

# Adaptación del Thiobacillus Ferrooxidans a sustratos conformados con especies de minerales piríticos

Thiobacillus Ferrooxidans Adaptation substrates formed with pyritic mineral species

Vladimir Arias A.<sup>1</sup>, Fernando Anaya M.<sup>2</sup>, Janet Quiñones L.<sup>3</sup>, Dánica Salazar I.<sup>4</sup>, Juan Gil R.<sup>4</sup>,  
Gustavo Jamanca L.<sup>5</sup>

Recibido: 15/07/2013 – Aprobado: 14/10/2013

## RESUMEN

En los procesos de disolución y adsorción de metales, se requieren la contribución de especies bacterianas previamente adaptadas a los ambientes específicos, con la finalidad de lograr buenos resultados (Barrie J., 2006). En la adaptación de las cepas de Thiobacillus existen diversos mecanismos y reactivos, como es el uso de medios nutrientes ideales conteniendo sustancias en función a la efectividad para lograrlo. Por tal motivo se ha modificado el medio 9k, con el objetivo de hallar un medio adecuado logrando incrementar la población bacteriana de cepa Thiobacillus Ferrooxidans aislada de la Unidad Minera Recuperada, modificando el contenido de sulfato de hierro en el sustrato y el control estricto del pH. Siendo estos valores 22.4 gr/Lt de sulfato de hierro y un pH de 1.8

A las condiciones de trabajo, en las primeras 48 horas se genera un consumo de protones de hidrogeno, lo cual reduce la acidez a 2.3 – 2.4, siendo menor el efecto a bajas concentraciones de sustrato. La producción de ácido sulfúrico por el mecanismo indirecto de oxidación bacteriana (Álvarez M. T., 2005), es apreciado del 3° día en adelante estabilizando el pH entre 1.9 a 2.0 siendo los más ácidos los que tienen mayor contenido de sustrato (44.4 g/Lt). Además, ocurre la precipitación de hidrosulfuros de hierro depende positivamente del pH y del Sulfato de Hierro, significa que siempre se tendrá producción de precipitados, en función a la cantidad de sustrato adicionado, la que se reducirá controlando la acidez del medio y evitar la inhibición de la bacteria durante el proceso de biooxidación de minerales.

**PALABRAS CLAVE:** Adaptación de bacterias, Thiobacillus Ferrooxidans, minerales piríticos, medio 9k, crecimiento bacterial.

## ABSTRACT

In the processes of dissolution and adsorption of metals, the contribution of bacterial species previously adapted to specific environments, in order to achieve good results are required. In adapting Thiobacillus strains exist various mechanisms and reagents, as is the use of substances containing ideal nutrient media according to the effectiveness to achieve. For this reason we have modified the Middle 9k, with the aim of finding an appropriate means thereby increasing bacterial population isolated from strain Thiobacillus ferrooxidans Mining Salvage Unit, modifying the content of iron sulphate in the substrate and the strict control of pH . These values being 22.4 g / Lt iron sulfate and a pH of 1.8

A working conditions in the first 48 hours consumption of hydrogen protons is generated, which reduces acidity 2.3 - 2.4, with much less effect at low substrate concentrations. The production of sulfuric acid by the indirect mechanism of bacterial oxidation is appreciable 3rd day on stabilizing the pH between 1.9 to 2.0 being the most acidic those higher content of substrate (44.4 g /l). Furthermore, the precipitation of iron occurs depends hydrosulfides positively pH and iron sulphate production means will always precipitates, depending on the amount of added substrate, which is reduced by controlling the acidity of the medium and avoid inhibition of the bacteria during the biooxidation process minerals.

**Keywords:** Adaptation of bacteria, Thiobacillus ferrooxidans, pyritic minerals, 9k medium, bacterial growth

<sup>1</sup> Responsable del Laboratorio de Biometalúrgia, EAP Ingeniería Metalúrgica, UNMSM. : variasa@unmsm.edu.pe.

<sup>2</sup> Docente de la EAP Ingeniería Química, UNMSM. fanayam@unmsm.edu.pe.

<sup>3</sup> Docente de la EAP Ingeniería Geológica, UNMSM. lourdesjanetq@yahoo.com

<sup>4</sup> Estudiantes de pregrado de Ingeniería Metalúrgica e Ingeniería Química.; sjuan\_remi\_12@hotmail.com, danica1434@hotmail.com

<sup>5</sup> Estudiante de posgrado en Ciencias con mención en Geometalúrgia. gjamank\_met@live.com



Buscando reducir la variabilidad se realizó 2 réplicas en cada punto y para la condición blanco, teniendo un total de 18 observaciones.

**Tabla N° 1.** Detalle de variación de pH y concentración del medio según el diseño factorial

<b>Puntos de diseño</b>	<b>pH</b>	<b>FeSO<sub>4</sub> g/Lt</b>	<b>Inóculo (ml)</b>
1	1.84	22.4	10
2	1.84	44.4	10
3	2.04	22.4	10
4	2.04	44.4	10
5	1.94	33.4	10
Blanco	1.94	33.4	0

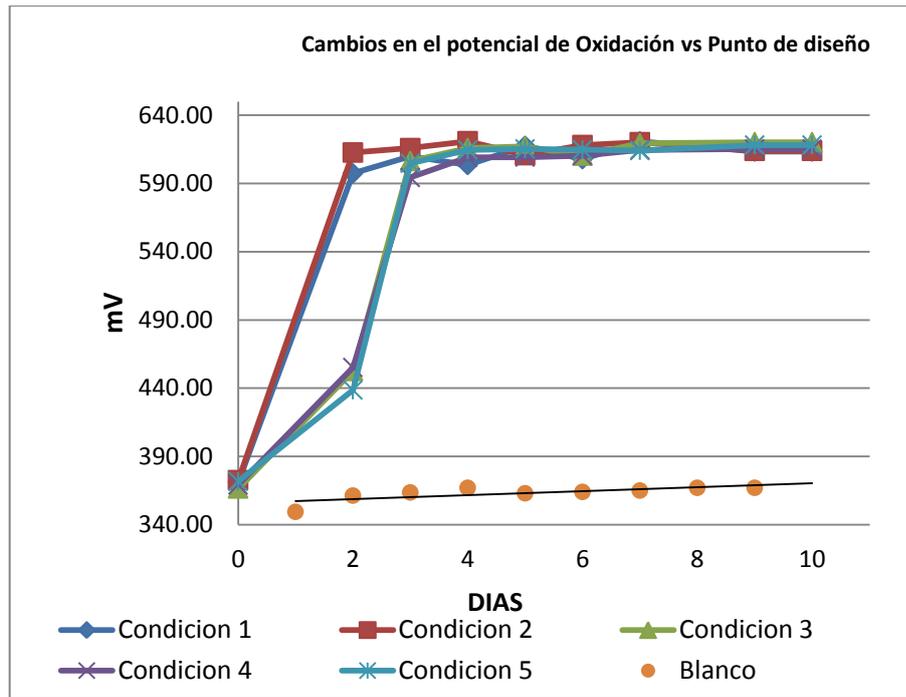
La inoculación se efectúa a 90 ml de medio 9k modificado con 10 ml de cepas aisladas de efluentes ácidos de unidades de producción minera.

### **2.1. Potencial del medio de adaptación**

La unidad de medida para identificar la evolución favorable en las interacciones fue el cambio de potencial de medio, determinándose un rango de variación inicial de 369.1 a 372.6 mV. con limitada influencia de las unidades de las variables consideradas (cantidad de sulfato ferroso y pH del medio). La evolución a condiciones aeróbicas mas la presencia de la bacteria determina la variación del potencial de oxidación y la acidez del medio.

**Tabla N° 2.** Lecturas de potencial del medio en función al tiempo transcurrido (días).

<b>Puntos de diseño</b>	<b>Cambios en el Potencial (mV) por día.</b>							
	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
1	371.1	597.4	609.9	603.6	617.6	607.9	620.8	613.4
2	372.6	612.7	615.9	621.0	610.8	618.2	620.3	613.9
3	366.5	452.6	606.5	615.9	617.1	610.4	619.6	620.3
4	369.1	455.2	594.4	609.1	609.3	610.4	614.7	615.3
5	371.8	438.7	604.8	614.6	615.4	614.8	614.1	618.2
Blanco	349.40	361.30	363.60	367.00	363.00	364.00	365.00	367.00



**Figura N° 2.** Cambios en el potencial de oxidación (mV) en función a las condiciones de cada punto.

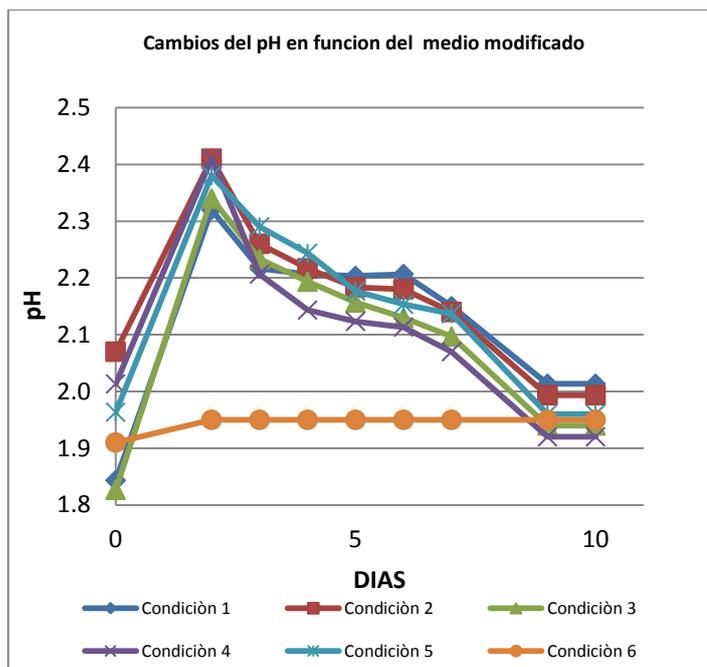
La evolución durante los 3 primeros días es determinada por las condiciones del medio que resulta de particular interés para determinar las fases de latencia y crecimiento bacteriano en medios 9k modificados y, lográndose un relativo equilibrio a partir del 4to. día de cultivo.

## 2.2. Cambio de pH del medio

Durante las primeras 48 horas en general se aprecia disminución de la acidez y de manera más atenuada en medios con menor contenido de sulfato ferroso y, posteriormente por la actividad bacteriana y específicamente por el mecanismo indirecto de oxidación bacteriana se genera el ácido sulfúrico y consecuentemente el incremento del grado de acidez.

**Tabla N° 3.** Lecturas de pH del medio.

Puntos de diseño	Cambios en el pH por día							
	0	2	3	4	5	6	7	8
1	1.84	2.32	2.22	2.21	2.20	2.21	2.15	2.01
2	2.07	2.41	2.26	2.22	2.18	2.18	2.14	1.99
3	1.83	2.34	2.23	2.19	2.16	2.13	2.10	1.94
4	2.01	2.41	2.21	2.14	2.12	2.11	2.07	1.92
5	1.96	2.38	2.29	2.24	2.18	2.15	2.14	1.96
Blanco	1.91	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95



**Figura N° 3.** Cambios de pH para cada una de las condiciones del diseño.

La velocidad de oxidación inicial depende casi en su totalidad de la concentración de Sulfato de hierro, negativamente. El pH tiene un leve efecto positivo sobre la oxidación. El crecimiento bacteriano de la cepa aislada de Thiobacillus Ferrooxidans es bien representado por las variables seleccionadas: Contenido de Hierro en el sustrato nutriente y pH del medio líquido.

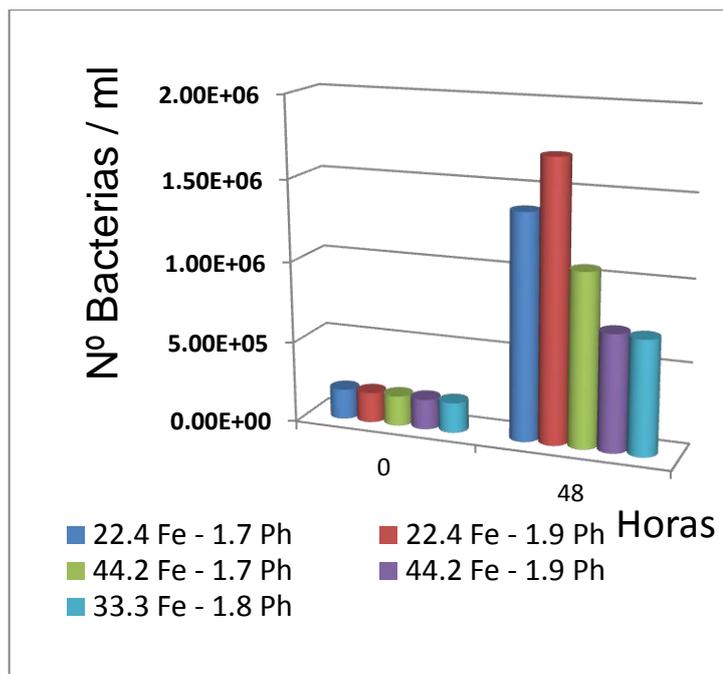
### 2.3. Análisis estadístico del diseño experimental

La agrupación de datos en una correlación lineal permite obtener un  $R^2$  de 0.995. La significancia de variables se analiza mediante el estadístico t Student. Ver tabla N° 4

**Tabla N° 4.** Resultados para la correlación lineal a partir del diseño experimental.

	<b>Coefficientes</b>	<b>Error Típico</b>	<b>Estadist. t</b>
Intercepción	153.29	15.16	0.995
pH	18.52	7.5	2.5
FeSO <sub>4</sub>	-3.31	0.07	-46.3

El conteo bacteriano que nos sirvió para obtener diferenciación y mayor crecimiento bacteriano y para la correlación experimental de los resultados, fue realizado a muestras luego de 48 horas de agitación. Las bacterias identificadas como A. Ferrooxidans fueron contadas con el apoyo de un microscopio trinocular con objetivo de 1000X. Se seleccionaron áreas aleatorias de  $0.1\text{mm}^2$ , en un portaobjeto con  $1.0\text{cm}^2$  de área y  $6 \times 10^{-3}\text{ml}$  de volumen. Se observa además cristales en la muestra. El mayor crecimiento bacteriano se da a menor cantidad de sustrato y a pH alto validando las conclusiones indirectas mediante velocidad de oxidación.



**Figura Nº 4.** Crecimiento bacteriano a las condiciones establecidas, determinado en unidades/ml de sustrato de cultivo.



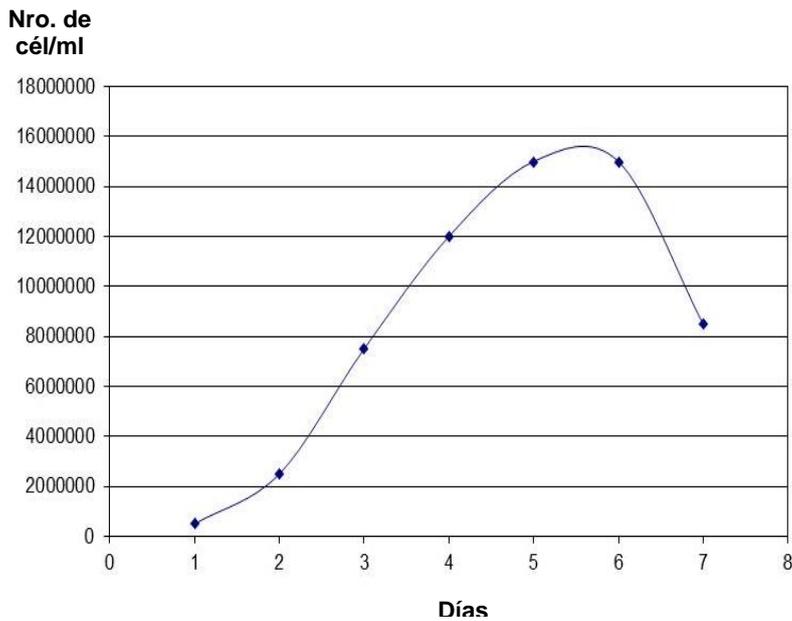
**Figura Nº 5.** Medio 9K modificado. Condición 1, 2, 3, 4 y 5. Tiempo de cultivo 3 días.



**Figura Nº 6.** Inicio de la precipitación de hidrosulfuros. Muestras de bacterias a distintas condiciones. Tiempo de cultivo 8 días.

## 2.4. Determinación del ciclo de crecimiento.

El crecimiento de *Thiobacillus Ferrooxidans* se identificó a partir del cultivo realizado a partir de Drenaje Acido de Mina, utilizando un sustrato conteniendo 33.33% de sulfato ferroso. El crecimiento se determina por recuento directo utilizando la cámara de Petroff-Hauser en un microscopio de contraste de fases (Leica®) a 1000 aumentos. La cepa alcanza la fase estacionaria de crecimiento a los cinco días. A los siete días se presenta la precipitación de hidrosulfuros y la caída del potencial. En la figura 5, se muestra la cinética de crecimiento.



**Figura N° 7.** Cinética de crecimiento de *T. Ferrooxidans* aislada a partir de drenaje ácido de Mina, utilizando un sustrato conteniendo 33.33% de sulfato ferroso. Se muestra que la cepa alcanza la fase estacionaria de crecimiento a los cinco días.

**Tabla N° 5.** Ensayos de oxidación realizados para la determinación del ciclo de crecimiento.

Condición	pH	FeSO <sub>4</sub> g/lt	Inóculo (ml)	Tiempo de oxidación (hasta 525 mV)
Anterior	1.51	33.3	10	80 – 96 horas
Modificado	1.84	44.4	10	48 – 60 horas

## III.- ADAPTACIÓN DE LA BACTERIA EN PRESENCIA DE SULFUROS METÁLICOS

Identificado el medio 9k modificado en su contenido de hierro y a un pH favorable, se buscó su adaptación en presencia de minerales conteniendo diversos sulfuros de hierro con abundancia de calcopirita, cuya distribución mineralógica es presentada en la tabla N° 6

**Tabla N° 6.** Distribución de especies minerales.

<b>Minerales</b>	<b>Contenido, %</b>
Calcopirita	33.66
Pirrotita	31.00
Esfalerita	4.43
Arsenopirita	0.65
Goetita	1.21
Pirita	1.28
Covelita	0.12
Galena	0.36
gangas	27.29

El proceso de adaptación presenta ciertas dificultades por la presencia de compuestos inhibidores al desarrollo bacteriano (Semenza, G. et. al., 2000), siendo ellos los sulfuros de arsénico y plata.

Las pruebas consistieron en la adaptación de la cepa bacteriana a distintos medios con diferente cantidad de sulfato ferroso y mineral sulfurado pirítico (Akçil A. et al., 2007). Se consideró un % en peso de la pirita y se varió la cantidad de sulfato de hierro, a medida que el % de sulfato de hierro baja, la cantidad de pirita aumenta en la muestra.

La evolución o avance de la fase de adaptación se determina por la variación del potencial (Juan O. y col; 2012), determinándose que por encima de 500 mV ocurre un marcado crecimiento bacteriano. En este caso, se logra mantener constante por varios días como señal de existe una oxidación de  $Fe^{++}$  a  $Fe^{+++}$  dando un crecimiento bacteriano y luego la inhibición y muerte debido a la saturación del medio y por agotamiento de los nutrientes en el medio.

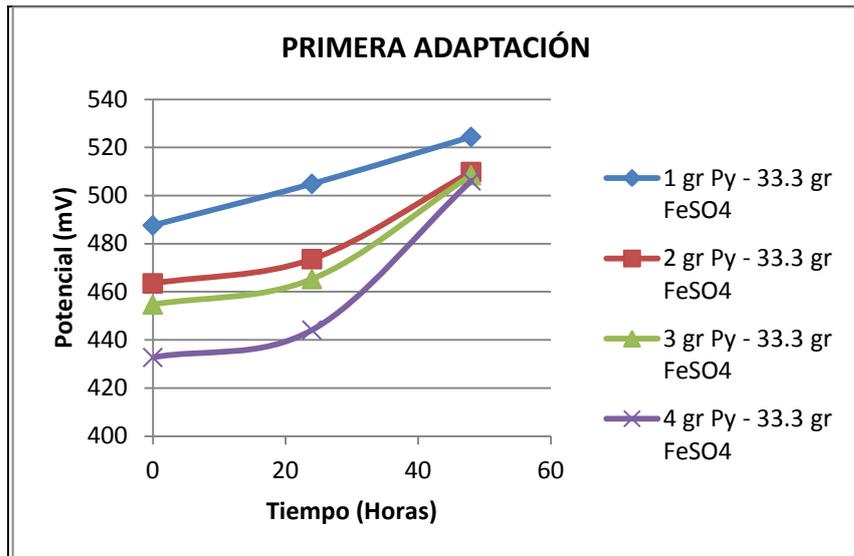
### **3.1. Ensayos de adaptación**

Se realizaron 3 ensayos para evaluar el nivel de adaptación de las cepas bacteriana.

**Primera adaptación.-** Se consideró 4 muestras de mineral pulverizados 100% a -400M, Medio conteniendo 33.3 gr/Lt de sulfato de hierro

**Tabla N° 7.** Variación del Potencial (mV) en sustratos con sulfuros metálicos (grs.).

<b>Mineral (grs.)</b>	<b>0 Hrs.</b>	<b>24 Hrs.</b>	<b>48 Hrs.</b>
<b>1</b>	488	505	524
<b>2</b>	464	474	510
<b>3</b>	455	465	509
<b>4</b>	433	444	506



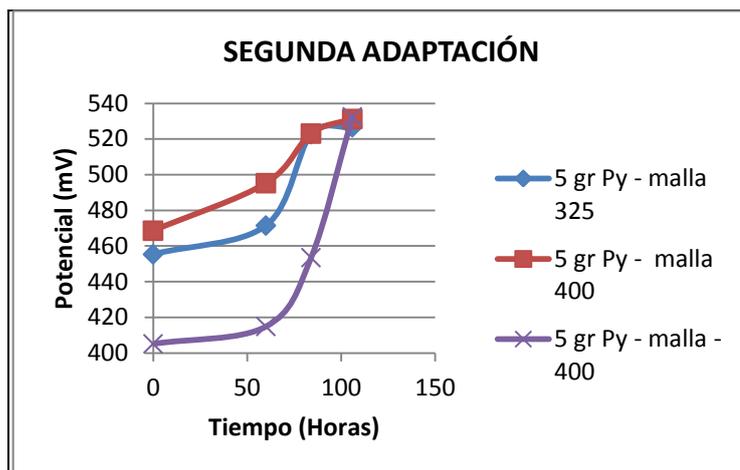
**Figura N° 8.** Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita.

En la figura N° 8 se puede observar un considerable aumento del potencial en la muestra que tiene 1 gramo de mineral, esto debido a que presenta menos daño a la bacteria a causa de la fricción que hay entre las partículas de mineral y la bacteria, determinándose que a mayor cantidad de mineral, hay mayor inhibición de la bacteria, por la fricción, por la cantidad de arsénico.

**Segunda adaptación.-** A partir de una fracción granulométrica, utilizado tamices Nros. 200, 325 y 400 de la serie Tylor, respectivamente. Se tomó 5 gramos de mineral para cada ensayo en un medio conteniendo 11.1 gr/Lt de sulfato de hierro.

**Tabla N° 8.** Variación del Potencial (mV) en función a la granulometría del mineral sulfurado.

Mineral sulfurado	0 Hrs.	60 Hrs.	84 Hrs.	106 Hrs.
Malla -200+325	455	472	522	526
Malla -325+400	469	495	523	531
Malla -400	405	415	453	532



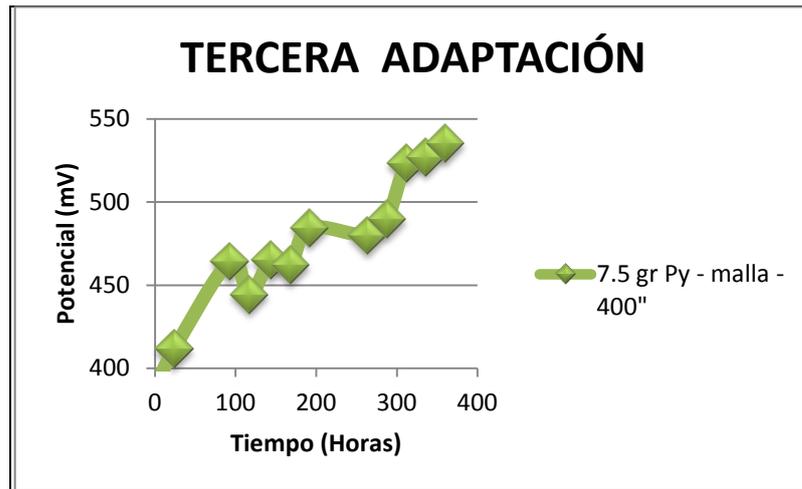
**Figura N° 9.** Cambios del potencial de oxidación en función del tamaño de partícula.

En la figura Nro. 9 se puede observar que el mineral sulfurado pulverizado a malla -400 presenta una respuesta favorable por la concentración de sulfuros y la reducida fricción sobre las bacterias.

**Tercera adaptación.-** El ensayo se realizó con mineral pulverizado a -400M (-35 $\mu$ m), utilizando 7.5 gr. de material, teniendo en consideración que los minerales residuales o relaves de cianuración se encuentran finamente pulverizados (80% -400M), y contienen tenores considerables del metal valioso. Medio conteniendo 5.55 gr/Lt de sulfato de hierro.

**Tabla N° 9.** Evolución del potencial del medio con 7.5 gramos de mineral pulverizado a -35 $\mu$ m.

Hora	Potencial, mV
0	387.6
24	411.7
93	464.3
117	444.4
144	465.1
168	462.3
192	484.5
264	479.8
288	489.7
312	523.4
336	527.1
360	535.3



**Figura N° 10.** Cambios del potencial de oxidación en función de la cantidad de pirita a la malla -400.

Finalmente, la variación del potencial y el prolongado tiempo de adaptación nos indica el grado de dificultad que se tuvo al adaptar la bacteria, se puede ver momentos en los cuales la bacteria se inhibe, esto debido a la abundante masa de mineral concentrado, la fricción del mineral con la bacteria, la presencia de compuestos arsenicales y otros factores que provocan la inhibición en el crecimiento de la bacteria.

#### IV. CONCLUSIONES

1. El medio de cultivo 9k es ideal para el aislamiento y cultivo de cepas de *Thiobacillus Ferrooxidans*. Su nivel de adaptación a las nuevas condiciones es proporcional a la cantidad de resiembras realizadas y a las condiciones de los sustratos a los cuales son sometidos con la posibilidad de hacer modificaciones.
2. El crecimiento bacteriano de una cepa *Thiobacillus Ferrooxidans* aislada de la Unidad minera Recuperada, es determinada por el contenido de sulfato de hierro en el sustrato y el control estricto del pH. Siendo estos valores 22.2 gr/Lt y 1.8, respectivamente. Proponiéndose un medio 9k modificado.
3. La selectividad del medio sólido es favorecida por la distinción macroscópica de las colonias de *Thiobacillus Ferrooxidans* lo que permite su extracción manual y mejora el nivel de aislamiento. Una cepa pura es capaz de obtenerse en no menos de 4 resiembras en medio alternado sólido/ líquido.
4. En todas las condiciones en las primeras 48 horas se genera un consumo de protones de hidrógeno, lo cual reduce la acidez a 2.3 – 2.4, siendo menor el efecto a bajas concentraciones de sustrato. La producción de ácido sulfúrico por el mecanismo indirecto de oxidación bacteriana es apreciable del 3° día en adelante estabilizando el pH entre 1.9 a 2.0 siendo los más ácidos los que tienen mayor contenido de sustrato (44.4 g/lit).
5. La producción de precipitado de hidrosulfuros de hierro depende positivamente del pH y del Sulfato de Hierro, significa que siempre se tendrá producción de precipitados, en función a la cantidad de sustrato adicionado, la que se reducirá controlando la acidez del medio.

## V. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación, que a través del Consejo Superior de Investigaciones, financió económicamente para la realización de los proyectos de Estudio N° 121601071 y PMI2012L01 y; también, agradecemos a cada uno de los integrantes del grupo de estudio en **Biología Metalúrgica**, por su entrega en la realización de las tareas que implicaron la consecución de los objetivos de grupo.

## VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Akcil A., Ciftci H., Deveci H. (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering*. 20: 310–318.
2. Alvarez M. T. (2005). Microbial Treatment of heavy metal leachates. Doctoral thesis. Suecia.
3. Arias Arce V. y col. (2013). Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. *Revista de Investigaciones, RIIGEO. UNMSM*. Vol 15 N° 30, pgs. 59-66
4. Barrie J. (2006). Biohydrometallurgy and the environment: Intimate and important interplay. *Hydrometallurgy*, 83: 153-166.
5. Brahma Prakash G.P., Devasia P., Jagadish K.S., Natarajan K.A., Rao G.R. 1988. Development of *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 strains tolerant to copper and zinc. *Bulletin of Materials Science*. 10:461–465.
6. Das A., Modak J.M., Natarajan K.A. 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73(3): 215–222.
7. Gomez C., Blazquez M.L., Ballester A. 1999. Bioleaching of a Spanish complex sulphide ore bulk concentrate. *Minerals Engineering*. 12: 93–106.
8. Jamanca Lino G. y col. (2013). Aislamiento de *Acidithiobacillus Ferrooxidans* y su aplicación a sulfuros mixtos. Congreso Internacional, V Latinometalurgia. Cuzco, Perú
9. Juan O., Erica M., Laura O., Marco M., Alvaro M. (2012). Biooxidación de concentrados de arsenopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en erlenmeyer agitados. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIV No. 1 Julio 2012 135-145
10. M. Semenza, G. Curutchet, M. Viera y E. Donati, (2000). Importancia de *Thiobacillus caldus* en la lixiviación de sulfuros metálicos. Jornadas SAM 2000 - IV Coloquio Latinoamericano de Fractura y Fatiga. CINDEFI-CONICET, La Plata, Argentina. Pgs. 47 y 115
11. Marhual N.P., Pradhan N., Kar R.N., Sukla L.B., Mishra B.K. 2008. Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample. *Bioresource Technology*. 99: 8331–8336.
12. Mason L.J., Rice N.M. 2002. The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nickel–iron sulphide concentrates. *Minerals Engineering*. 15: 795–808.
13. Mousavi S.M., Yaghmaei S., Vossoughi M., Jafari A., Roostaazad R., Turunen I. 2007. Bacterial leaching of low-grade ZnS concentrate using indigenous mesophilic and thermophilic strains. *Hydrometallurgy*. 85: 59–65.
14. Xia L., Liu J., Xiao L., Zeng J., Li B., Geng M. and Qiu G. 2008. Single and cooperative bioleaching of sphalerite by two kinds of bacteria—*A. ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*. 12: 190–195.