

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO MICROBIANO Y LA BIOLIXIVIACIÓN SOBRE LA CALCOPIRITA POR UN CULTIVO MICROBIANO BIOLIXIVIANTE

EFFECT OF TEMPERATURE ON MICROBIAL GROWTH AND BIOLEACHING CHALCOPYRITE ON CULTURE BY MICROBIAL BIOLIXIVIANTE

¹ Sandra Verónica Delgado Cruz; ² Daladier Castillo Cotrina

RESUMEN

Se determinó el efecto de la temperatura y el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante, para lo cual se trabajó con muestra de los botaderos de las pilas de lixiviación de la empresa minera Southern Perú Cooper Corporation. Se tuvo 4 tratamientos experimentales de 25, 40, 55 y 70°C, con una doble repetición. El tratamiento que obtuvo una mayor biooxidación de hierro II, biolixiviación de cobre y mayor concentración microbiana, fue el tratamiento experimental de 70°C; la concentración microbiana fue de 8,20411998 unidades logarítmicas de cel/ml a las 312 horas, la biolixiviación de cobre máxima fue de 0,275038931 g/l. El grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano y la biooxidación del hierro tuvo un valor de 0,922207698; la correlación entre la biooxidación del hierro y la biolixiviación de cobre fue de 0,882478032.

Palabras clave: Biolixiviación, biooxidación, calcopirita, microorganismos biolixivantes.

ABSTRACT

The effect of temperature and degree of correlation in microbial growth and bioleaching of chalcopyrite for biolixivante microbial culture was determined, for which worked with sample dumps heap leach mining company Southern Peru Copper Corporation. Four experimental treatment of 25, 40, 55 y 70°C were performed with a double repetition. The treatment had a higher biooxidation iron II, copper bioleaching microbial higher concentration, the experimental treatment was 70 ° C; microbial concentration was 8,20411998 log units of cells / ml at 312 hours, the maximum copper bioleaching was 0,275038931 g / l. The degree of correlation between microbial growth curve and the bio-oxidation of iron had a value of 0,922207698; the correlation between the bio-oxidation of iron and copper bioleaching was 0,882478032.

Keywords: Bioleaching, biooxidation, chalcopyrite, biolixivantes microorganisms.

INTRODUCCIÓN

La lixiviación es una técnica ampliamente utilizada en metalurgia extractiva que convierte los metales en sales solubles, pero que trae consigo significativos impactos ambientales, que perduran en el tiempo. La existencia de importantes recursos de baja ley que son remanentes de la explotación de minerales más ricos, sumado a los primeros indicios de agotamiento de las reservas minerales oxidadas, impulsó a los investigadores a buscar técnicas rentables y eficientes de recuperación del cobre. Esto los llevó a encontrar que ciertas bacterias catalizaban la lixiviación de los

minerales sulfurados, haciendo rentable su procesamiento (CIMM, 2005).

La utilización de estas bacterias se justifica cuando el mineral sulfurado de un yacimiento cuprífero es de baja ley o tiene menos de un 0,5% de cobre, situación en la que el proceso productivo tradicional de pirometalurgia deja de ser rentable, y se buscan nuevos procesos, más baratos y eficientes.

En la actualidad la biolixiviación se ha convertido en una tecnología alternativa, más económica y ambientalmente aceptable (Ly, 2003). La biolixiviación es un proceso en el cual se emplean microorganismos para disolver los minerales, en este caso de calcopirita, no genera contaminación

¹ Biólogo – Microbiólogo. Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna – Perú

² Magister en Ciencias con mención en Microbiología Industrial y Biotecnología, Biólogo – Microbiólogo, Jefe del Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología. Docente de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna – Perú.

ambiental y su empleo es mucho más rentable que la lixiviación normal. En nuestro país, la biolixiviación es una nueva tecnología que está siendo poco a poco implementada en los diversos yacimientos mineros. En Tacna, en el yacimiento minero de Southern Perú Cooper Corporation, la biolixiviación está dando sus primeros pasos, estando aún en la etapa de experimentación en laboratorio.

La calcopirita es el mineral más refractario y abundante de los sulfuros de cobre por lo que la metalurgia extractiva de este metal se basa principalmente en este mineral (Jeffrey y F. Lawson, 2000). Es la fuente de cobre más abundante en el mundo y es, además, uno de los minerales más recalcitrantes en los procesos de hidrometalurgia (Constanza, 2000). Por esta razón el cobre es extraído principalmente por pirometalurgia.

Diversas investigaciones han demostrado que para la realización de una mejor biolixiviación, es importante el uso de consorcios microbianos biolixivantes, ya que cada microorganismo presente en el consorcio, genera un ambiente favorable y adecuado para el desarrollo del otro, logrando una mayor interacción, un espacio adecuado para su desarrollo y su actividad lixivante (Acevedo, 2005). Entre todos los microorganismos lixiviantes presentes en los consorcios, los más empleados en biolixiviación son *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, también se encuentran *Leptobacillus ferrooxidans*, estos microorganismos presentan, entre sus características principales que pueden vivir en ambientes hasta de un pH de 1 y son quimiolitioautótrofos, ya que tienen como fuente de energía, componentes inorgánicos (Orrantía, 1997).

La biolixiviación microbiana ocurre con diferentes factores acondicionados como son el pH bajo (1-2), los nutrientes, la presencia de metales pesados, la temperatura, la luz, oxígeno y dióxido de carbono (Rivera, 2011). Claro está que antes de que ocurra un proceso de biolixiviación tiene que ocurrir la biooxidación del Hierro. La biooxidación en un proceso que ocurre antes de la biolixiviación es un pretratamiento para la extracción del cobre, en este proceso ciertos microorganismos oxidan los sulfuros a través de mecanismos de acción directa e indirecta (Segura, 1998). Estos microorganismos utilizan como fuente primaria de energía las especies reducidas de hierro y azufre, y el CO₂ como fuente de carbono para su síntesis celular (Rivadeneira, 2006). Por lo tanto existe una correspondencia directa entre la biooxidación del Hierro y la biolixiviación del cobre.

En este trabajo el objetivo fue conocer la temperatura ideal y su efecto sobre el crecimiento microbiano y la capacidad biolixivante del cultivo nativo microbiano en presencia de calcopirita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y delimitación del área de muestreo

El mineral lixiviado fue muestreado de los botaderos de lixiviación de la empresa Southern Perú Cooper Corporation, ubicada en Toquepala en el departamento de Tacna. Se seleccionaron 5 botaderos con mayor actividad microbiana. Se determinó por botadero un área estándar de 1 m² considerando puntos con actividad microbiana (Figura 1) (Arias & Piñeros, 2008).

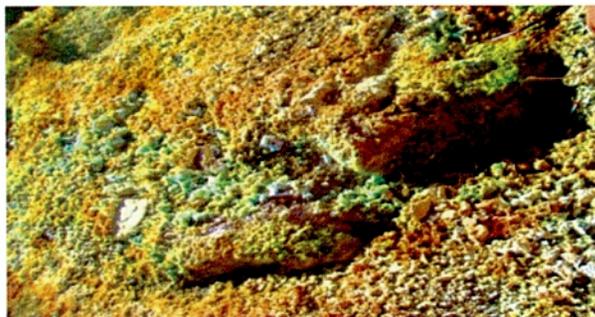


Figura 1. Área de toma de muestra

Colección de la muestra

Se colectaron un total de 5 muestras (una por botadero), cada muestra contuvo 3 kg de mineral lixiviado recogido del área de 1m² con ayuda de una pala. Estas fueron transportadas en baldes al laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann para su procesamiento.

Enriquecimiento del mineral lixiviado

Se tomó 1,5 kg del mineral lixiviado y se sumergió en 4 litros de medio líquido 9K Silverman y Lundgren modificado, a pH 1,8 ajustado con H₂SO₄, en baldes de 5L de capacidad, los cuales fueron incubados a temperatura ambiente, con una aireación de 1 vvm durante 15 días (Saavedra, 2009).

Aislamiento del cultivo microbiano biolixivante en medio sólido

En placas Petri con medio 9K sólido se incorporó 0,1 ml del cultivo de enriquecimiento de mineral y se sembró con ayuda de un asa de Drigalsky por extensión. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (25°C) durante 15 a 20 días, tiempo en que aparecieron las colonias bacterianas compatibles a *Acidithiobacillus ferrooxidans* por haber sido gram negativo y presentar precipitados de color rojo naranja.

Obtención del inóculo microbiano biolixivante

Del cultivo de enriquecimiento, se tomó 5ml y se inocular a 100 ml del medio de cultivo 9k contenido en un biorreactor de 1000cm³ de capacidad con una aireación de 1 vvm y se incubó a temperatura ambiente hasta que el cultivo estuvo en fase logarítmica, determinada por recuentos en cámara de Neubauer para observar que la dinámica de crecimiento fuera constante. Se realizó un recuento final de células en cámara de Neubauer para establecer la concentración inicial de células del inóculo.

Caracterización y preparación del mineral calcopirita a lixiviar en la experimentación

Se aplicó la técnica del cuarteo a todo el mineral para tomar una muestra significativa del mineral calcopirita. La muestra se pulverizó por molienda en el molino de bolas del laboratorio de procesos de la Facultad de Metalurgia. El mineral molido se tamizó, usando la malla Tyler 100 y se separó en cantidades de 77g.

Inicio de la experimentación

Se instalaron 12 biorreactores aireados de capacidad

Delgado, S. & Castillo D. Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante.

de 1 litro de PVC, considerando en la experimentación 4 tratamientos con 2 repeticiones y 1 control. Los 4 tratamientos experimentales fueron 25, 40, 55 y 70°C. En cada biorreactor se adicionó 700 ml del medio 9K Silverman y Lundgren modificado, 70 ml del inóculo microbiano biolixivante, 77 g del mineral calcopirita (10% del volumen total) y aireación de 1vvm (Archilla, 2005).

El tratamiento control tuvo 70 ml de medio 9K en lugar de inóculo microbiano, conteniendo todos los demás otros componentes. La incubación se realizó a la temperatura de experimentación.

Evaluación de la experimentación

a) Determinación de la concentración de biomasa (recuento celular)

Se realizó conteo celular cada 24 horas del medio contenido en cada biorreactor con previa dilución de 10^1 . El conteo se realizó con ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio de campo. Los conteos se graficaron expresados en unidades logarítmicas de cel/ml versus el tiempo, para establecer la curva de crecimiento microbiano y en ella el valor máximo de crecimiento; dado por el valor más alto de concentración microbiana.

b) Evaluación del fierro total y fierro III por método de espectrofotometría (Cabaña 2005)

Se realizó cada 48 horas desde el inicio de la fermentación en el laboratorio de Química general por un especialista.

c) Determinación de la curva patrón para determinar Fe total y Fe III

Determinación de Fe total

Se realizó una dilución de la muestra al 1/100. Se colocó 0,5 ml de la muestra diluida en tubos de ensayo, se le adicionó 0,5 ml de H_2SO_4 3M, 1-2 gota de $KMnO_4$ 0,1N y 3 ml de KSCN 2M; los tubos se enrazaron a 10 ml con agua destilada y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 477 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se llevaron a la curva patrón para determinar la correspondiente concentración.

Determinación de Fe III

Se colocó 0,5 ml de la muestra diluida y se agregó 0,5 ml de H_2SO_4 3M y 3 ml de KSCN 2M, luego se enrazó a 10 ml con agua destilada, se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 477 nm. El valor de absorbancia obtenido se llevó a la curva patrón para determinar la correspondiente concentración.

Determinación de Fe II

Se realizó por diferencia de Fe total con el Fe III:
 $Fe II = Fe total - Fe III$

d) Evaluación de la biolixiviación de cobre total por absorción atómica

Determinación del Cu

Se realizó cada 24 horas tomando del biorreactor

10ml filtrándolo con filtro de membrana N°42. El filtrado fue llevado al equipo de absorción atómica (Figura 2) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, donde se determinó la lectura. Los valores de absorbancia obtenidos se llevaron a la curva patrón para determinar la correspondiente concentración de cobre. Los valores obtenidos (g/l) se graficaron versus el tiempo para establecer la curva de biolixiviación y en ella el valor máximo de cobre biolixiviado dado por el valor más alto de concentración de cobre. Esta evaluación se aplicó solo en aquel tratamiento donde se presentó mayor biooxidación de Fe II.



Figura 2. Equipo de Absorción Atómica

e) Análisis Estadístico

Se aplicó en el programa de Excel el ANOVA para establecer la diferencia significativa entre los tratamientos de concentración microbiana como el de los de biooxidación de Fe II.

Se determinó en el programa Excel la correlación entre el crecimiento microbiano, la biooxidación del Fe II y la biolixiviación del cobre.

RESULTADOS

Determinación de concentración microbiana

Se muestra que la mayor concentración microbiana se dio a 70°C y la menor a 25°C (Tabla 1).

Se observa que la mayor concentración microbiana dada a la temperatura de 70°C se dio a las 312 horas de inicio del proceso de biolixiviación del cobre (Figura 3).

Tabla 1. Valores de máximas concentraciones microbianas en unidades logarítmicas cel/ml, con sus repeticiones y promedio obtenidas a las temperaturas de 25, 40, 55 y 70°C en el proceso de biolixiviación del cobre.

Tratamientos	Mayor concentración microbiana		
	R1	R2	Promedio
25	8	8,08278537	8,041392685
40	8,14824251	8,20394000	8,176091259
55	8,10918125	8,18307482	8,146128036
70	8,24139269	8,166847276	8,204119983

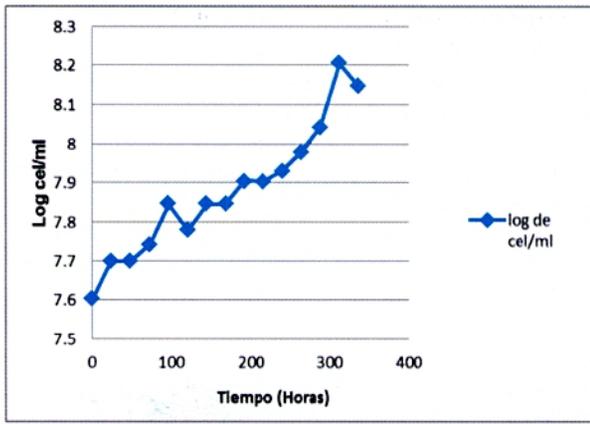


Figura 3. Curva de crecimiento microbiano a la temperatura de 70°C en la biolixiviación del cobre.

Por análisis de varianza, el Valor- P de 0,77 obtenido nos indica no hay una significancia estadística entre los valores de máximas concentraciones microbianas de los tratamientos con un 95% de nivel de confianza.

Determinación del Hierro III

Se muestra que la mayor concentración de Fe II biooxidado se dio a 70°C y la menor a 40°C (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de máximas concentraciones de Fe II biooxidado en g/L, con repeticiones y promedio a las temperaturas de 25, 40, 55 y 70°C en el proceso de biolixiviación del cobre.

Tratamientos	Hierro II		
	R1	R2	Promedio
25	6,70022703	7,42078768	7,06050736
40	5,52561445	6,66074425	6,09317935
55	5,39729543	8,73358997	7,0654427
70	10,0167802	12,9088935	11,4628369

Se observa que la mayor formación de Fe III se dio a la temperatura de 70°C, a las 144 horas después del inicio del proceso de biolixiviación del cobre (Figura 4).

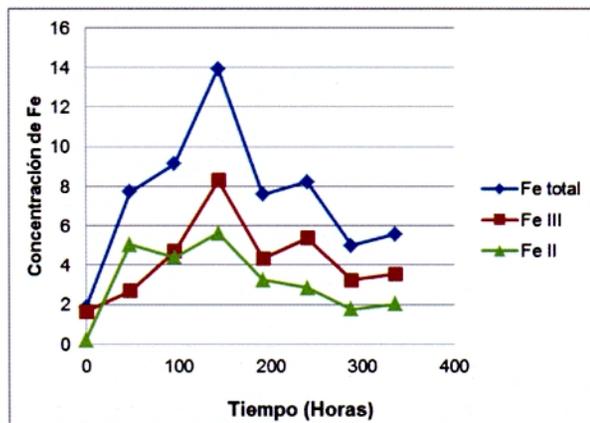


Figura 4. Curva de concentraciones del Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C del proceso de biolixiviación del cobre

Por análisis de varianza el valor- P de 0,11 obtenido nos indica no hay una significancia estadística entre los valores de máximas concentraciones de Fe II biooxidados de los tratamientos con un 95% de nivel de confianza.

Determinación de la biolixiviación de cobre

Se hizo en el tratamiento experimental donde se apreció una mayor biooxidación del Hierro II es decir en el tratamiento de 70°C.

Se observa que la mayor concentración de cobre biolixiviado fue de 0,275038931 alcanzado a las 144 horas de iniciado el proceso a 70°C (Tabla 3) (Figura 5).

Tabla 3. Valores de concentración en g/l de cobre obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C en la biolixiviación sobre la calcopirita.

Horas	Concentración de Cu (g/l)
0	0,113303503
48	0,206481244
96	0,252587175
144	0,275038931
192	0,212335653
240	0,235437898
288	0,195580611
336	0,221462222

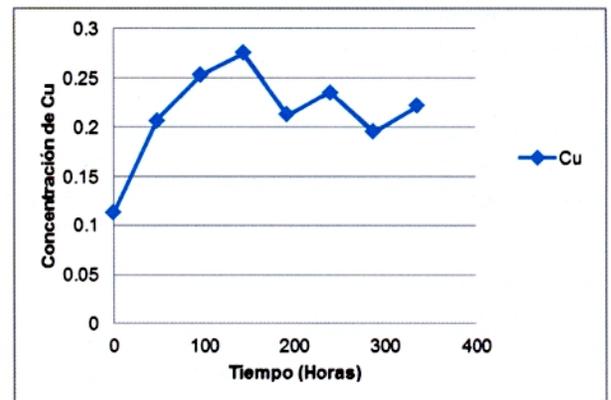


Figura 5. Curva de Concentración del Cobre obtenido en el tratamiento experimental de 70°C en la biolixiviación sobre la calcopirita.

Determinación de correlación

Se observa una correlación entre el crecimiento microbiano, la biooxidación del Fe II y la biolixiviación de cobre en el tratamiento a 70°C con un valor de alrededor de 0,9 (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de correlación entre el crecimiento microbiano, biooxidación de Fe II y la biolixiviación de Cu a la temperatura de 70°C en el proceso de biolixiviación sobre la calcopirita.

Correlación	Valores
Concentración microbiana - Concentración de Hierro III	0,922207698
Concentración microbiana - Concentración de Cu	0,964194326
Concentración de Hierro III - Concentración de Cu	0,882478032

DISCUSIÓN

La temperatura es uno de los principales factores físicos involucrados en el proceso de biolixiviación asimismo el factor biológico, el inóculo microbiano, usado en su fase logarítmica, después de cultivos sucesivos. La oxidación de Fe II por los microorganismos depende de las condiciones del medio ambiente, como también de la naturaleza cristalocómica de los minerales portadores de la fuente de energía (Juárez, 2004).

El medio líquido 9K (Silverman & Lundgren, 1959) modificado empleado para biolixivantes, fue apropiado permitió el crecimiento y desarrollo adecuado del cultivo microbiano biolixivante, hubo poca producción de jarosita en el biorreactor, esta impide el crecimiento de las bacterias y por tanto afecta la biolixiviación. La aireación de 1vvm utilizada fue la apropiada para la fermentación del desarrollo microbiano, estas bacterias necesitan un ambiente con oxígeno (1-1,5 vvm) para su crecimiento microbiano como para realizar la biolixiviación.

Una mayor concentración microbiana; $1,1 \times 10^8$ cel/ml; y de biooxidación; 12,90 g/l dados en el tratamiento experimental de 70°C, nos indica que la temperatura tuvo un efecto significativo en la cinética de disolución de la calcopirita. Es observable que al aumentar la temperatura se mejora la velocidad de disolución. A bajas temperaturas la acción de las bacterias disminuye y con ello la recuperación de cobre (Ibañez, 2012). La mayor tasa de solubilización de cobre ocurre a elevadas temperaturas (>65°C), siendo así atractivo por ello el uso de microorganismos hipertermófilos hierro y azufre oxidantes en la biolixiviación.

Estudios indican, como regla general, la velocidad de las reacciones químicas se duplica con el aumento en 10°C en la temperatura. A pesar que la velocidad de descomposición es lo suficientemente rápida en 35- 40°C para casi todos los minerales, para otros casos como calcopirita temperaturas en el intervalo 45-80°C son indispensables para hacer que el proceso sea económicamente viable (Rawling, 1994). En este trabajo al aumentar la temperatura hasta 70°C hubo un mejor crecimiento microbiano, mejor biooxidación y biolixiviación de cobre sobre la calcopirita.

En el proceso de biolixiviación realizado, se usaron consorcios microbianos. El cultivo microbiano biolixivante nativo utilizado permitió un mejor proceso de biolixiviación del cobre a partir de la calcopirita. Este cultivo es un consorcio microbiano donde los microorganismos allí presentes interactúan entre sí, algunos de estos microorganismos necesitan del producto que genera un microorganismo precursor, creando así un ambiente propicio para el desarrollo de otro; se tiene descrito por ejemplo que se mejora la oxidación del mineral cuando las poblaciones son mixtas. Los co-cultivos de *L. Ferrooxidans* y los oxidadores de azufre *T. thiooxidans* o *T. caldus* (termófilos moderados) han mostrado una más eficiente disolución de la calcopirita que en cultivos solos. El proceso de sinergismo, propicia sincronía metabólica a las bacterias termófilas moderadas *Sulfobacillus spp* y *A. Ferrooxidans* que oxidan el azufre. (Ibañez, 2012) (Orrantía, 1997).

CONCLUSIONES

En las condiciones trabajadas se concluye lo siguiente:

La temperatura produce un efecto de incremento en el crecimiento del cultivo microbiano biolixivante y en la biolixiviación del cobre a partir de la calcopirita directamente proporcional.

A la más alta temperatura de la experimentación, 70°C, se obtuvo la más alta concentración microbiana biolixivante, 8,204119983 unidades log. cel, y de cobre biolixiviado, 0,275038931 g/l.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, F. (2005). *Fundamentos y Perspectivas de las tecnologías Biomíneras*. Valparaíso, Chile: Edición universitaria de Valparaíso, pag. 25-35.
- Arias Sifuentes, E.; Piñeros Espinosa, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, 159.
- Archilla, A. (2005). Uso de Biorreactores para la Lixiviación de un mineral oxidado, Universidad Nacional de Comahue, Argentina, pag. 23-30.
- Cabaña, R. (2005). Determinación de sulfato ferroso por espectroscopia visible. Memoria. Encuentro de jóvenes investigadores, España.
- CIMM, Centro de Investigación minera y metalúrgica. (2005). Biolixiviación la nueva minería. Antofagasta-Chile.
- COCHILCO, Comisión chilena del cobre. (2009). Biolixiviación: Desarrollo Actual y sus Expectativas. Chile.
- Constanza, L. (2000). Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del Departamento de Boyaca (Tesis Doctoral). Universidad de Colombia. 187.
- Ibañez, T. y Velásquez, L. (2012). Lixiviación de la calcopirita en medios clorurados" Revista de Metalurgia de Chile. pp34-41.
- Jeffrey y F. Lawson. (2000). Hydrometallurgy. 189-202.
- Juárez, A. (2004). Biolixiviación de minerales sulfuroferroso en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados (Tesis doctoral). Universidad de Colima. 140.
- Ly, M. (2003). Biolixiviación a nivel industrial, Encuentro Científico Internacional. Inf. IPEN. Perú.
- Orrantía, E. (1997). Aislamiento y caracterización de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León. 256.
- Rawlings, D., Kusano, T. (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58:39-55.
- Rivadeneira, D. (2006). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena

- Delgado, S. & Castillo D. Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante. (PbS). *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIII, núm. 1, julio, 2011, pp. 132-143, Universidad Nacional de Colombia.
- Rivera, R.E; Camejo, P.Y. (2011). Estudio de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias Tio y ferro oxidantes en condiciones térmofílicas. *Revista de la facultad de Ingeniería*. Universidad. Vol 26. Pp 65-73. Universidad Autónoma de México.
- Saavedra, A. (2009). "Solubilización del zinc a partir del mineral esfalerita del Yacimiento minero "María Grimesa" por lixiviación microbiana con cepas nativas" (Tesis de grado). Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.182.
- Segura, D. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes del área de Río tinto. (Tesis inédita de doctorado). Universidad de Sevilla, España.
- Silverman, M. y Lundgren, D. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferroxidans*: an improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*. pp642–647.

Correspondencia:

Sandra Verónica Delgado Cruz: sandri_1091@hotmail.com

Fecha de Recepción: 15/09/2015

Fecha de Aceptación: 12/12/2015