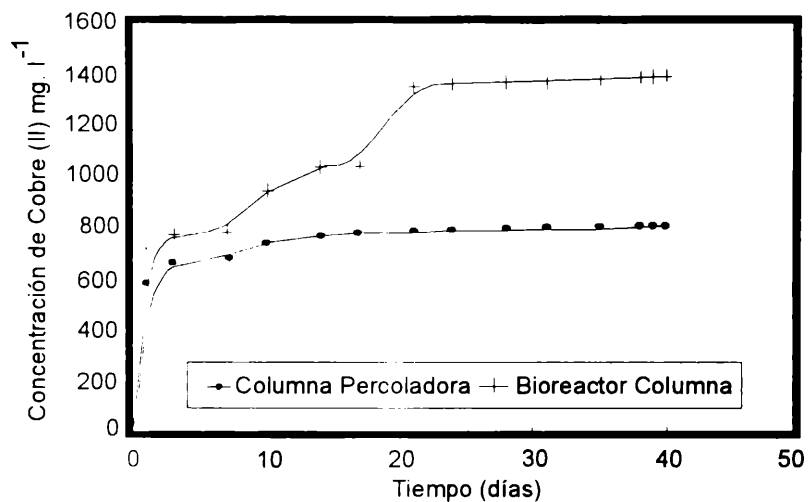
- Referencias:
- (a) Sistema de columna percoladora
  - (b) Sistema de columna percoladora bio-reactor
  - 1: Bomba peristáltica
  - 2: Columna percoladora con mineral
  - 3: Reactor con *T.ferrooxidans* inmovilizados sobre vidrio

Una vez que el reactor alcanzó una velocidad constante de producción de hierro(III), se colocaron 300 ml de medio 9 K fresco (sin oxidar) y se conectó según el esquema (b) a la columna percoladora (2) con mineral. De este modo, el medio con hierro(III) producido por oxidación bacteriana del hierro(II) era obligado a circular a través del mineral y finalmente recirculado al reactor para mantener elevada la concentración de hierro(III).

### 12.2.1. Discusión de los resultados experimentales

En la figura 12.2 se observa la extracción de cobre durante la biolixiviación del mineral empleando ambos sistemas.

FIGURA 12.2. Biolixiviación del mineral Bajo La Alumbreira. Comparación entre biolixiviación “in situ” y bio-lixiviación indirecta utilizando un reactor con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas



Luego de 40 días de operación, se extrajo 27,6 y 47,6 % del cobre presente en el mineral, utilizando bio-lixiviación “in situ” y bio-lixiviación indirecta, respectivamente. Esta alta extracción de cobre con el segundo diseño experimental, podría ser debido a una o más de las siguientes causas:

1. Una gran población bacteriana se encuentra adherida al soporte inerte, en el bioreactor, manteniendo un alto nivel de hierro(III) durante toda la lixiviación.
2. Los depósitos de jarosita que se producen esencialmente durante la oxidación bacteriana del hierro(II) ocurren sobre el mineral (en el caso del diseño experimental (a)) y sobre las perlas de vidrio (en el diseño experimental (b)). Esto fue evidente incluso a simple vista. De este modo, el ataque sobre el mineral se detiene rápidamente en el primer caso (el mineral queda aislado del medio por los depósitos) mientras que en el segundo caso, el medio tiene un acceso más directo al mineral.

3. El ataque bacteriano sobre el mineral no debe tener sino una pequeña contribución del mecanismo directo ya que, en caso contrario, la extracción con el diseño (a) debería haber sido mayor a la obtenida.

En el caso de la experiencia descrita, la concentración de cobre(II) en solución proveniente de la disolución del mineral está muy por debajo de los niveles inhibitorios del crecimiento bacteriano. No obstante, en un sistema real con una relación masa/volumen mucho mayor (por ejemplo, en una pila de lixiviación), las concentraciones podrían ser suficientemente elevadas como para inhibir parcial o totalmente la acción bacteriana; además, podría haber una disolución de otras especies (que no han sido determinadas o que están presentes en muy bajas cantidades) que pudieran provocar efectos inhibitorios. La metodología de lixiviación indirecta permite salvar este inconveniente. El tiempo extra que demanda la preparación del reactor con células inmovilizadas sólo traerá cierto retraso en su primer uso; sin embargo, dado que la inmovilización sobre las perlas es prácticamente irreversible, tal cual se ha discutido en otros capítulos, el bio-reactor quedaría en condiciones de ser usado reiteradas veces para las cuales ya no sería necesario una nueva preparación de la bio-película.

### 12.3. CONCLUSIONES

- La bio-lixiviación indirecta del mineral de Bajo La Alumbraera utilizando un reactor con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre vidrio, es claramente más eficaz para la recuperación de cobre que la bio-lixiviación inoculando directamente sobre el medio en contacto con el mineral.
- Las diferencias en extracción pueden ser explicadas esencialmente por el recubrimiento del mineral por depósitos de hierro(III) que ocurrió fundamentalmente en la bio-lixiviación “in situ”. En el caso de la bio-lixiviación indirecta, la precipitación ocurrió esencialmente sobre las perlas de vidrio ubicadas en el reactor con células inmovilizadas.

# **CAPÍTULO 13**

**Biolixiviación indirecta y combinada de  
un mineral sulfurado (Capillitas)**

### 13.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha descripto en el capítulo 9, Capillitas es un mineral sulfurado de baja ley que pertenece a un yacimiento situado en la sierra del mismo nombre en la provincia de Catamarca (República Argentina). Las leyes medias estimadas son 2,6 g/t de Au, 108 g/t de Ag, 2,32 % de Cu, 1,62 % de Pb y 3,1 % de Zn<sup>1</sup> y la reserva es del orden de 3,87x10<sup>5</sup> toneladas.

En aquel capítulo, los resultados de las experiencias de biolixiviación en frascos agitados realizadas con ese mineral, mostraron una insignificante extracción de metales en los sistemas inoculados tanto con *Thiobacillus thiooxidans* o *Thiobacillus ferrooxidans*, independientemente de la composición del medio de cultivo. En realidad, se observó un importante aumento de pH del medio de cultivo que pasa de 1,8 a valores entre 4,5 y 5,0 en todos los sistemas. Este aumento de pH podría ser debido a la disolución de los carbonatos que están presentes en elevadas cantidades en el mineral. No hubo diferencias apreciables en los comportamientos observados en los sistemas inoculados y los estériles, indicando que probablemente el aumento del pH impidió un adecuado desarrollo bacteriano<sup>2</sup>.

Para lograr un ataque más adecuado de este mineral, se decidió hacer una lixiviación indirecta combinada utilizando medios generados por dos especies de *Thiobacillus*. Para ello se utilizaron células de *T. thiooxidans* inmovilizadas sobre azufre para la producción de ácido sulfúrico, y células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre perlas de vidrio para la producción de hierro(III).

---

<sup>1</sup>Porro S Boiardi J. L y Tedesco P. H. 1988. "Biolixiviación de minerales argentinos de cobre". Rev. Metal. Madrid 24, 297-302.

<sup>2</sup>Anders B. Jensen and Colin Webb. 1995. " Ferrous sulphate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans*: a review. Process Biochemistry vol 30, 225-236

## 13.2. EXPERIENCIAS REALIZADAS

### **Biolixiviación indirecta y combinada del mineral Capillitas**

#### *13.2.1. Descripción experimental*

Los microorganismos utilizados fueron: *T. ferrooxidans* DSM 11477, rutinariamente cultivada en medio 9 K<sup>3</sup> y *T. thiooxidans* DSM11478, rutinariamente cultivada en un medio 0 K con azufre elemental (10 g/l) como fuente de energía.

El mineral de Capillitas utilizado provenía de las vetas 9 de Julio y 25 de Mayo, y su contenido determinado experimentalmente es de 9,87 % de cinc, 1,89 % de cobre, 11,6 % de hierro y 11,4 % de manganeso. Los componentes mineralógicos mayoritarios son galena (PbS), esfalerita (ZnS), pirita (FeS<sub>2</sub>), calcocita (CuFeS<sub>2</sub>), covelita (CuS), rodocrosita (MnCO<sub>3</sub>) y pirolusita (MnO<sub>2</sub>).

El bio-reactor con células de *T. thiooxidans* inmovilizadas utilizado para la producción de ácido sulfúrico, fue el descrito en el capítulo 11.

El bio-reactor con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas para la producción de hierro(III) fue el descrito en el capítulo 10.

Ambos bio-reactores fueron conectados a una tercera columna percoladora (de vidrio) que contenía 162 g del mineral (tamaño de partícula: 1-2 mm). Inicialmente, se introdujeron en la misma, 250 ml del medio previamente producido en el bio-reactor con *T. thiooxidans* inmovilizados, permitiendo la recirculación del medio, mediante la entrada de una corriente de aire, solo en esta tercera columna. Cuando el pH subía a valores entre 3,0 y 3,5, el medio era reemplazado por medio fresco proveniente del mismo bio-reactor. Este procedimiento fue repetido durante 29 días hasta que el pH se mantuvo constante e igual aproximadamente a 1). En ese momento, el medio fue reemplazado con medio fresco conteniendo hierro(III) (producido en el bio-reactor con *T. ferrooxidans* inmovilizados); previamente, a este medio se le adicionó ácido sulfúrico bio-producido (hasta pH igual a 1,0) para impedir la precipitación de jarositas. En la columna

---

<sup>3</sup>Silverman, M. And Lundgren, D. 1959. "Studies on the chemoautotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields". J. Bacteriol. 77, 642-647.



percoladora, la fase líquida fue recirculada mediante el pasaje de una corriente de aire. La temperatura de trabajo fue de 30 °C.

La concentración de hierro(II) fue determinada por titulación con solución de permanganato de potasio. Las poblaciones bacterianas se determinaron por conteo directo utilizando una cámara de Petroff-Hausser en un microscopio con dispositivo de contraste de fase.

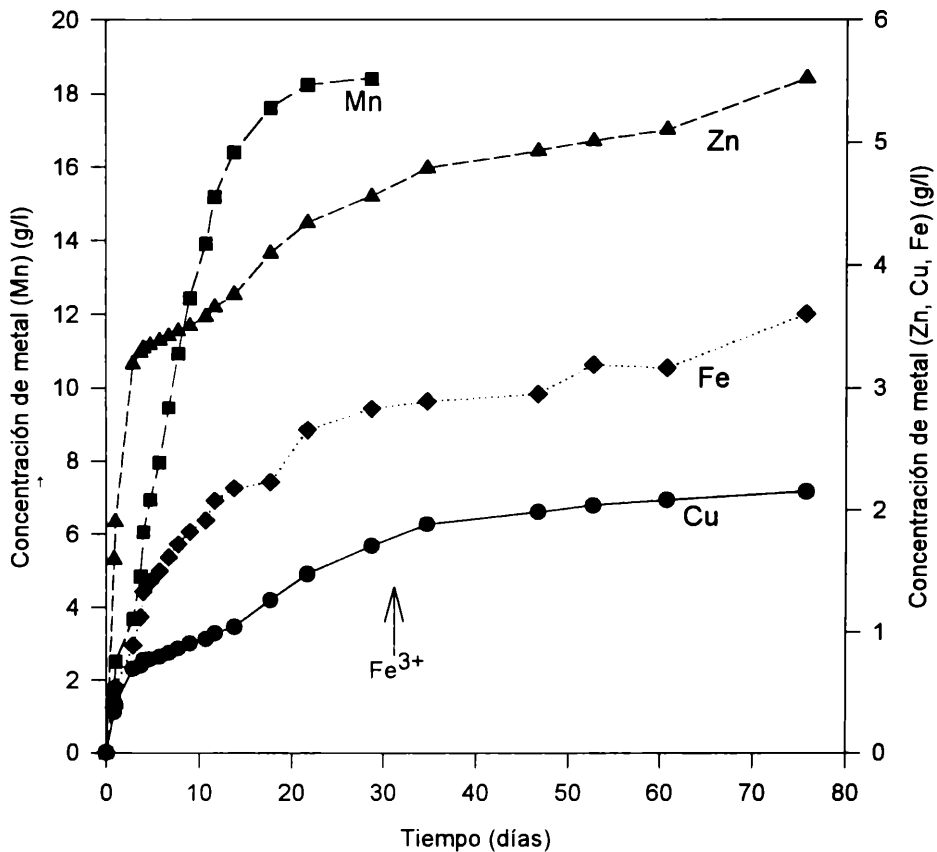
Se determinó plata total por absorción atómica, en los lixiviados obtenidos por disgregación total del mineral por ataque de soluciones concentradas de HNO<sub>3</sub>, HCl, HF y HClO<sub>4</sub>, en caliente. También se determinó plata en los lixiviados producidos por cianuración del mineral sin tratamiento previo y después de la biolixiviación. Para ello, se puso en contacto el mineral con Ca(OH)<sub>2</sub> (1 g por cada 100 g de mineral) y con NaCN (2 g por cada 100 g de muestra) a una densidad de pulpa del 50 % (g de mineral por cada 100 ml de solución) y a un pH inicial igual a 11. Se mantuvo en aireación forzada por 24 hs y agitación bajo campana, a una temperatura de 25 °C.

El cobre(II) y el hierro total soluble, fueron determinados por un equipo de absorción atómica. Se realizaron difractogramas de rayos X de los residuos sólidos obtenidos luego de la biolixiviación.

### *13.2.2. Discusión de los resultados experimentales*

En la figura 13.1 se muestra la evolución de las concentraciones de cobre, cinc, hierro y manganeso durante la experiencia. La concentración de hierro es la total soluble y se le ha descontado la eventualmente aportada con los medios. La flecha a los 29 días indica el instante a partir del cual se comenzó a agregar medio conteniendo hierro(III), proveniente del bio-reactor con *T. ferrooxidans*, acidificado eventualmente con medio proveniente del bio-reactor con *T. thiooxidans*. Antes de los 29 días solo hubo agregado de medio ácido proveniente de este último bio-reactor.

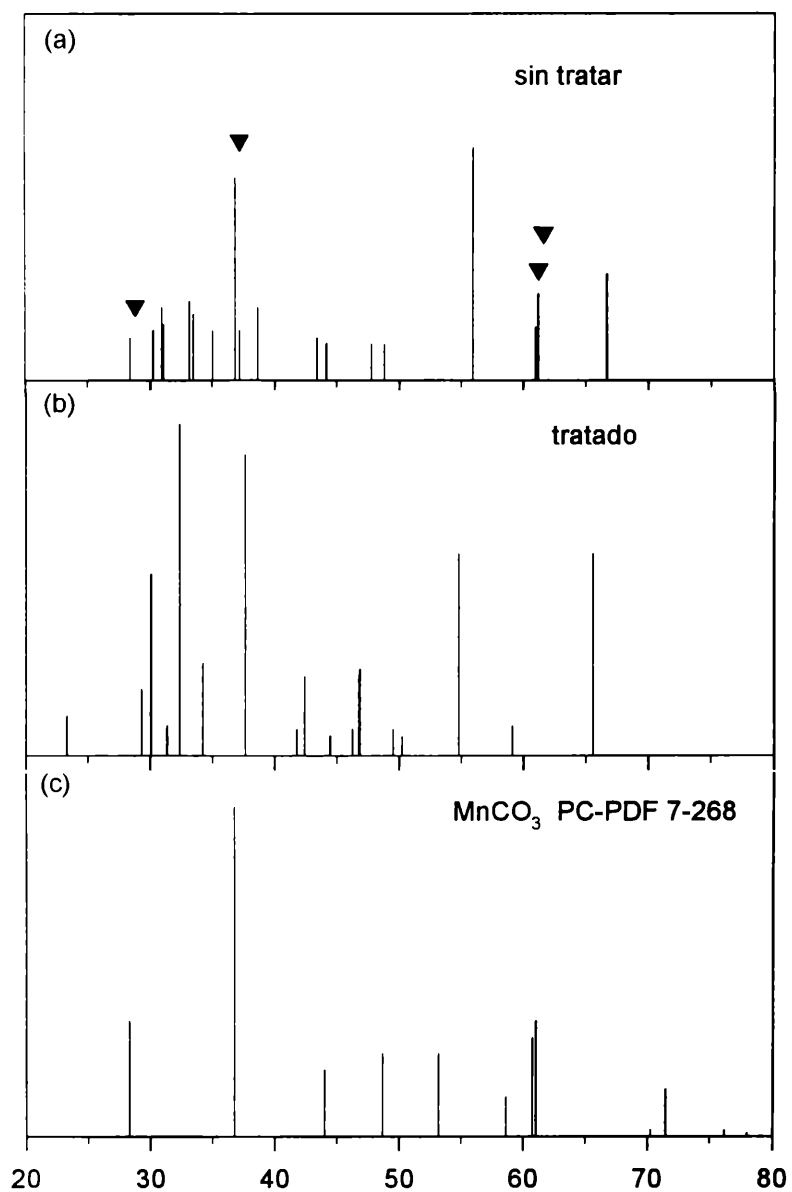
FIGURA 13.1. Concentración de cobre(II), zinc(II), hierro (total soluble) y manganeso(II) extraído del mineral Capillitas por biolixiviación indirecta combinada.



Puede observarse en el gráfico que la extracción de manganeso alcanza el máximo valor (que corresponde aproximadamente a un 100 % de extracción) incluso antes de comenzar el agregado de medio oxidante, es decir, la extracción es casi exclusivamente debida a la acción ácida. Esto descarta inmediatamente que el manganeso se encontrase presente bajo formas no solubles en medio ácido como la pirolusita.

El espectro de difracción de rayos X, que aparece en la figura 13.2, muestra que la principal especie mineralógica de manganeso es la rodocrosita (carbonato de manganeso). En efecto, las líneas de difracción ubicadas en  $2\theta = 28,4$ ,  $36,8$ ,  $60,4$  y  $61,2$  (en la figura 13.2 (a) se encuentran señaladas) fueron identificadas como correspondientes al  $MnCO_3$  ( $MnCO_3$  PC-PDF 7-268). En los residuos de la lixiviación, luego del ataque ácido, no fueron localizadas dichas líneas, por lo que se ratifica que todo el manganeso fue disuelto.

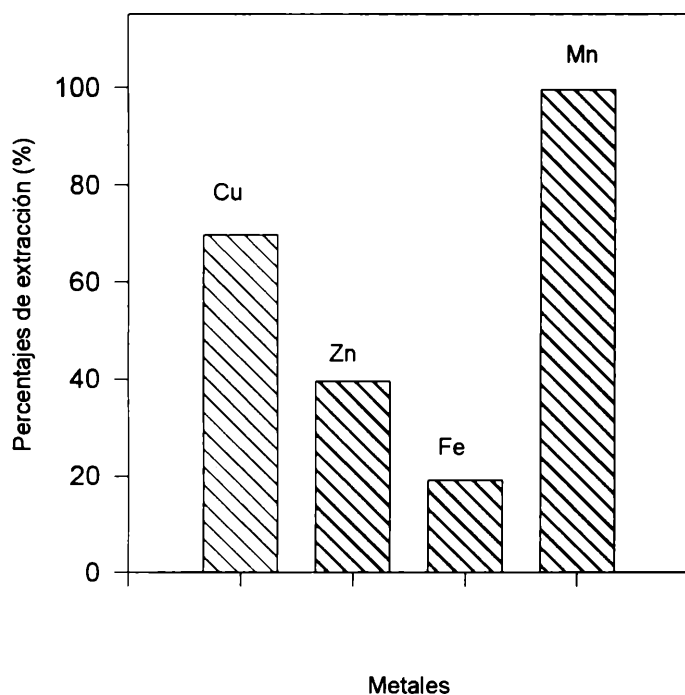
FIGURA 13.2. Difractograma de rayos X de Capillitas



- Referencias:
- a) Mineral antes del ataque
  - b) Mineral después del ataque ácido
  - c) Rodocrosita pura

A diferencia de lo ocurrido con manganeso, la extracción de los otros metales se incrementó ligeramente con el agregado de medio con hierro(III). Los porcentajes de extracción para cada metal, luego de 75 días de lixiviación, se muestran en la figura:

FIGURA 13.3. Porcentajes de extracción de cobre(II), zinc(II), hierro y manganeso(II) luego la bio-lixiviación indirecta del mineral de Capillitas.



Esta experiencia muestra un alto consumo de ácido por parte del mineral: en términos de cantidad de metal recuperado, el consumo de ácido sulfúrico es 15,2 kg, 1,8 kg y 5,1 kg de ácido sulfúrico por kg de cobre, de manganeso y de cinc, respectivamente. Este alto consumo de ácido puede disminuir su incidencia en el costo del proceso si, como se hizo en este trabajo, la generación de ácido se hace por vía microbiana utilizando solo azufre.

Además, se probó el efecto que tienen los diferentes lixiviados sobre la actividad bacteriana. Para ello se determinó la velocidad de oxidación de hierro(II) por *T. ferrooxidans* en presencia de los lixiviados; se detectó una disminución parcial de la actividad bacteriana para los lixiviados de los tres primeros contactos entre medio ácido previamente generado y el mineral. Esto demuestra que existe/n ion/es tóxico/s presentes en el mineral, que se disuelven rápidamente y que pueden inhibir la actividad bacteriana.

Este mineral contiene aproximadamente 55,2 ppm de plata (determinado por disgregación total del mineral). La cianuración del mineral sin tratar permitió una

extracción de plata en los lixiviados de  $10,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  de mineral (19,6 % de extracción) mientras que la misma operación sobre el mineral previamente tratado por acción bacteriana, arrojó el valor de 16,2 mg de plata (29,4 % de extracción). En ambos casos, las extracciones fueron poco eficaces pero esto podría deberse a las condiciones experimentales usadas y/o a un tiempo insuficiente del proceso de cianuración. No obstante, ambas cianuraciones fueron realizadas de modo absolutamente semejante, por lo que, evidentemente, una previa acción bacteriana permite incrementar la extracción de plata prácticamente en un 50 %.

### 13.3. CONCLUSIONES

- Una metodología de lixiviación indirecta (por generación independiente de los medios lixiviantes) y combinada (medio ácido generado por *T. thiooxidans* inmovilizados sobre azufre y medio oxidante generado por *T. ferrooxidans* inmovilizados sobre perlas de vidrio) permite mantener un medio sumamente favorable para el ataque de un mineral como Capillitas: alta concentración de hierro(III) y bajos valores de pH.
- El elevado carácter básico del mineral de Capillitas, causado por la presencia de carbonatos, fue neutralizado mediante ácido sulfúrico biogenerado a muy bajo costo.
- El manganeso, presente como rodocrosita, es extraído completamente del mineral solo por acción ácida, mientras que los otros metales (cobre, hierro y cinc) aumentan su disolución (hasta valores de aproximadamente 70, 20 y 40 % respectivamente en 75 días de experiencia) en presencia de un oxidante.
- Es posible incrementar la extracción de plata luego del proceso bacteriano. Esto probablemente obedezca a que parte de la plata se encuentra inicialmente ocluida en especies atacables por las bacterias.
- La metodología usada evita el ascenso brusco del pH, la consecuente precipitación de los metales y la formación de jarosita que impediría el posterior ataque. Además, evita el contacto entre los lixiviados y las bacterias que, tal cual fue demostrado para los primeros lixiviados, contiene especies que inhiben el crecimiento bacteriano.

## CONCLUSIONES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

En este trabajo se ha comprobado que las velocidades específicas de crecimiento de las células de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre hierro(II) no se modifican significativamente al estar el microorganismo adherido a diferentes soportes inertes tales como perlas de vidrio, silicagel o ganga de mineral. Sin embargo, la presencia de estos soportes altera esencialmente los procesos de hidrólisis y precipitación de compuestos de hierro(III) ya que las bacterias adheridas en cierta proporción a los soportes, provocan una interfase a su alrededor con elevada concentración de hierro(III) y de alto pH apta para la precipitación de jarosita y, en menor medida de oxohidroxos de hierro(III). Este fenómeno es estrictamente dependiente de la densidad de pulpa del soporte presente.

La adherencia de las bacterias a diversos soportes para la formación de bio-películas (de especial importancia para aplicaciones de la lixiviación bacteriana en las cuales sea imprescindible el uso de una metodología indirecta en la cual el mineral no está en contacto directo con los microorganismos), está significativamente influenciado por estos depósitos de jarosita que arrastran la mayor parte de las bacterias presentes en el cultivo. Mas aun, las escasas referencias a la importancia de la jarosita en la formación de las bio-películas, proponen un modelo en el cual estos depósitos están fuertemente adheridos sobre el soporte cuando, en realidad, la mayor parte de la jarosita (y por ende, de las bacterias) no está depositada sobre los soportes, al menos, en sistemas con fuerte agitación.

Se comprobó que la presencia de exopolímeros adheridos débilmente a la superficie de las células de *T. ferrooxidans* (y fácilmente extraíbles por centrifugación) incrementa la adherencia sobre sólidos relativamente hidrofílicos como la covelita pero la disminuye para otros más hidrofóbicos como el azufre. Esto trae como consecuencia una disminución de la velocidad de bio-lixiviación de covelita aunque la habilidad es restaurada al cabo de unos pocos días en los cuales la capa de exopolímeros es producida nuevamente aun en ausencia de hierro (oponiéndose a observaciones anteriores de otros autores).

Se ha estudiado el mecanismo anaeróbico de crecimiento del *T. ferrooxidans* en presencia de un aceptor electrónico alternativo de electrones como el hierro(III). Se ha comprobado, utilizando para ello un sistema modelo como la covelita en presencia de hierro(III), que este mecanismo opera efectivamente dentro de una "pila" en las zonas por debajo de la superficie en las cuales la concentración de oxígeno es casi insignificante. Este mecanismo es bastante más lento pero de mayor recuperación de cobre que el mecanismo aeróbico en presencia de hierro, ya que se evita la precipitación de jarosita que, en este último mecanismo, termina deteniendo el proceso de biolixiviación.

La bio-lixivación de varios minerales utilizando *T. ferrooxidans* o *T. thiooxidans* con o sin agregados de hierro(II) o hierro(III), permitió comprobar que *T. thiooxidans* es capaz de lixiviar en mayor proporción que *T. ferrooxidans* si existe hierro(II) presente a través de un mecanismo ya propuesto para un sulfuro puro. Este mecanismo es particularmente importante si la precipitación de hierro(III) aun en condiciones abióticas, no es demasiado elevada.

La formación de bio-películas en una columna percoladora para la producción de medio oxidante (hierro(III)) fue estudiada para *T. ferrooxidans* sobre perlas de vidrio, silicagel y mineral de Bajo La Alumbraera, en modo batch. En estas experiencias se comprobó que se necesitan un mínimo de 3 ciclos (cada ciclo corresponde a un recambio de medio) para alcanzar una productividad de hierro(III) constante (que indica la formación de una bio-película) cuyo valor osciló, de acuerdo al soporte, entre 5 y 7 mM.h<sup>-1</sup>. El mineral debe estar previamente lixiviado para alcanzar productividades adecuadas. En las experiencias en modo continuo se alcanzó productividades entre 2 y 3 veces superiores a las alcanzadas en modo batch y con una menor precipitación de hierro(III). Las bio-películas sobre vidrio no fueron lavadas al menos hasta velocidades de dilución tan altas como 0,5 h<sup>-1</sup>.

Las células de *T. thiooxidans* fueron inmovilizadas sobre azufre elemental para la producción continua de medio ácido (ácido sulfúrico). Se requirieron aproximadamente 35 días para alcanzar una productividad de protones constante (2,8 mM.h<sup>-1</sup>).

El uso de los bio-reactores (reactores con bio-películas) fue probado en biolixiviaciones indirectas para dos casos aplicados diferentes. En el primero, el uso de un bio-reactor con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre vidrio



generando hierro(III) en forma continua, permitió incrementar la recuperación de cobre a partir del mineral de Bajo La Alumbraera hasta un 47,6 % (frente al 27,6 % alcanzado en una inoculación "in situ"), debido a que se disminuyó sustancialmente la precipitación de jarosita sobre el mineral. En el segundo se utilizó un bio-reactor con células de *T. thiooxidans* para generar ácido el cual permitió neutralizar las especies básicas del mineral de Capillitas mientras que en una segunda etapa se atacó con hierro(III) proveniente de un bio-reactor con células de *T. ferrooxidans*. De este modo, este mineral que no puede ser biolixiviado directamente sin un tratamiento ácido previo, fue atacado en forma indirecta y combinada con recuperaciones finales del 100 % de manganeso, 70 % de cobre y 40 % del cinc.

A continuación se reúnen sintéticamente los temas sobre los cuales se hallaron las conclusiones más relevantes:

- Importancia de la jarosita y del pH del medio en la formación de bio-películas con células de *T. ferrooxidans* inmovilizadas sobre diversos soportes.
- Influencia de la presencia de exopolímeros en la superficie celular, sobre la adherencia bacteriana y sobre la biolixiviación de un sulfuro muy poco soluble utilizando *T. ferrooxidans*.
- Mecanismo anaeróbico de biolixiviación utilizando *T. ferrooxidans* en presencia de un aceptor alternativo de electrones.
- Mecanismo de biolixiviación de minerales sulfurados utilizando *T. thiooxidans* en presencia de hierro.
- Uso de bioreactores en lixiviaciones combinadas e indirectas de minerales que presentan un elevado consumo de ácido o una importante precipitación de jarositas.

Los resultados de esta tesis permiten el aporte de elementos concretos para clarificar la interacción entre algunos soportes inertes (como vidrio, ganga

de mineral, silicagel) o sustratos sólidos (como azufre y sulfuro de cobre(II)) y bacterias de importancia en los procesos de lixiviación como *T.ferrooxidans* y *T.thiooxidans*. La interacción con soportes inertes (o con azufre elemental) permite analizar la potencialidad de su uso para inmovilizar *T. ferrooxidans* o *T. thiooxidans* en bio-reactores productores de medio oxidante (o de medio ácido respectivamente), los cuales pueden ser de interés cuando no es conveniente el contacto bacteria-mineral. La interacción con sulfuro de cobre(II) resulta importante cuando la metodología de lixiviación exige la interacción bacteria-mineral.

Por otro lado, los resultados de esta tesis revalorizan el rol de *T. thiooxidans* en lixivaciones en presencia de hierro, condiciones en las cuales se consideraba al *T. ferrooxidans* como el microorganismo responsable máximo de la disolución de minerales sulfurados.

Por último, la confirmación de un proceso de oxidación anaeróbico, en presencia de hierro(III), catalizado por *T. ferrooxidans* y con una alta recuperación final, abre nuevos panoramas hacia el diseño de las pilas de lixiviación relativizando la necesidad de acceso de oxígeno para lograr una adecuada actividad bacteriana.



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P

DEPOSICION.....  
A .....  
Fecha 21-08-03.....  
Inv. R..... Inv..... S 7067