

## Modelo matemático y velocidad específica de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un cultivo líquido en condiciones de laboratorio

*Mathematical model and specific growth rate of Acidithiobacillus ferrooxidans in a liquid culture under laboratory conditions*

Daladier Castillo Cotrina<sup>1</sup>

Roberto Castellanos Cabrera<sup>2</sup>

Anacelly Valera López<sup>3</sup>

Javier Lozano Marreros<sup>4</sup>

ORCID: 0000-0003-0133-5921

ORCID: 0000-0002-9021-412X

ORCID: 0000-0002-6667-3043

ORCID: 0000-0003-2827-4583

### Resumen

En la biolixiviación de minerales de baja ley para recuperar metales, como cobre, plata, zinc o uranio, *Acidithiobacillus ferrooxidans* es bastante estudiada y utilizada. Su biomasa puede ser inoculada sobre minerales para mejorar la biolixiviación; sin embargo, es dependiente de las condiciones ambientales en las que se desarrolla. En ese sentido, determinar un modelo matemático que represente todo el proceso de obtención de biomasa, asimismo, de su velocidad específica de crecimiento, bajo determinadas condiciones, es muy importante, ya que puede servir para optimizar, predecir, comparar y monitorear el proceso de la biolixiviación. Esta investigación tuvo como objetivo establecer el modelo matemático y la velocidad específica de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un cultivo líquido bajo determinadas condiciones de laboratorio. La bacteria fue reactivada consecutivamente dos veces en el medio de cultivo 9K y sometida a adaptación en el cultivo líquido con el medio OK con arsenopirita 1 % (w/v) e incubada a 25 °C con aireación. Se tuvo un solo tratamiento con dos repeticiones, en cada una de ellas se utilizó un biorreactor frasco de vidrio que contuvo 630 ml de medio OK, *A. ferrooxidans* (70 ml) y Arsenopirita 8 % (w/v) y se incubó a 25° C con aireación durante 288 horas. Cada 48 horas se realizaron los recuentos microscópicos celulares. Los datos obtenidos se graficaron como logaritmo decimal de la concentración de células versus el tiempo para establecer la curva de líneas y puntos, que sirvió para determinar la curva y ecuación polinómica como modelo matemático con ayuda del software Matlab. Del mismo modo, sirvió para determinar el punto máximo de la fase logarítmica de la curva de crecimiento y la velocidad específica de crecimiento. El modelo matemático que representó la producción de biomasa fue una ecuación polinómica de cuarto grado con una producción máxima de biomasa de *A. ferrooxidans* de  $1.13 \times 10^8$  cel/ml y una velocidad específica de crecimiento de 0.03 h<sup>-1</sup>.

**Palabras clave:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*, biolixivante, biomasa, ecuación de crecimiento, velocidad de crecimiento

<sup>1</sup> Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias. Tacna, Perú. E-mail: dcastilloc@unjbg.edu.pe

<sup>2</sup> Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias. Tacna, Perú. E-mail: rcastellanosc@unjbg.edu.pe

<sup>3</sup> Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias. Tacna, Perú. E-mail: avaleral@unjbg.edu.pe

<sup>4</sup> Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Facultad de Ciencias. Tacna, Perú. E-mail: jlozanom@unjbg.edu.pe

### Abstract

In the bioleaching of low-grade ores to recover metals such as copper, silver, zinc or uranium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* is widely studied and used. Its biomass can be inoculated on minerals to improve bioleaching; however, it is dependent on the environmental conditions in which it develops. In this sense, determining a mathematical model that represents the whole process of obtaining biomass, as well as its specific growth rate, under certain conditions, is very important, since it can be used to optimize, predict, compare and monitor the bioleaching process. The objective of this research was to establish the mathematical model and the specific growth rate of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in a liquid culture under certain laboratory conditions. The bacteria were consecutively reactivated twice in 9K culture medium and subjected to adaptation in liquid culture with OK medium with arsenopyrite 1 % (w/v) and incubated at 25 °C with aeration. A single treatment was had with two replicates, each using a glass flask bioreactor containing 630 ml of OK medium, *A. ferrooxidans* (70 ml) and Arsenopyrite 8 % (w/v) and incubated at 25° C with aeration for 288 hours. Cell microscopic counts were performed every 48 hours. The data obtained were plotted as decimal logarithm of cell concentration versus time to establish the curve of lines and points, which was used to determine the curve and polynomial equation as a mathematical model with the help of Matlab software. Similarly, it was used to determine the maximum point of the logarithmic phase of the growth curve and the specific growth rate. The mathematical model representing the biomass production was a fourth degree polynomial equation with a maximum biomass production of *A. ferrooxidans* of  $1.13 \times 10^8$  cells/ml and a specific growth rate of  $0.03 \text{ h}^{-1}$ .

**Keywords:** *Acidithiobacillus ferrooxidans*, bioleaching agent, biomass, growth equation, growth rate

### Introducción

Los microorganismos lixiviantes como *Acidithiobacillus ferrooxidans* se encuentran en drenajes mineros y minerales con pirita. Estos tienen la capacidad de oxidar azufre y hierro, que guarda una relación directa con la lixiviación de metales preciados, proceso que actualmente se utiliza para recuperar oro, zinc, níquel, cobre o plata, como una tecnología amigable con el ambiente y que permite dar valor agregado a los residuos minerales de baja ley. La eficiencia de esta tecnología se relaciona directamente con la población microbiana lixiviante, cuyo crecimiento constituye un parámetro muy importante para la lixiviación microbiana (Bosecker, 1997; Zepeda, 2017; Cuba & Pastrana, 2018).

El crecimiento microbiano, relacionado con la multiplicación celular, se describe en función de la cinética de crecimiento, representación gráfica de diferentes valores del logaritmo natural de la concentración de células y el tiempo del crecimiento en cultivo. Esto describe una curva en la que se distingue distintas fases. La fase de latencia, donde las células están en adaptación a las nuevas condiciones ambientales y nutricionales del cultivo, sin incremento poblacional. La fase exponencial, por la cual las células metabólicamente están bastantes activas y se multiplican logarítmicamente. La fase estacionaria, donde se presenta posterior a la fase logarítmica un equilibrio entre el número de células que mueren y células nuevas. La fase de muerte, posterior a la estacionaria en la que la población de células muere exponencialmente (Madigan et al., 2000; Agotangelo, 2007; Garre et al., 2016).

Es en la fase logarítmica en donde se determinan parámetros cinéticos como el de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). Esta velocidad permite conocer en qué medida un microorganismo aumenta en población, es propia de cada microorganismo y de los parámetros ambientales y nutricionales del ambiente

en donde se cultiva, también es definida como el cambio en número de células o masa celular por unidad de tiempo (Madigan *et al.*, 2000; Rawlings & Barrie, 2007; Agotangelo, 2007).

La presencia de diversas especies químicas junto con la variación de sus concentraciones en el tiempo en la biolixiviación de minerales hace difícil comprender y cuantificar los fenómenos que allí se presentan, como la precipitación de hierro, el crecimiento microbiano, la acción de los microorganismos y reacciones de disolución de los metales. Existen pocos estudios que describan y cuantifiquen la producción de biomasa a través de un modelo matemático con su correspondiente  $\mu$ , el cual está influenciado, principalmente por  $H^+$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $FeSO_4^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $Me^{2+}$ , y en proporciones menores por  $NH_4^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  (Zárate, 2015; Zepeda, 2017; Castillo *et al.*, 2019). Por lo que, comprender y cuantificar el fenómeno del crecimiento microbiano en el proceso lixiviante es importante, para definir las estrategias de su control y optimizar las etapas de la lixiviación, que conduzcan a recuperar en forma eficiente metales como el cobre, zinc, plata, manganeso, etc., inoculando por ejemplo la biomasa microbiana lixiviante previamente obtenida. Este trabajo permite el conocimiento del modelo matemático y el valor de  $\mu$  de *A. ferrooxidans* en la biolixiviación de la arsenopirita 12 %, bajo condiciones de laboratorio, y proyectar producciones de su biomasa para aplicarlo a procesos de lixiviación en condiciones similares a las evaluadas y a diferente escala.

## Material y métodos

### Material biológico y substrato mineral empleado en la experimentación

El microorganismo lixiviante *A. ferrooxidans* DSMZ 1477 y el concentrado de mineral de Arsenopirita con partículas de tamaño menores de 203  $\mu m$  conteniendo Ni (1.72 %), Ag (154 g/t), Al (0.21 %), Sb (0.22 %), As (33.8 %), Fe (27.9 %), Pb (1.21 %), Cd (0.01 %), Zn (2.88 %), Bi (1.84 %), Cu (0.07 %), Co (1.4 %), SiO<sub>2</sub> (5.15 %) y Au (81.5g/t) y como minerales 73.5 % arsenopirita (FeAsS), 7 % pirita (FeS<sub>2</sub>), 0.2 % calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), 1.6 % galena (PbS), 4.3 % esfalerita (ZnS) y 13.4 % Ganga fueron los materiales utilizados en el cultivo líquido para la evaluación del crecimiento poblacional microbiano.

### Reactivación y adaptación del microorganismo

*Acidithiobacillus ferrooxidans* fue reactivado cultivándolo en dos veces consecutivas. Para la primera, se tomó un inóculo de 2 ml de *A. ferrooxidans* que se agregó a 25 ml del medio 9 K-Fe (0.4 gL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 gL<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 0.004 gL<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 33.3 gL<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 1.5) (Kim *et al.*, 2002) y se incubó a 25 °C con aireación hasta que se tuvo 10<sup>8</sup> células ml<sup>-1</sup> con la ayuda de un microscopio de campo claro y de la cámara de conteo celular Neubauer (Pavez, 2011). Para el segundo, se extrajo 25 ml del cultivo anterior para ser agregado en 225 ml de un nuevo medio e incubado con suministro de aire a 25 °C hasta que se tuvo 10<sup>8</sup> células ml<sup>-1</sup>. El microorganismo reactivado se acondicionó para una adaptación al mineral arsenopirita, agregando un volumen de 10 % (v/v) de su suspensión de cultivo (V/V) a 600 ml del nuevo medio 0K (0.4 gL<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.04 gL<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 gL<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 1.5) con 1 % (w/v) arsenopirita e incubándolo con suministro de aire y a 25 °C hasta que se tuvo 10<sup>8</sup> células ml<sup>-1</sup> (Castillo *et al.*, 2021).

### Cultivo del microorganismo

La experimentación tuvo un solo tratamiento con dos repeticiones, para cada una de ellas se empleó como biorreactor un frasco de vidrio estéril de 1000 cm<sup>3</sup> que contuvo medio 0K esterilizado 630 ml, inóculo de *A. ferrooxidans* del cultivo adaptado 70 ml y 8 % (W/V) de arsenopirita, que fue incubado a 25 °C con aireación por 288 horas (Ayala & Pardo, 1995).

### Evaluación y procesamiento de datos

Se evaluó el número de células por mililitro cada 48 horas y, considerando las repeticiones, se graficó el promedio de los valores de conteo en relación con el tiempo para obtener una curva de líneas y puntos. La

curva fue ajustada utilizando el programa de Matlab a una curva polinómica con  $R^2$ , lo más cercano a 1, por el cual el modelo matemático representativo de la curva polinómica, que es una ecuación polinómica, se pudo establecer como representación del proceso del crecimiento poblacional de *A. ferrooxidans*. La curva y la ecuación polinómica fueron trabajados haciendo uso del programa de Matlab, determinando el valor máximo de concentración microbiana (punto máximo de la curva) que alcanzó *A. ferrooxidans* en el cultivo, y los puntos de inflexión de la curva que sirvió para determinar la ecuación de sus tangentes. La ecuación de la tangente al punto de inflexión de la fase logarítmica fue la que se empleó para conocer el valor de la pendiente, coeficiente de la variable tiempo, es decir, el valor de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) poblacional de *A. ferrooxidans*.

## Resultados

La concentración de células, biomasa, determinada a las 288 horas de cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* fue producto de un incremento poblacional progresivo que alcanzó un valor máximo de  $1.12\text{E}+08$  cel/ml (Tabla 1) (Figura 1).

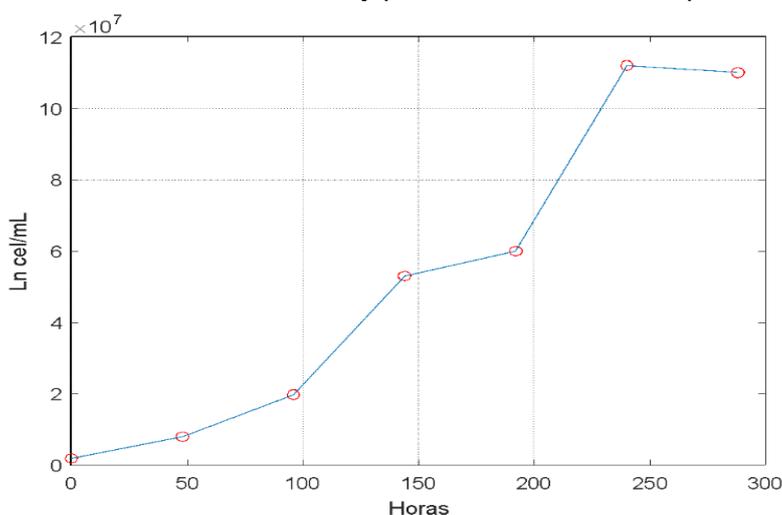
**Tabla 1**

*Evaluaciones de conteo microscópico de la población de Acidithiobacillus ferrooxidans en cultivo líquido.*

Nº Evaluaciones	Tiempo (horas)	Biomasa (cel/ml)
1	0	$1.90\text{E}+06$
2	48	$8.00\text{E}+06$
3	96	$1.98\text{E}+07$
4	144	$5.30\text{E}+07$
5	192	$6.00\text{E}+07$
6	240	$1.12\text{E}+08$
7	288	$1.10\text{E}+08$

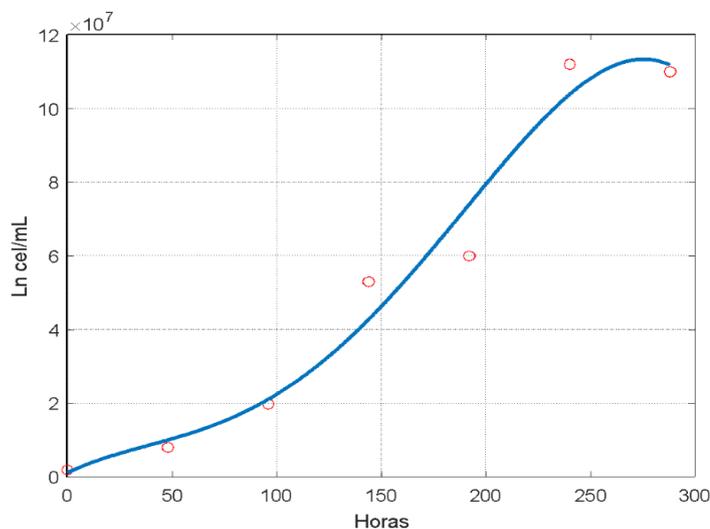
**Figura 1**

Curva en función de líneas y puntos del crecimiento poblacional de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en cultivo.



### Figura 2

Curva polinómica con la pendiente más alta, fase logarítmica de crecimiento, descrito con un modelo matemático representativo del crecimiento poblacional de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en cultivo líquido.



El modelo matemático (M) encontrado para el crecimiento poblacional (cel/ml) de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en función del tiempo (t)(horas) es una ecuación polinómica de cuarto grado con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.969930, cuya representación gráfica correspondiente a una curva polinómica muestra la fase logarítmica que corresponde al crecimiento exponencial cuya pendiente es  $\mu$  (Figura 2):

$$M(t) = -0.075994t^4 + 34.705t^3 - 3303.4t^2 + 272300.0t + 1137200$$

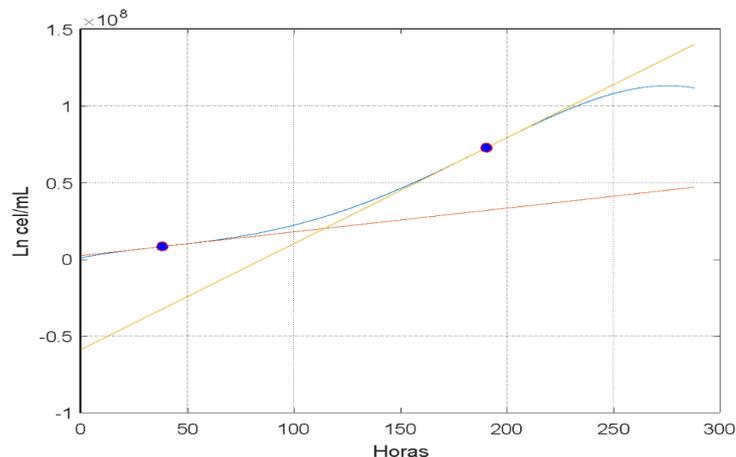
Las rectas tangentes  $Y_1$  y  $Y_2$  pasadas por los puntos de inflexión  $Y_1$  y  $Y_2$  de la curva polinómica de crecimiento (Figura 3) permitieron determinar las ecuaciones respectivas  $Y_1$  y  $Y_2$  con sus correspondientes pendientes, donde la de  $Y_1$  tuvo  $0.031048 \text{ h}^{-1}$  de pendiente,

$$Y_1 = 0.031048x + 13.867$$

$$Y_2 = 0.010311x + 16.014$$

### Figura 3

Rectas tangentes a los puntos de inflexión de la curva polinómica del crecimiento poblacional de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en cultivo líquido.



## Discusión

La curva del crecimiento poblacional de *Acidithiobacillus ferrooxidans* al presentar las fases de latencia, logarítmica y estacionaria (Figura 1) (Figura 2), semejante a las típicas del crecimiento poblacional bacteriano es porque *Acidithiobacillus* es un microorganismo como las bacterias en general (Zepeda, 2017); sin embargo, en una misma especie o entre diferentes especies, los parámetros cinéticos que en ellos se determinen van a ser diferentes porque las curvas de crecimiento son específicas, no son iguales, a causa que las condiciones de cultivo son distintas (Rohr *et al.*, 2005; Zárate, 2015). Es ese sentido, es muy importante determinar para cada especie microbiana su respectiva curva de crecimiento, según las condiciones de cultivo.

Esto explica porque el valor máximo de concentración de *A. ferrooxidans*,  $1.13 \times 10^8$  cel/ml, a las 275.41 horas observado en la fase logarítmica, es diferente, aunque con poca diferencia, de  $1.10 \times 10^8$  cel/ml del consorcio microbiano acidófilo cultivado en calcopirita (Delgado & Castillo, 2019) y de  $3.16 \times 10^8$  cel/ml del *Thiobacillus ferrooxidans* cultivado en el medio de cultivo Tuovinen and Kelly modificado (Forshaug *et al.*, 1984); y diferente también, con mayor diferencia, a  $7.94 \times 10^8$  cel/ml del consorcio microbiano acidófilo cultivado en el medio 9K (Eyzaguirre & Castillo, 2019) y a  $7.54 \times 10^7$  cel/ml del consorcio microbiano acidófilo cultivado en una segunda reactivación consecutiva en el medio de cultivo 9K (Castillo *et al.*, 2016).

El modelo matemático obtenido de la curva de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, expresado en una ecuación polinómica de cuarto grado, representación algebraica de todo el proceso específico de producción de biomasa, es válido para las condiciones ambientales en las que se cultivó el microorganismo. Además, es importante para aplicarlo en predicciones de producción de biomasa, cálculos de productividad y establecimiento de los tiempos que corresponden a cada fase de la curva de crecimiento, para poder extrapolarlo a un proceso de mayor escala en donde se tienen que conocer los probables gastos, producción y utilidades, inversión en energía, recurso humano, equipos, substrato de cultivo, volumen y concentración de inóculo, etc. para obtener biomasa (Casas *et al.*, 2000; Rohr *et al.*, 2005; Zárate, 2015).

La velocidad de crecimiento de  $0.031048 \text{ h}^{-1}$ , encontrada para *A. ferrooxidans*, que determina la rapidez de su incremento poblacional, considerando que la velocidad constituye el incremento del número de células en la unidad de tiempo (Madigan *et al.*, 2000) es un valor más exacto que el que se obtiene de forma clásica. La aplicación de la determinación del punto de inflexión en la fase logarítmica de la curva de crecimiento y el establecimiento de la recta tangente al punto de inflexión junto con su ecuación de recta usando software, principios matemáticos y computacionales agiliza y precisa los resultados (Zárate, 2015). Este valor de velocidad cercano a  $0.03 \text{ h}^{-1}$  de *Thiobacillus ferrooxidans*, cultivado en el medio Tuovinen and Kelly modificado (Forshaug *et al.*, 1984);  $0.021 \text{ h}^{-1}$  de *Leptospirillum ferrooxidans*, cultivado a  $26^\circ \text{C}$  en el medio 9K;  $0.016 \text{ h}^{-1}$  de *Leptospirillum ferrooxidans*, cultivado a  $20^\circ \text{C}$  en el medio 9K (Rohr *et al.*, 2005) y  $0.018 \text{ h}^{-1}$  del consorcio acidófilo, cultivado en el medio 9K en una cuarta reactivación consecutiva (Castillo *et al.*, 2016), pero menor significativamente a  $0.0404 \text{ h}^{-1}$  de *Thiobacillus thiooxidans*, cultivado en el medio Starkey (Zárate, 2015) demuestra que la velocidad de crecimiento es específica de cada microorganismo y según las condiciones en que se cultive e importante para realizar cálculos de biomasa en función del tiempo en un proceso de producción de células (Castillo *et al.*, 2016; Zárate, 2015).

## Conclusiones

El proceso de producción de la biomasa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, cultivado en el medio líquido con Arsenopirita 8 % a  $25^\circ \text{C}$  con aireación en condiciones de laboratorio durante 288 horas, está

representado por un modelo matemático de la curva de una ecuación polinómica de cuarto grado, en la que se determinó una producción máxima de biomasa de *A. ferrooxidans* de  $1.13 \times 10^8$  cel/ml y una  $\mu$  de 0.03 h<sup>-1</sup>.

## Referencias

- Agotangelo, E. (2007). *Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos* (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Ayala, J., & Pardo, R. (1995). *Optimización por Diseños Experimentales con Aplicaciones en Ingeniería*. Lima: CONCYTEC.
- Bosecker, K. (1997). Biobleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology reviews*, 20(3-4), 591-604.
- Casas, J., Lienqueo, M., Cubillos, F., & Herrera, L. (2000). *Modelación cinética de la precipitación de hierro como jarosita en soluciones lixiviantes utilizando la bacteria Thiobacillus ferrooxidans*. Universidad de Santiago. Chile.
- Castillo, D., Castellanos, R., & Tirado, E. (2021). Acción biooxidativa de cultivos microbianos biolixiviantes sobre la arsenopirita. *Ciencia & Desarrollo*, 20, 57-69. <https://doi.org/10.33326/26176033.2021.1.1108>
- Castillo, D., Clavijo, D., Chipana, V., Centeno, J., Eyzaguirre, P., Delgado, S., & De la Vega, L. (2016). *Evolución del crecimiento en consorcios microbianos nativos en la mina de Toquepala de Tacna-Perú*. XIII Jornadas Mineras de tratamiento de minerales. Mendoza. Argentina.
- Cuba, M., & Pastrana, G. (2018). *Recuperación de oro a partir de un mineral refractario de pirrotita por biooxidación en la biominería aurífera Calpa- Arequipa* (tesis de pregrado). Universidad Nacional del Centro del Sur. Huancayo.
- Delgado, S., & Castillo, D. (2019). Influencia de la Temperatura en el crecimiento de un consorcio microbiano y su capacidad biooxidativa sobre el hierro de la calcopirita. *Ecología Aplicada*, 18 (1). <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v18i1.1310>
- Eyzaguirre, P., & Castillo, D. (2019). Biolixiviación indicativa del sulfato de cobre por crecimiento microbiano ante el drenaje minero. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(1): 49-56. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2019.444>
- Forshaug, J., Luong, H., & Brown, E. (1984). Growth Kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* Isolated from Arsenic Mine Drainage. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (1), 48-55.
- Garre, A., Egea, J., & Fernández, P. (2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *Anuario de Jóvenes investigadores*, 9, 160-163
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2000). *Brock biología de los microorganismos*. Editorial Prentice Hall.

- Pavez, B. (2011). *Cuantificación de la expresión del gen omp-40 y de los genes que conforman el operón gal, vinculado a cambios cinéticos de Acidithiobacillus ferrooxidans en respuesta adaptativa a mineral sulfurado de cobre* (tesis de pregrado).
- Rawlings, D., & Barrie, D. (2007). *Bio mining*. Springer.
- Rohr, M., Lavalle, L., Pettinari, G., Giaveno, A., & Donati, E. (2005). Lixiviación de un mineral sulfurado utilizando cepas acidófilas nativas. Universidad Nacional del Comague.
- Zepeda, V. (2017). *Biolixiviación de minerales sulfurados de cobre de baja ley* (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. España.