



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA.**

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN, BIORREACTIVIDAD Y EFECTO
AMBIENTAL; DE ESPECIES MICROBIANAS CON APLICACIONES EN LA
INDUSTRIA MINERO—METALÚRGICA.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO DE INGENIERÍA.

PRESENTA

LUCIANO JUÁREZ GARCÍA.

DIRECTORA DE LA TESIS:
DRA. ROSA ELVA RIVERA SANTILLÁN,
FACULTAD DE QUÍMICA.

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México

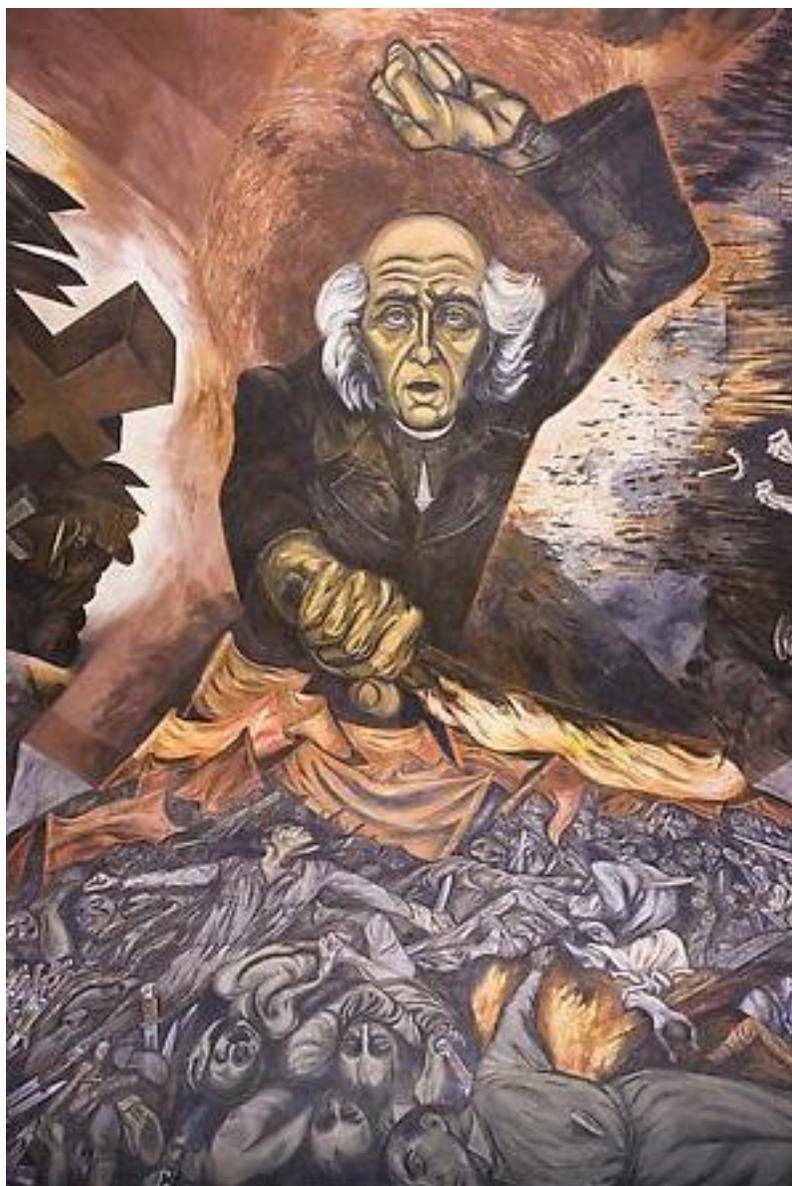


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**MÉXICO IN CEALIZTLI IWAN CHICAHUAK;
IN CIHUATLAMPÁ—I—TEZAUHTLI.**

GRAN JEHOVÁ DIOS SEÑOR DE LOS EJÉRCITOS IPALNEMOHUANI
TLOQUĒ NAHUÄQUÉ, AQUIN NECH MATI IN TLACUILÖLIZTLI, AQUIN
NECH MATI IN AMÖXPÖHUALIZTLI YPAMPA ZAN YĒHUATL
MOTĒCUITLAHUIÄNITZIN

NUESTRA LEALTAD CON NUESTRO SEÑOR JESÚS CRISTO, POR SU
VALIOSA INTERVENCIÓN EN PRO DEL SUSCRIPTO.

A LA SUAVE PATRIA, MÉXICO;

Gratitud ahora y siempre eternamente a los héroes TENOCHTZIN, CUAUHTEMOCTZIN, DON MIGUEL HIDALGO Y COSTILLA GALLAGA, JOSÉ MARÍA MORELOS Y PAVÓN, VICENTE GUERRERO SALDAÑA, DOROTEO ARANGO ARÁMBULA—FRANCISCO VILLA, JOHN O'REILLY y muchos más que magnánimamente regaron las tierras de la Patria México con su sangre, permitiendo con ello se hicieran también trabajos como el presente, sin esperar a cambio ni siquiera la más leve palabra para sus vidas únicas e irrepetibles; sin olvidarnos de los titanes anónimos que construyeron ferrocarriles, levantaron presas, abrieron caminos, excavaron canales...

A mis papás INOCENTE JUÁREZ FEERREYA GARCÍA y ANA MARÍA GARCÍA Y RAMÍREZ; a mis mayores LIDIA RAMÍREZ SIERRA, CARMEN FERREYRA SÁNCHEZ, MIGUEL GARCÍA GONZÁLEZ y JOSÉ ISABEL JUÁREZ BRISEÑO; por la inmerecida merced de darme el ser.

Con cariño a la C. ADRIANA JUÁREZ GARCÍA, a su hijo LEONARDO GABRIEL ORDÓÑEZ JUÁREZ y su compañero LUIS GABRIEL ORDÓÑEZ HERNÁNDEZ.

Gracias a las señoritas Q. F. B. ELIZABETH OROZCO CASTAÑEDA, Q. A BLANCA KAREN TORRES GÓMEZ y el C. I. Q. M. FELIPE PATRICIO RAMÍREZ por su magnífica ayuda.

Nuestra gratitud para el beisbolista CLEMENTE CASTAÑEDA, el ingeniero LUIS AROCHE y sus amigos; al ser posible que el trabajo de campo, con 45° c a la sombra, fuese una experiencia agradable de repetirse.

A mi preciosa FLOR BONITA, IN XOCHIQUETZAL—XOCHIPITZAHUAK, sí de algo te sirve saber que comparto contigo la fe y las tardes de lluvia conmigo quisieras tener. sí de algo te sirve saber que alguien quiere en tu vida crecer y fuéramos juntos por el tiempo hasta el anochecer.

Un pensamiento de bienestar para MARÍA TEREZA GARCÍA Y RAMÍREZ, MARGARITA JUÁREZ FERREYRA, sus familias y demás parientes.

Mi admiración a las eruditas catedráticas EITHNE PATRICIA NI BHRAONAIN DHUGAIN, JOSEFINA MONTES AYALA, MARÍA ISABEL GODÍNEZ MARTÍNEZ, MARÍA DEL PILAR CONSTANZA ORTEGA BERNAL, JOEL ORTIZ NAVA, RICRADO ORTA SAMPERIO y PABLO HUMBERTO ROSAS PEÑA; que a pesar de mi estulticia evidente, consideraron sería bueno dedicarme un minuto de su ciencia.

Reconocimiento al apoyo de los amigos, valedores y compadres MARÍA DEL ROCÍO FERREYRA GARCÍA, MARÍA DOLORES CORONA LÓPEZ, GABRIELA LÓPEZ PINEDA, SERGIO CRUZ CERÓN, IVÁN RAMIRO ESPÍNDOLA ALVARADO, BIAGIO CARRANO CARUSSO, GUILLERMO HERNÁNDEZ MEZA, OMAR CELIS HERNÁNDEZ, GERARDO HUERTA GONZÁLEZ, IVÁN GRANADOS VERA, MIGUEL JULIÁN MUÑOZ MARTÍNEZ, ALEJANDRO JUÁREZ, FERNANDO JARERO GARCÍA, ROBERTO ZULOAGA LIMA y demás titanes de “Dorados”, “Triunvirato”, “Pequeño Gran Calpulli”, “Fuerzas Reales del Poder”, “Grupo Tres de Inspección”, “Obersehen”, “Banda de Alegres Ociosos”, el “Despacho más feliz del planeta”, el gatito TARKÁN le perrito YAQUI, etc.; sin sus esfuerzos desinteresados no habría camino que recorrer.

Al autor desea patentizar su gratitud para con las siguientes instituciones educativas:

Kindergarden Inés Villarreal, Escuela Primaria Lic. Felipe Rivera, Escuela Secundaria María Enriqueta Camarillo y Roa, Escuela Nacional Preparatoria Ezequiel A. Chávez, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus de la otrora Escuela Nacional de Estudios Profesionales Acatlán y Campus de la Facultad de Química, especialmente a su Departamento de Ingeniería Metalúrgica, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología—CONACYT y a los proyectos de investigación del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 224703 (2004—2005) “Acción de los microorganismos en los procesos de oxidación de los minerales sulfurados en los jales generadores de drenajes ácidos”, asimismo al Proyecto de Investigación IN223306 (2006—2007) “Estudio de biolixiviación de sulfuros de cobre en columnas y en reactores agitados”, ambos programas financiados por DGAPA—UNAM, Dirección General de Asuntos del Personal Académico—Universidad Nacional Autónoma de México.

Y para ciertas e instruidas manifestaciones en el poder público, no encuentro palabras para corresponder a las sugerencias de los profesores Carlos González Rivera, Antonio Barrera Godínez, Antonio Huerta Cerdán, Óscar Jesús Rendón Gómez, Fidel Reyes Carmona y muy especialmente voces ledas a delicadas atenciones nacidas de la esencia de la doctora Rosa Elva Rivera Santillán.

In muchitin yehuäntin, tlazocamati.

*AMOR VIEJO Y CAMINO REAL,
NUNCA SE DEJAN DE ANDAR.*

Refrán Mexicano

Operación Riegelberg

Ritual Mexicano consagrado a la Preciosa Flor Bonita

Verso libre

Si en el ímpetu las prisas
el encanto se desliza
en barrancas y senderos
en deseo sus pies ligeros,
soñarás para ti mismo
con tus cosas más queridas
los misterios de mil vidas
en arcanos de un abismo
y no perderás la huella
de entre todas la más bella.

Mira al efecto profecía
es alta joven en virtud
es gracia en su juventud
es lucero en nuevo día,
si juntas en un segundo
ilusiones de este mundo
tendrás su estampa fina
de esmeralda diamantina
mecida por suaves brisas
de sus perlas en sonrisa.

Si te acaricia al contemplar
cuando es tierna compañía
sí su voz es alegrías
en timbre santo sin dudar.
entonces guarda ternezas
que te inspira su belleza
mientras esperas ansioso
un momento de reposo
de verla desde hinojos
esmeraldas de sus ojos.

Confiado siempre en el destino

vuelve tu signo camino,
esa vez entre fulgores
conociste sus colores
para hacer de toda ella
fuente dulce de tu estrella,
ahora sales hacia el frente
para hallar primeramente
de la ciencia su regalo
Con un toque de raro halo.

Salió con fe sincera
hacia la ignota vereda
por la gloria verdadera,
Do sólo lograrlo pueda,
En el desierto lejano
abrió su seca mano,
también él se encierra
entre peñas de la sierra
y con el favor de su Dios
Algo muy nuevo trae su voz.

—No saben cuan contento
me deja este momento,
estoy cerca de cumplir
la promesa del vivir,
nombre bello de su dulce Hija
al olvido no dirija,
si supieras Flor Bonita
cuanto mi alma necesita
del fulgor de tu mirada
sí supieras bienamada....

Cipactli Ocelotl

“Esa gente que tú llamas chusma, es el pueblo que clama por las grandes causas”.

Don Miguel Hidalgo y Costilla Gallaga,
Padre de la Patria, Primer Metalurgista de México.

“De réir mo focal labhairt an spiorad mo baile beag, na daoine go léir a bhfuil, fiú neamharmtha, tá siad riamh bow síos”.

“Por mi palabra hablará el espíritu de mi pequeño pueblo, de todos aquellos pueblos que, aún inermes, no se doblegarán jamás”.

Capitán John O’Reilly
Comandante del H. Batallón de San Patricio.
Patria México, 1847.

“Ciò che è importante per il tecnico è l'ispirazione, la tecnologia arriverà più tardi”

“Lo importante para el ingeniero es la inspiración, la tecnología vendrá después”.

Conde Gianni Caproni,
Ingeniero aereonáutico.

“Para el niño la educación no sólo es un derecho, es un deber”.

El Corán.

ÍNDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN.	12
RESUMEN.	15
OBJETIVOS.	19
CAPÍTULO I HACIA LA NUEVA BIOMINERÍA.	21
I.1—BIOLIXIVIACIÓN.	22
I.2—EL SIGUIENTE PASO, LOS MICROBIOS TERMÓFILOS.	24
I.3—UNA SOLUCIÓN A LAS BAJAS LEYES.	25
I.4—COLECTORES.	25
I.4.1—Colectores aniónicos.	29
I.4.2—Colectores catiónicos.	30
I.4.3—Colectores anfóteros.	31
I.4.4—Colectores no iónicos.	31
I.4.5—Colectores zwitteriónicos.	32
I.4.6—Colectores enantiómeros.	32
I.4.7—Colectores de desarrollo reciente.	33
I.5—INICIO DE LA BIOTECNOLOGÍA DE FLOTACIÓN	33
1.6—PROBLEMÁTICA DE LOS ÁCIDOS PRODUCIDOS POR LOS MICROORGANISMOS METALÚRGICOS	35
CAPÍTULO II DESARROLLO EXPERIMENTAL	38
II.1—ACTIVACIÓN EN LA MUESTRA.	40
II.2—PURIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.	40
II.3—CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	42
II.3.1—Determinación de capacidad ferroxidante.	42

II.3.2—Microscopía.	43
II.3.3—Punto térmico mortal, lapso térmico mortal, temperatura y pH óptimos.	43
II.3.3.1.— Punto térmico mortal.	44
II.3.3.2—Determinación del pH óptimo.	45
II.3.3.3—Lapso térmico mortal.	45
II.3.4—Espectroscopía.	46
II.3.5—Conductimetría.	48
II.4—EXPERIMENTOS METALÚRGICOS	49
II.4.1— Muestra de mineral.	49
II.4.2—Flotación del mineral.	50
II.4.3—Lixiviación.	52
II.5—EXPERIMENTO ECOLÓGICO	54
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	55
III.1—CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	56
III.1.1—Colonia.	56
III.1.2—Respuesta a los cambios de temperatura y pH.	56
III.1.3—Capacidad ferroxidante.	57
III.1.4.—Microscopía.	59
III.1.5—Espectroscopía de ultravioleta visible.	62
III.1.5.1—Evolución del espectro.	62
III.1.5.2—Interferencias, absorción y rapidez de crecimiento exponencial.	65
III.1.5.3—Bandas hipsocrómicas.	68
III.1.6—Fenómeno de tensión superficial.	70
III.1.7.—Conductividad.	71

III.2.1—CARACTERIZACIÓN METALÚRGICA	72
III.2.2—Experimento de flotación.	72
III.2.3.—Otros minerales flotados.	75
III.3.—Lixiviación.	78
III.3.1.— El pH durante la biolixiviación de la calcopirita	78
III.3.2.— El pH durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita.	82
III.3.3.— Mecánica de acidulación de GARA—LIZ.	85
III.3.4.— Potencial óxido—reducción, P.O.R. durante la biolixiviación de calcopirita.	86
III.3.5.— Potencial óxido—reducción, P.O.R. durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita.	89
III.4—EL PRINCIPIO DE JUFI—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI.	91
III.5—IMPACTO ECOLÓGICO.	95
CONCLUSIONES.	98
BIBLIOGRAFÍA.	101

INTRODUCCIÓN

Libros, caminos y días; dan al hombre sabiduría.

Refrán árabe.

INTRODUCCIÓN

Cuando las épocas de las legendarias bonanzas del siglo XIX llegaron a su fin, la Química se encontró con el reto de aumentar la productividad, debido a los descensos generalizados de las leyes. Ante esta situación, los procesos de beneficio de minerales por medio de la flotación selectiva, dieron el impulso suficiente para que en la mayor parte del siglo XX, la minería alcanzara tasas de extracción inimaginables.

En 1950 se publicó una investigación donde se anunció el descubrimiento, en los efluentes de una mina abandonada de Virginia del Oeste, Estados Unidos, del *Acidobacillus ferrooxidans*, un importante microbio químico—autótrofo [1].

Durante el siglo XXI ha resurgido el reto del descenso de las leyes, nuevamente los científicos desarrollan nuevos procedimientos, especialmente aplicados a los sulfuros más estables, como los de cobre, el más común, calcopirita, presenta dos retos a los procesos industriales. El primero es la alta dificultad para lixiviarla. Aún en medios fuertemente oxidantes, la cinética de disolución de calcopirita es mucho más lenta que la de otros sulfuros de cobre. Para solucionar este problema, se han realizado numerosas investigaciones experimentales con los microbios metalúrgicos, especialmente los termófilos [2]. El segundo reto es la flotación selectiva de los minerales de cobre, los xantatos tienen alta tasa de recuperación, especialmente en medio básico, pH 8 a 11 [3], los colectores con un radical quelante como la tiourea y los tiocarbamatos presentan mejores características de especificidad, hasta pH 12 [4]. Aunque para mejorar sus capacidades, se requiere tratar la superficie del mineral con medios sulfurantes.

Recientemente, las investigaciones en la biohidrometalurgia se han propuesto aislar especies de microorganismos capaces de coadyuvar en la flotación directa de sulfuros de cobre. Lo ideal sería tener una especie apta para ambos cometidos a temperatura ambiente. En el presente trabajo, se exponen los hallazgos relacionados con una bacteria autóctona de

México, aislada en el laboratorio, la cual se encuentra, de manera natural, facultada para afrontar las exigencias de la minería del cobre: lixiviar y flotar.

RESUMEN

Todo esfuerzo es vano, sí Dios no da la mano.

Refrán mexicano.

RESUMEN

Ante la baja de las leyes en las minas, se han desarrollado métodos de lixiviación basados en microorganismos. En los procesos mineros, países como Finlandia han incorporado los microorganismos termófilos a la lixiviación, por sus mejores tasas de recuperación de cobre, pero en este caso requieren fuentes de calor; consecuentemente, los costos se incrementan de manera notoria. De operarse con bacterias mesófilas, los plazos de recuperación serían muy largos para la industria.

Asimismo los Químicos han desarrollado nuevas familias de reactivos de flotación, conocidos como colectores y surfactantes. Los resultados en la recuperación de cobre son interesantes, pero de manera análoga a los termófilos, los colectores no pueden actuar de forma individualizada, requieren la acción de espumantes, depresores, formadores de burbujas, etc. y en el caso de la calcopirita, la acción de agentes sulfurantes (con efectos hidrofobizantes) para mejorar sus características superficiales en la flotación.

El papel actual de los microorganismos en el campo de la flotación de valores se encuentra en el inicio de su desarrollo, aunque se ha investigado ampliamente su actividad en el beneficio de la hulla.

La respuesta de la biotecnología a estas limitaciones es la búsqueda de nuevos microorganismos, capaces de interactuar con el mineral.

Bajo la anterior coyuntura, en el presente trabajo se parte de búsqueda en muestras de suelos no mineros propios de la República Mexicana, de los cuales se extrae un microorganismo, posiblemente desconocido para la ciencia; y aunque no fuera ignoto, su acción no ha sido reportada en la bibliografía, hasta ahora disponible. El microorganismo bajo estudio se activa con un procedimiento encaminado a extraer de la propia muestra los nutrientes necesarios para su desarrollo. De los matraces Erlenmeyer empleados en el paso anterior, con la pipeta y el cabo de Kolle, se retiran inóculos para su desarrollo en medio acuoso selectivo, se siembran en caja Petri, inóculos sucesivos del campo adecuado

conduciendo a la purificación del microorganismo, dejándolo listo para un experimento encaminado a determinar si tiene la capacidad de metabolizar el catión ferroso, oxidándolo a férrico, mecanismo indirecto requerido en los procesos de lixiviación de minerales cupríferos.

Luego, los trabajos experimentales se encaminaron a determinar los datos microbiológicos de interés para la metalurgia: Morfología individual y colonial, pH óptimo, temperatura óptima, lapso térmico mortal, espectros por ultravioleta visible. Es decir, complementar las características mínimas de su manejo en mina, ya aportadas en el proceso de purificación.

Las pruebas propiamente metalúrgicas se centraron en experimentos de flotación y lixiviación. Los ensayos de flotación llevados a cabo con anfífilos biológicos, reportados en la bibliografía, no implican prescindir totalmente de agentes como colectores, espumantes, acondicionadores y sulfurantes. En las pruebas de flotación del presente trabajo se suprimieron todos y cada uno de esos reactivos. Las pruebas se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer carentes de dispositivos generadores de burbujas, sóloamente se encontraron sometidos a movimiento angular del incubador y en el rango de pH [3.11, 5.5]. Aún en condiciones sencillas, con las limitaciones propias del análisis químico del microscopio electrónico de barrido, se obtuvieron entre otros, los siguientes resultados:

- I) Cu recuperado: 99.22 %.
- II) Cu perdido: 0.78 %.
- III) Cu flotado: 30.11 %.
- IV) Cu lixiviado: 69.11%.

La segunda área experimental metalúrgica es la lixiviación en matraces Erlenmeyer. Aunque el microorganismo se ubica dentro del grupo de los termófilos moderados, las pruebas de lixiviación se llevan a cabo a temperatura ambiente.

Es importante observar que en las extracciones de laboratorio, el microorganismo no deja de hacer flotar a la calcopirita, aunque no trabajó en condiciones idóneas de temperatura y pH.

El microorganismo obtenido ha sido denominado como GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI. GARA es el acrónimo de García y Ramírez Ana María, mamá del autor, Elizabeth es Elizabeth Orozco Castañeda, Xochiquetzalli es Flor Bonita en azteca. Para abreviar, GARA—LIZ.

OBJETIVOS

Ein starkes und vereintes Mexiko ist furchtbar für den Westen.

Un México unido y fuerte es temible para occidente.

Doctor Wolfgang Niecklassen.

OBJETIVOS

Generales

—Obtener y caracterizar un microorganismo con aplicación en la minería del cobre.

Específicos.

—Aislamiento de un microorganismo a partir de muestras de suelos.

—Caracterización microbiológica del microorganismo obtenido.

—A partir de las características microbiológicas, realización de pruebas orientativas de reemplazo de reactivos químicos utilizados en la flotación de concentrados de calcopirita.

—Realización de pruebas orientativas de disolución de calcopirita con el microorganismo aislado.

—Determinar el posible impacto ecológico del microorganismo aislado.

CAPÍTULO PRIMERO

HACIA LA NUEVA BIOMINERÍA

I.1—BIOLIXIVIACIÓN

Biolixiviación es el conjunto de reacciones químicas que tienen como resultado la disolución de minerales con participación activa de bacterias, las cuales oxidan las rocas o minerales, para obtener la energía necesaria a expensas de sustancias inorgánicas, solubilizando así el valor metálico a recuperar.

Los microbios metalúrgicos empleados se caracterizan por crecer quimiolitotróficamente en ambientes ácidos con pH menor a 3, con alta concentración de iones metálicos y por ser capaces de utilizar un ion ferroso o los compuestos de azufre reducido como fuentes de energía [5]. Asimismo, son denominados extremófilos por vivir en condiciones generalmente inusuales, pero normales en el caso de los minerales: altas temperaturas y concentraciones de metales nocivas para los otros organismos [6].

Cuando la mena en un yacimiento cuprífero tiene menos de un 0.5% de cobre, el trabajo de refinamiento hidrometalúrgico deja de ser rentable, situación propicia para la investigación de nuevos procesos, más baratos y eficientes. En América latina las bacterias lixiviantes empezaron a ser experimentadas en los años sesenta en la mina chilena Lo Aguirre, para extraer el cobre de los minerales [7].

En el caso de los minerales sulfurados, no basta una solución ácida lixiviante, por fuerte que ésta sea, también se requiere un agente externo oxidante coadyuvante en el proceso, el rol oxidante es asumido por bacterias como la *Acidithiobacillus ferrooxidans* [6].

Estos microorganismos metabolizan principalmente dos especies del mineral para extraer cobre: el azufre, oxidado por las bacterias a ácido sulfúrico; y el ion ferroso que, transformado biológicamente a férrico, reacciona con el mineral metálico, para facilitar la solubilización de los valores, así se logra un proceso más barato y simple [7] a temperaturas de 35, 70° C.

A partir de lo anterior, los investigadores han propuesto dos mecanismos de lixiviación:

a) El primero consiste en la llamada “lixiviación indirecta” o “mecanismo indirecto”, la oxidación del sulfuro se realiza a través de los iones férricos de origen biológico, sin mediar contacto entre los microorganismos y la superficie o depender de alguna reacción enzimática, Figura 1.1.

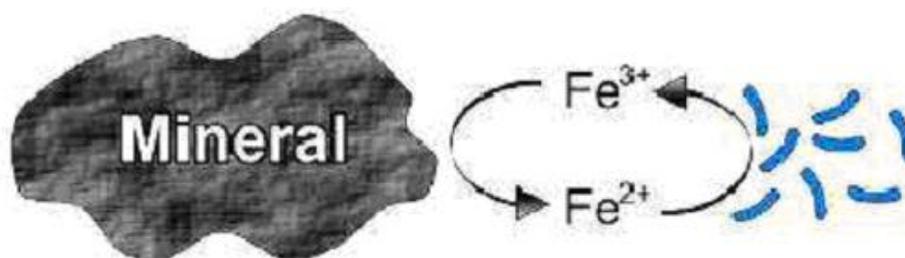


Figura 1.1.—Mecanismo indirecto de lixiviación bacteriana.

b) La “lixiviación por contacto” o “mecanismo por contacto”, anteriormente mecanismo directo, supone a la mayoría de las bacterias adheridas a la superficie de los minerales sulfurados mediante exo—poli—sacáridos, Figura 1.2, traducible en disolución del mineral por los procesos electroquímicos/enzimáticos, realizados en la interfaz pared del microorganismo/superficie del sulfuro [8].

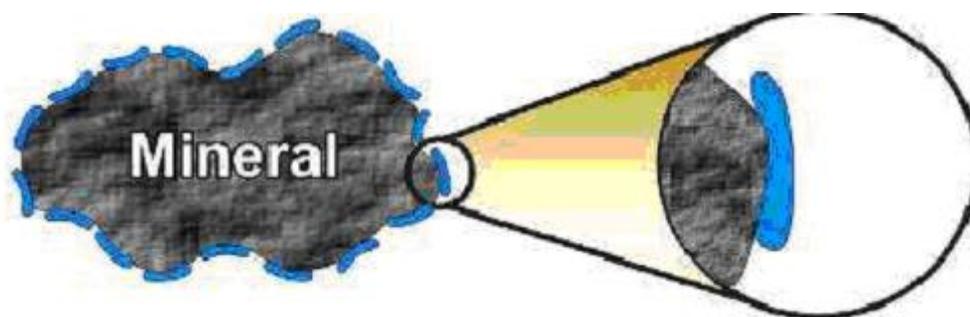


Figura 1.2.— Lixiviación bacteriana por contacto.

Más estudios al respecto han llegado a identificar la sinergia de las especies acidófilas y en consecuencia se enunció un tercer mecanismo:

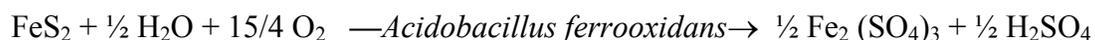
c) La “lixiviación cooperativa”, es decir, la presencia simultánea de los mecanismos anteriores o dos especies bacterianas (sinergia), lográndose un suministro óptimo de energía química y condiciones favorables de crecimiento microbiano [9].

I.2—EL SIGUIENTE PASO, LOS MICROBIOS TERMÓFILOS

La extracción de cobre por oxidación bacteriana del catión ferroso desde minerales o concentrados primarios, ha dado hasta la fecha resultados aceptables, pero las mayores tasas de biolixiviación de minerales sulfurados, se alcanzan a altas temperaturas por la acción de microorganismos termófilos extremos y termófilos moderados [10 y 11]. Sin embargo, elevar la temperatura de una pila de lixiviación, implica encarecer el proceso.

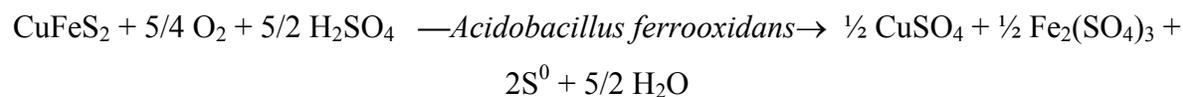
Una opción quizá más plausible se basa en aprovechar las propiedades termodinámicas de los minerales. Considere las siguientes ecuaciones definidas por Petersen y Dixon en 2002, citadas por Menadier (2009) [5]:

Para pirita



$$\Delta H = -1,505 \text{ KJ/mol}$$

Y para la calcopirita



$$\Delta H = -508 \text{ KJ/mol.}$$

Como se observa, la disolución exotérmica de la pirita permite elevar la temperatura en el interior del terrero, generando las condiciones adecuadas para el desarrollo de los microorganismos termófilos.

En este contexto, la investigación propone identificar las condiciones propias de lixiviación de la pirita, con el ataque biológico de una cepa pura de *Acidothiobacillus ferrooxidans* y un cultivo mixto de cepas nativas provenientes del mineral [12].

I.3—UNA SOLUCIÓN A LAS BAJAS LEYES

Después de siglos de explotación intensa, la minería afronta el reto de operar con minerales de baja ley. La Dirección de la mina El Teniente, Chile, propone incrementar la recuperación de cobre y molibdeno reincorporando las escorias y jales al proceso. En la mina Collahuasi, se modificarán las líneas de alimentación para nuevos ciclones de mayor capacidad. En otras palabras, se pretende mantener operativas las minas mediante mayores cantidades de jales y mineral beneficiado y por consiguiente, aunque la ley disminuya, elevar los niveles de producción actuales y compensar la mayor inversión requerida. Para darse una idea de la cantidad de mineral a manejar en el futuro cercano, las celdas de concentración de 300 m³ son inadecuadas [13], en el año 2013 se pusieron a disposición de la minería celdas de 600 m³.

La respuesta de mayor capacidad es sólo una componente de la solución, de manera concomitante se desarrollan innovaciones en el campo de colectores.

I.4—COLECTORES

La flotación por espuma es uno de los procesos más importantes en el beneficio minero, se basa en la diferencia de humectabilidad de diferentes minerales. Las partículas se distinguen entre las fácilmente humectables por el agua (hidrófilas), de las repelentes al agua (hidrófobas) [14]. Si una mezcla de partículas hidrófobas e hidrófilas se suspenden en

agua, y a continuación se burbujea aire a través de la suspensión, las partículas hidrófobas tienden a adherirse a las burbujas de aire y flotan en la superficie, Figura 1.3. La capa de espuma formada se enriquece con mineral hidrófobo, mientras las partículas hidrófilas permanecen en la suspensión.

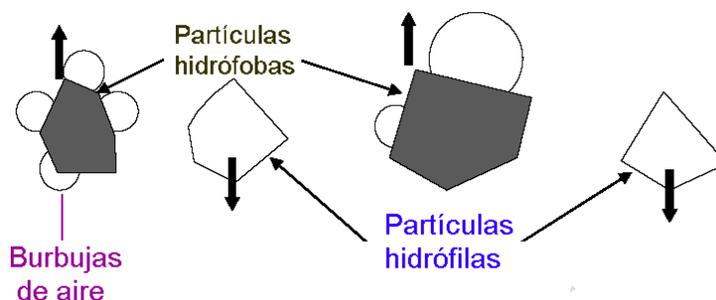


Figura 1.3.—Partículas hidrófobas e hidrófilas [14].

Para conferir un carácter hidrófobo a las partículas minerales de interés, se utiliza un grupo de reactivos químicos conocidos como colectores de flotación o agentes tensoactivos, especializados para su adsorción selectiva en la superficie [15].

La unión de las burbujas a la superficie está determinada por las energías interfaciales entre el sólido, líquido y gas, modelada por la ecuación de Young—Dupre:

$$\gamma_{lv} \cos \theta = (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) \quad (\text{Ecuación 1}).$$

Donde

γ_{lv} es la energía superficial de la interfase líquido—gas.

γ_{sv} es la energía superficial de la interfase sólido—gas.

γ_{sl} es la energía superficial de la interfase sólido—líquido.

θ es el ángulo de contacto, formado en la unión entre el gas, sólido y la fase líquida.

Si el ángulo de contacto es muy pequeño, la burbuja no se adhiere a la superficie, mientras que un ángulo de contacto mayor, favorece una mejor adherencia del sólido con la burbuja, Figura 1.4. Un ángulo de contacto cercano a 90° , es suficiente para una flotación eficiente en la mayoría de los casos [16].

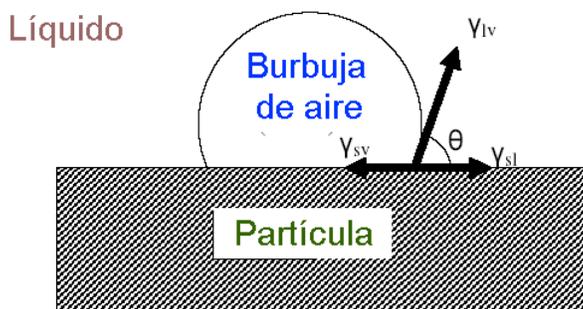


Figura 1.4.—Visualización de las variables de la ecuación de Young—Dupre [14].

Una vez que la partícula se hace hidrófoba, debe ser puesta en contacto con burbujas de gas [17]. Si las burbujas son grandes respecto a las partículas, el fluido adyacente a las burbujas puede barrer las partículas sin entrar en contacto con la fase gaseosa. Es mejor manejar burbujas de diámetro semejante a las dimensiones de partícula con el fin de garantizar una buena colección de las partículas.

Respecto a los reactivos empleados para obtener la flotabilidad del mineral, debe adscribirse un grupo funcional quelante en la parte extrema de una cadena de hidrocarburos, suficientemente larga como para impartir hidrofobicidad al mineral en la adsorción [18]. El quelato resultante debe ser un complejo neutro, generalmente insoluble en agua y por lo tanto que promueva la hidrofobicidad.

El quelato siempre se adsorbe en la interfase mineral/agua, estudios de espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear llevados a cabo en sistemas de minerales y quelantes, confirman la formación de un enlace complejo con el ion metálico superficial [19].

La selectividad del reactivo quelante a un átomo metálico está estrechamente relacionada con la estabilidad de los complejos, expresada en términos de la constante de estabilidad K . Los factores como la naturaleza de los ligandos, el núcleo de coordinación, el comportamiento de los compuestos mono y polidentados, la repulsión de las nubes generadas por los pares electrónicos; influyen en K , y por lo tanto, en la selectividad del reactivo [20].

Se ha desarrollado un método para la selección de quelante basado en el cálculo teórico de la constante de estabilidad:

Regla de Marabini

Sea L un ligando.

$\{Mn = \text{catión metálico} \mid n \in \mathbb{N} \mid n \in [\text{mineral1}, \text{mineral 2}] \mid \text{mineral 1} \neq \text{mineral 2}\}$.

$pK^n_{MnL} = \text{Constante de complejación ligando—catión metálico.}$

Un determinado ligando funcionará como un colector de flotación selectiva para un catión con respecto a otro ligando, siempre que la constante de estabilidad satisfaga la siguiente condición [21]:

$$pK^1_{M1L} > 6 \wedge (pK^1_{M1L} - pK^2_{M2L}) > 5 \quad (\text{Ecuación 2}).$$

La primera premisa caracteriza la estabilidad del quelante respecto al catión $M1$ mientras que la segunda define la diferencia entre la estabilidad de un quelante respecto a dos estructuras cristalinas diversas.

La regla de Marabini ha sido validada por diversos sistemas mineral—ligando, pero no puede explicar las diferencias en la respuesta de dos minerales que contienen el mismo catión.

Es frecuente añadir más de un colector al sistema de flotación, en la cabeza del proceso se introduce un colector selectivo cuyo objetivo es flotar los minerales fuertemente hidrófobos, mientras que, posteriormente, se añade otro colector, más potente pero menos selectivo, con el fin de recuperar los minerales de flotación más lenta.

Existen multitud de productos utilizados como colectores [22]: Xantatos, oleatos, etc. Su naturaleza química es la de ácidos débiles, bases o sales químicas heteropolares. En el caso particular de la calcopirita, su funcionamiento no siempre es eficiente, requiriéndose tratar su superficie con agentes sulfurantes [23].

La clasificación de los colectores desde un criterio químico, se basa en el carácter iónico de la parte hidrófila. El grupo hidrófilo o cabeza puede ser iónico o polarizable, lo que permite su solubilidad en agua.

Así los colectores de flotación se suelen clasificar en 6 grandes grupos:

Colectores aniónicos

Colectores catiónicos

Colectores anfóteros

Colectores no iónicos

Colectores zwitteriónicos

Colectores enantiómeros

I.4.1—Colectores aniónicos

El grupo hidrófilo del colector tiene carga negativa [24], Figura 1.5. A su vez se dividen en dos tipos: Los tioles y los oxhidrúlicos.

a) Colectores tipo tiol.— En estos colectores, el grupo polar contiene azufre bivalente, normalmente se utilizan para flotar sulfuros. Dentro de este tipo de colectores los

más importantes son los ditiofosfatos y xantatos. Le sigue en importancia la tiocarbanilida y mercaptobenzotiazol, usados en algunos casos como colectores de refuerzo.

b) Colectores tipo oxhidrúlicos.— Son usados generalmente en la flotación de minerales diferentes de sulfuros. Dentro de este tipo se tienen los carboxilatos (RCOO^-), sulfatos orgánicos (ROSO_3^-) y sulfonatos (RSO_3^-).

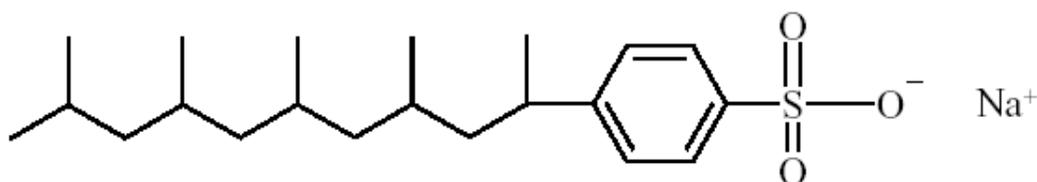


Figura 1.5.—Aquilbencensulfonato de sodio [25].

I.4.2—Colectores catiónicos

Estos colectores tienen carga positiva en el grupo hidrófilo, Figura 1.6. Varios de estos compuestos no son compatibles con los colectores aniónicos y son más caros.

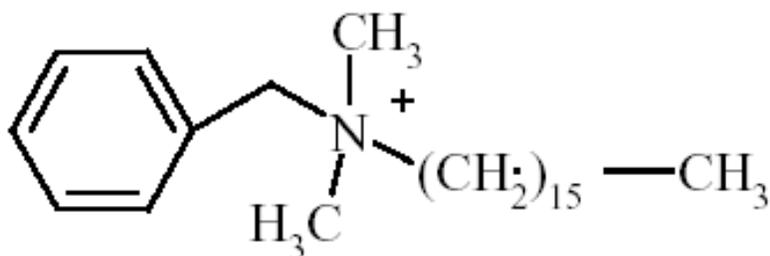


Figura 1.6.—Bencilcetildimetilamonio⁺ [25].

Entre éstos se encuentran generalmente las aminas primarias y cuaternarias, obtenidas generalmente de grasas naturales [26]. Con la finalidad de mejorar la solubilidad de los colectores aminas, éstos se usan en forma de cloruros de aminas cuaternarias ($\text{R}_4\text{N}^+ \text{Cl}^-$) o acetatos [25].

1.4.3—Colectores Anfóteros

Este tipo de colectores se integran por grupos funcionales ionizables con carga positiva o negativa, dependiendo del pH del medio.

Se dividen en anfóteros y betaínas, Figura 1.7. Los primeros disponen de por lo menos un protón ionizable, las segundas ninguno [27]. Los cambios sensibles ante la acidez o basicidad han restringido el uso de los anfóteros en la industria [28].

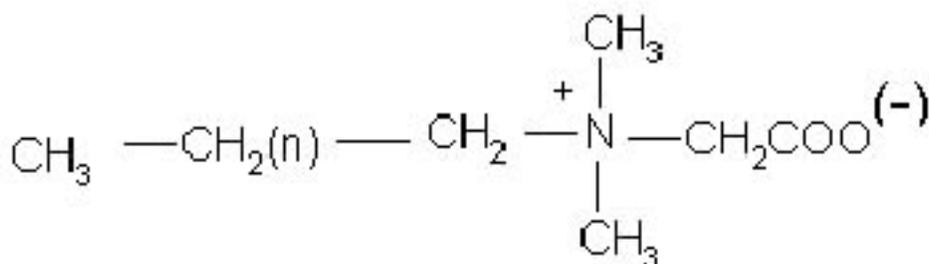


Figura 1.7—Aquil dimetil betaína [27].

1.4.4—Colectores no iónicos

En este caso el grupo hidrófilo carece de carga neta, pero obtiene su solubilidad por hidratación de grupos amido, amino, éter o hidróxilo [29] o por grupos poli—ol o radicales altamente polares como el polioxietileno ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), Figura 1.8. Permiten incrementar la hidrofobicidad lograda con los otros colectores previamente utilizados, debido a que fácilmente se adsorben sobre dichos colectores [27].

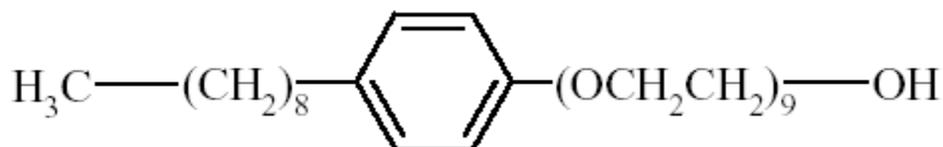


Figura 1.8—Nonoxynol [25].

I.4.5—Colectores zwiteriónicos

Aunque su uso no se encuentra difundido en la minería por ser sensibles al pH, en el futuro pueden ser los colectores de nueva generación, Figura 1.9. Estos compuestos se caracterizan porque tienen cargas positivas y negativas en el grupo hidrófilo [25], tal y como ocurre en las sulfobetáinas $RN^+CH_3-CH_2CH_2SO_3^-$.

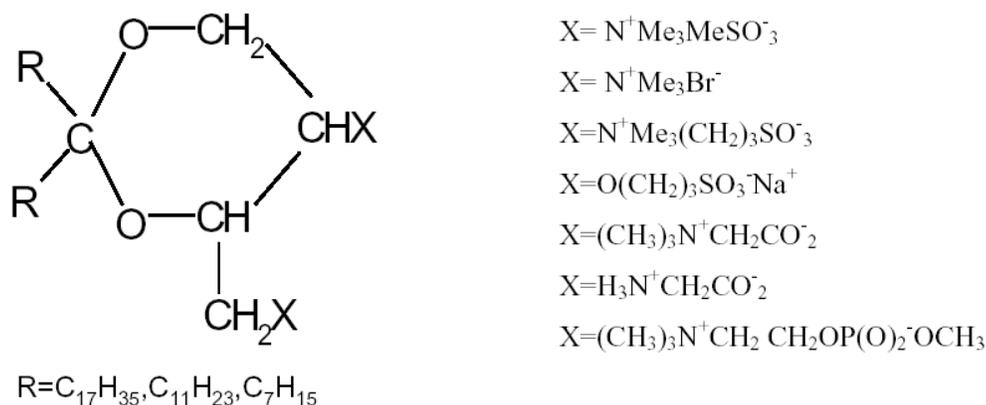


Figura 1.9.—Un colector zwiteriónico basado en un cetal, a la izquierda el cetal base, a la derecha el conjunto de posibles grupos zwiteriónicos para la base [25].

I.4.6—Colectores enantiómeros

Desarrollado poco antes del 2004, contienen 2 grupos hidrófilos en la cabeza de la cadena lineal y dos hidrófobos en el extremo, conectados covalentemente por un espaciador, Figura 1.10 [30]. Entre sus características más importantes, destaca su amplia superficie de reacción y las bajas cantidades de reactivo para alcanzar la concentración micelar crítica [25].



Figura 1.10.—Estructura de un anfifilo enantiómero [30].

I.4.7.—Colectores de desarrollo reciente

Obviamente los reactivos de flotación son el componente y la variable más importante del proceso, debido a que el beneficio no se puede realizar sin ellos. La empresa S.N.F. FloMin, ha auspiciado el desarrollo de nuevos colectores químicos:

a) Alquil—Tioglicolatos es una familia de reactivos para incrementar la selectividad ante menas de hierro indeseables en la flotación de molibdeno y cobre; además recupera ciertas formas especiales de estos minerales.

b) Octil—Tioglicolato, ha demostrado importantes resultados en la flotación de cobre, mejora la recuperación del 15% al 42%.

No obstante sus mejores cualidades, estas familias no son adecuadas en la recuperación de finos.

I.5—INICIO DE LA BIOTECNOLOGÍA DE FLOTACIÓN

Muchos de los reactivos y aditivos químicos empleados en la flotación constituyen un riesgo de afectación grave al medio ambiente [31]. En el caso de reactivos de flotación potencialmente contaminantes, deben aplicarse normas de seguridad estrictas a las instalaciones y equipos de almacenamiento, llenado, trasvase y aplicación; sin excluir la posibilidad de una contaminación de las aguas superficiales y freáticas; debiendo verificarse periódicamente sus concentraciones en los cuerpos de agua.

La flotación de sulfuros de cobre requiere de reactivos depresores específicos para la pirita. Estos agentes no deben interactuar con los sulfuros de cobre y molibdeno. Un pH básico, aun agregando cal hasta superar el valor de 11, no siempre es efectivo. En este caso se utiliza el cianuro de sodio, reactivos oxidantes y otros depresores. Algunos de estos ofrecen inconvenientes por su toxicidad, otros afectan a los minerales valiosos.

Todo en conjunto ha fomentado estudios muy cuidadosos para analizar el efecto de colectores biológicos sobre los sulfuros. Se tienen resultados interesantes, sobre todo cuando se trata de extractos naturales de bajo impacto en el medio ambiente. En este contexto los reactivos de quebracho, árbol típico de las selvas de Argentina y Paraguay, se comercializan modificados para una mejor adaptación al uso de colectores. Si bien su aplicación en la minería no metalífera es aceptada, no hay antecedentes industriales de su empleo en recuperación de valores metálicos.

Esta nueva familia de reactivos tiene la ventaja de ser totalmente soluble en agua, son estables y más amigables con el medio ambiente; por tratarse de productos de origen natural y por su bajo consumo por tonelada de mineral. Los resultados preliminares muestran el efecto depresor sobre pirita y su interacción sobre la flotabilidad de calcopirita. Bajo las condiciones reportadas en la bibliografía, se observó que el pH y una dosificación adecuada de los reactivos podrían ser la clave para lograr los resultados buscados [32].

Se han realizado experimentos de flotación con la intervención de microorganismos, en la separación del carbón de la pirita, se ha estudiado el papel de *Thiobacillus ferrooxidans* como agente depresor de la pirita a pH 2. La flotación del valor en sí, depende de reactivos colectores, espumantes y acondicionadores, éstos últimos indispensables para la sobrevivencia de la bacteria. [33].

El 25 de agosto de 2011 se publicó en la revista Tiempo Minero la siguiente noticia:

Antofagasta. La biotecnología en la minería se encuentra en un amplio campo de investigación en Chile. Es por ello que la investigadora de la Universidad de Antofagasta y de Cicitem, Ana Mercado, en colaboración con Csiro, se encuentra en Australia buscando nuevas tecnologías que permitan un mayor desarrollo de esta área en beneficio de los minerales y en cuidado del medioambiente [34].

Su objetivo es encontrar microorganismos que puedan reemplazar los reactivos químicos utilizados en la flotación.

1.6—PROBLEMÁTICA DE LOS ÁCIDOS PRODUCIDOS POR LOS MICROORGANISMOS METALÚRGICOS

Muchos investigadores, han afirmado de manera dogmática que la lixiviación microbiana carece de afectación al medio ambiente, por la falta de emisión de polvos y gases, sin embargo, si bien es cierto que en sí la lixiviación bacteriana estrictamente no genera emisiones de polvos y gases, no se han reportado resultados para determinar el efecto de los microorganismos, activos, en el diseño actual de presas de jales, pues en caso de no cumplir legislaciones ambientales y no controlar la acción microbiológica, ésta tiene el potencial para causar un impacto devastador a largo plazo en los ríos, arroyos y vida acuática, semejante a una máquina de contaminación perpetua, como sucede con la generación de drenaje ácido de mina, causado por la disposición inadecuada de residuos mineros. A continuación se enlistan varios ejemplos de la falta de control en la disposición de residuos mineros, no necesariamente en procesos microbiológicos.

En la mina abandonada del Monte Washington en la Isla de Vancouver, el cobre tóxico lixiviado pasa a Pyrrhotite Creek, luego a Muerx Creek, y de ahí al agua del río Tsolum, donde ahuyenta al salmón adulto, interrumpiendo el ciclo reproductivo de la especie. Lo anterior es sólo un ejemplo del problema real, en el reporte oficial del estado del medio ambiente de la Columbia Británica, se señaló la existencia aproximada de 240 millones de toneladas de desecho de roca generadora de ácido y 72 millones de toneladas de jales generadores de ácido en la provincia. Cada año, la generación de metales ácidos y pesados, y los desechos de roca de la minería en la provincia, aumentan en 25 millones de toneladas [35].

En Bolivia las aguas del Río La Ribera, Molino y Tarapaya se utilizan para irrigar los cultivos, ahí se han reportado altos valores de mortandad de sembreras o milpas. Esto se atribuye a la alta concentración de cobre y zinc (fitotóxicos) así como cadmio y

manganeso, provenientes de los drenajes de las minas. Los daños causados por los efectos combinados de los contaminantes contenidos en el agua son [36]:

- ♠ Germinación dificultada.
- ♠ Coloración amarillenta y reducción de tamaño de los botones después de la germinación.
- ♠ Hojas y troncos arrugados.
- ♠ Inmadurez de las raíces de las plantas jóvenes.

En definitiva, merma de la producción.

Además, con agua de mina, los sólidos de las mismas se depositan en las tierras, destruyendo la raíz y secando plantas maduras. También se ha observado un proceso de desaparición de vegetación y fauna acuática nativas en los cauces del río.

El consumo de agua contaminada del Río Pilcomayo, Región Minera de Potosí, Bolivia; por el ganado ovino y caprino afecta a la salud de los animales. Los efectos en el ganado son:

- Deformaciones de las piernas de los animales recién nacidos.
- Diarrea.
- Enfermedades de la piel.

Se estima que los productores podrían tener el doble del ganado ovino y caprino si las aguas del Pilcomayo no estuviesen contaminadas. Esto correspondería a un aumento de la producción en 19,800,000.00 pesos mexicanos de 1993.

El análisis de carne de pescado del Río Pilcomayo en Villamontes (Tarija) indicaron altos niveles de contaminación con plomo. Suponiendo que estos pescados son incomedibles y que por esto no tienen ninguna utilidad, se puede estimar las pérdidas

económicas causadas por la contaminación, en las 37 comunidades rurales de Potosí a Puente Méndez se cifran en 2,200,000.00 pesos mexicanos, sólo en 1993.

Pese a no contar con datos sobre el número de enfermos en Latinoamérica relacionados con drenajes ácidos, los efectos en salud no pueden ser pasados por alto. Especialmente los niños son afectados por irritaciones de piel y sangrados al exponerse al agua. Casos de enfermedades estomacales y diarrea también han sido reportados en cuencas mineras. Estos últimos están más relacionados con aguas de la contaminación minera, cuyos efectos no han sido medidos aún en términos de casos reportados y analizados por contaminación de metales pesados. Además la materia prima de la biolixiviación y los productos de la minería se almacenan muchas veces al aire libre alrededor de las plantas. El viento levanta y reparte las partículas finas de estos materiales y causa diferentes enfermedades en los humanos, especialmente asma [37].

Agencias gubernamentales bolivianas admiten que esta contaminación se traduce en un alto impacto social. La dificultad o imposibilidad de realizar las actividades productivas tradicionales causan pobreza. Esta pobreza lleva a muchas personas a abandonar sus tierras y emigrar hacia los departamentos de Santa Cruz y Cochabamba, especialmente en invierno, cuando la escasez de agua limpia para el riego es aguda. La migración y la pobreza debilitan las estructuras de las organizaciones sociales tradicionales [38].

Resulta obvia la necesidad de determinar algún posible impacto ambiental del microorganismo GARA—LIZ.

CAPÍTULO SEGUNDO

DESARROLLO EXPERIMENTAL

“Ist von wesentlicher Bedeutung, um die Stangen zu entwickeln isoliert, ohne weitere Mikrobe um”.

“Es imprescindible conseguir que los bastoncitos se desarrollen aislados, sin que haya otro microbio a su alrededor”.

Doctor Roberto Koch.

El doctor Roberto Koch en su *Memoria* de la tuberculosis, estableció como requisito básico de toda investigación microbiológica, la obtención de cepas en condiciones axénicas. En el caso particular de los microorganismos del suelo, es necesario activarlos, asimismo se encuentran mezclados con una gran variedad de organismos o contaminantes, por lo que se necesita aplicar diferentes métodos para aislar al espécimen deseado [39]. La Figura 2.1. corresponde al diagrama de flujo de los experimentos realizados.

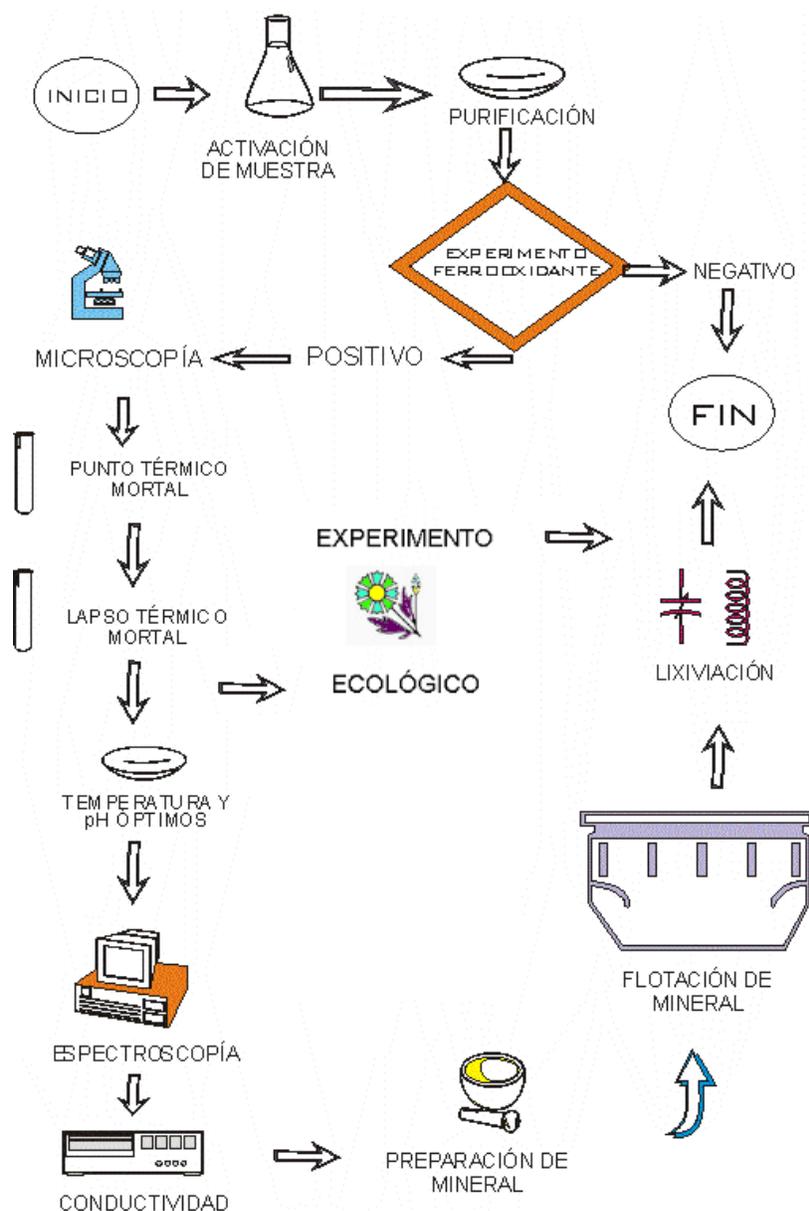


Figura 2.1.—Flujograma experimental.

II.1—ACTIVACIÓN EN LA MUESTRA

La activación de los microorganismos requiere una serie de tres ataques químicos, el objetivo es lixiviar de la propia muestra los nutrientes necesarios para la activación del microorganismo. El licor obtenido se mantiene tapado en términos de la técnica axénica microbiológica de los cultivos activos, durante un lapso de 7 días en incubador orbital a 35°C y rapidez angular de 150 Hz.

II.2—PURIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Los medios selectivos empleados parten de la premisa de inhibir el desarrollo de microorganismos ajenos a los metalúrgicos [40], sin afectar el desarrollo de estos.

A partir de este punto, todos los medios empleados, Tabla II.1 y Tabla II.2, son esterilizados en autoclave a una presión de 16 psi, temperatura de 121° C durante 15 minutos [41], el medio del *Thiobacillus thiooxidans* se tyndaliza cuidadosamente, por su tendencia a proyectarse violentamente. En esta etapa a ningún medio se le agrega $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Tabla II.1—Composición del medio de aislamiento. Concentraciones en g/l [42].

Glucosa	0.15	Tiamina	0.4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	Agar	10.0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.01	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-
K_2HPO_4	0.05	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-
KCl	0.05	S^0	-
CaCO_3	0.1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-
Vitamina B ₁₂	0.001	pH	-

Una vez activado el microorganismo, se extraen 5 ml de inóculos con pipeta estéril en campana de flujo laminar, se siembran en cuatro matraces, cada uno de ellos con los

medios de la Norma 9240—D. Después de una semana en incubador orbital a 35°C y rapidez angular de 150 Hz, se vuelve a extraer inóculos para su siembra en nuevos matraces con medios estériles [43]. El procedimiento se repite en total 49 veces.

Tabla II.2—Composición de 3 medios de desarrollo. Concentraciones en g/l [42].

Reactivos	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Thiobacillus thioparus</i>	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0	-	0.3
Ca(NO ₃) ₂	0.01	-	-
K ₂ HPO ₄	0.50	2.0	3.0
MgSO ₄ 7 · H ₂ O	0.50	0.1	0.5
KCl	0.10	-	-
FeSO ₄ 7H ₂ O	4.42	-	-
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	-	10	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	0.02	0.02
S ⁰	-	-	10.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	-	0.25
pH	3.0—3.6	7.8	4.8

Para completar la purificación, se preparó agar con lo medios de la Norma 9240—D en matraces de 250 ml, a partir de este momento a ningún medio se le ajusta el pH, los matraces fueron esterilizados a 121° por 15 min. Luego se vació cada agar en cajas Petri bajo condiciones asépticas y se dejó gelificar. Posteriormente en las cajas Petri se procedió a inocular los microorganismos de las soluciones axénicas, mediante el uso del cabo de Kolle [44] para siembra en estría en cuatro campos. En total fueron 4 cajas inoculadas simultáneamente, las cuales se incubaron a 30° C por 3 días. Las colonias fácilmente distinguibles y de mayor cantidad fueron seleccionadas del cuarto campo para siembras sucesivas en el mismo medio, 2 veces por semana durante un año.

Al año de trabajo, se seleccionan los 2 medios más propicios del microorganismo, para seguir su resiembra hasta el final de todos los trabajos experimentales.

II.3—CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

II.3.1—Determinación de capacidad ferrooxidante.

Los numerosos estudios realizados con microorganismos metalúrgicos, consideran como una característica de las cepas lixiviantes, la capacidad de liberar al catión ferroso y oxidarlo a férrico. Además la actividad microbiana se revela por señales visibles, crecimiento de colonias en caja Petri, en los tubos y matraces se presenta incremento de turbidez, formación de precipitados, cambios de color o burbujeo [45].

Los cambios bióticos del medio de cultivo del *Thiobacillus ferrooxidans*, complementado con sulfato ferroso heptahidratado, revelaron la capacidad del microorganismo en estudio para oxidar el catión ferroso, la detección visual de esta reacción radicó en el surgimiento de un color naranja intenso [46]. Para ello los tubos de ensaye y los matraces Erlenmeyer correspondientes se inocularon en condiciones axénicas con 1.5 g de cultivo proveniente de caja Petri, debiendo permanecer uno extra como testigo.

Es importante asentar que la energía libre de Gibbs de la disolución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ es de -91.60 ± 0.85 kJ/mol en condiciones normales de presión y temperatura. Una vez disuelto el sulfato ferroso, la energía libre de Gibbs de formación de uno de los precipitados férricos, goehtita, es de -488.6 ± 1.7 kJ/mol [47]. Por lo tanto, es casi 5 veces más estable el precipitado férrico que el ion ferroso en solución. Esta situación puede conducir a errores, por ejemplo creer que se detectan muestras de actividad bacteriana, cuando de manera espontánea el catión ferroso se oxida a férrico y precipita. Por estas razones la prueba metabólica no puede extenderse más allá de 48 horas.

Cuando se obtiene un resultado negativo, cesa la investigación con la muestra elegida, debiéndose seleccionar otra, reiniciándose el procedimiento.

II.3.2—Microscopía.

La microscopía se puede dividir conforme a la longitud de onda en óptica y de barrido electrónico, la primera a su vez en microbiológica y esteroscópica de bajo poder de resolución.

La microscopía óptica aplicada en microbiología se realiza mediante la técnica del aceite de inmersión, para obtener imágenes a 1000 aumentos, la preparación se trata con tinción de Gram. El cómputo de microbios en Cámara Neubauer, portaobjetos con una excavación de volumen conocido, en una fina cuadrícula, permite conocer el número de especímenes por unidad de área y de volumen. El microscopio se ajusta a 400 aumentos [48]. La microscopía esteroscópica se limita a observación de las cajas Petri y filmar los concentrados minerales obtenidos. En cada paso de inoculación, se verifica visualmente la presencia del microorganismo ferrooxidante y sus colonias.

Para realizar las observaciones por microscopía electrónica de barrido, se aplicó una técnica de fijación desarrollada por Karnovski [49], adaptada por el tesista de licenciatura Miguel Angel López Hernández [50]. El microscopio electrónico de barrido no sólo puede proporcionar imágenes de los microorganismos, sino también su efecto o no en los minerales, morfología y topografía; además de un microanálisis químico general de los mismos. [51].

II.3.3—Punto térmico mortal, lapso térmico mortal, temperatura y pH óptimos.

Considere el crecimiento de un microorganismo como un fenómeno dependiente de un único factor, a valores bajos el desarrollo es lento, a menores niveles el crecimiento se detiene, cuando los valores se incrementan hasta un punto idóneo, el microorganismo se desarrolla de forma acelerada hasta llegar a la máxima tasa de crecimiento. El exceder el valor adecuado se traduce en un descenso brusco hasta finalizar toda vida microbiana [52].

En el presente trabajo, los factores a modificar son el pH, la temperatura, el tiempo y se muestran en la Tabla II.3.

Tabla II.3.—Condiciones experimentales de respuesta del microorganismo a los cambios de pH y temperatura. [53].

EXPERIMENTO	FACTOR	RANGO	PASO	LAPSO O VALOR DE VARIABLE FIJA.
Punto térmico mortal	Temperatura.	[25°, 85°]	5° C	15 minutos.
PH óptimo	[H ⁺]	[3, 7]	0.5 pH	48 horas.
Temperatura óptima	Temperatura	[25°, 85°]	5° C	15 minutos.
Lapso térmico mortal	Tiempo	[10', 60']	10 minutos	40° C y 45° C

II.3.3.1—Punto térmico mortal

El punto térmico mortal se determinó de la siguiente manera [53]:

- a) Seleccionar un inóculo de la Caja Petri.
- b) Sembrarlo en un tubo de ensayo con medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, sin FeSO₄·7H₂O ni ajuste de pH. Se cultivan tantas muestras como valores correspondientes según el paso.
- c) Se incuban los tubos durante 48 horas a 25° C en estufa.
- d) Se calientan todos los tubos a Baño María durante 15 minutos a 25° C.
- e) Se toma un inóculo del primer tubo y se siembra en agar del medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, sin catión ferroso ni ajuste de pH.
- f) El experimento en caja Petri no excede de 48 horas.
- g) Se incrementa la temperatura del Baño María en 5° C, permaneciendo en ese valor durante 15 minutos.
- h) Se repiten los incisos e al g, hasta realizar el experimento de 85° C.
- i) El punto térmico mortal corresponde a la caja Petri de menor temperatura donde no crecen colonias.
- j) Todos los pasos se realizan en condiciones axénicas y constante observación.

De manera análoga, se determina la temperatura óptima de crecimiento, sólo que la caja Petri de referencia es donde primero surge una colonia. De presentarse dos primeras colonias que germinen en el mismo lapso, se elige la de mayor tamaño.

II.3.3.2—Determinación del pH óptimo

El pH óptimo se determinó de la siguiente manera [54]:

- a) Se prepara medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, carente de catión ferroso.
- b) En cada matraz el medio se ajusta con los valores de pH citados en la Tabla II.3.
- c) A cada matraz se le agrega agar en la cantidad definida en el medio de aislamiento de la Norma 9240—D.
- d) Los matraces se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 16 psi y 121° C.
- e) Se vierte el contenido de cada matraz en una caja Petri.
- f) En cada caja Petri se siembra una colonia de manera estriada.
- g) Las cajas se incuban durante 48 horas a 30° C en estufa.
- h) El pH óptimo corresponde a la caja Petri donde surja la primera colonia.
- i) Todos los pasos se realizan en condiciones axénicas y constante observación.

II.3.3.3—Lapso térmico mortal.

Es el tiempo mínimo requerido para hacer fenecer todos los microorganismos de una solución a una determinada temperatura. Consecuentemente los pasos de este experimento son los siguientes [55]:

- a) Seleccionar un inóculo de la Caja Petri.
- b) Sembrarlo en un tubo de ensayo con medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, sin $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ni ajuste de pH. Se cultivan tantas muestras como valores correspondientes según el paso.
- c) Se incuban los tubos durante 48 horas a 25° C en estufa.

- d) Se calientan todos los tubos a Baño María durante 10 minutos a 40° C.
- e) Se toma un inóculo del primer tubo y se siembra en agar del medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, sin catión ferroso ni ajuste de pH.
- f) El experimento en caja Petri no excede de 48 horas.
- g) Se mantiene constante la temperatura del Baño María, permaneciendo en ese valor durante otros 10 minutos.
- h) Se repiten los incisos e al g, hasta realizar el experimento de 60 minutos.
- i) El lapso térmico mortal corresponde a la caja Petri de menor tiempo donde no crecen colonias.
- j) Todos los pasos se realizan en condiciones axénicas y constante observación.
- k) Se repite el ciclo para la temperatura de 45° C.

II.3.4—Espectroscopía.

En la bibliografía se describen por lo menos dos reacciones representativas de la biolixiviación, la transformación del catión ferroso a férrico y la del anión sulfuro a sulfato, asimismo Mc Farland desarrolló una técnica de cuantificación de microorganismos, basada en la equivalencia entre una suspensión conocida de $\text{BaSO}_{4(s)}$ y un número determinado de bacterias.

Por lo anterior, las siguientes especies se cuantifican por espectroscopía de ultravioleta visible:

- 1) Anión sulfato [56].
- 2) Microorganismos por técnica de la Curva Mc Farland [57].
- 3) Cationes ferroso y férrico [58].
- 4) Anión sulfuro [38].

Las condiciones de lectura en cumplimiento de la Ley de Lambert y Bert se definen en la Tabla II.4.

TABLA II.4.—Condiciones por Ley de Lambert y Bert para la espectroscopía de ultravioleta visible [59].

ESPECIE	PRINCIPIO	LONGITUD DE ONDA	CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA
Anión sulfato	Turbidimetría	420 nm	[0, 40] ppm	[0, 0.3515]
Microorganismo	Equivalencia a turbidimetría	420 nm	[3.0 x 10 ⁸ , 12 x 10 ⁸] bacterias	[0, 0.3515]
Cationes ferroso y férrico	Complejometría	510 nm	[0, 0.75] ppm	[0, 0.1617]
Anión sulfuro	Complejometría	670 nm	[0, 29] ppm	[0, 1.15653]

Asimismo, se aprovechó el barrido del equipo de 200 a 1100 nanómetros para poner de manifiesto la banda de hidrocarburos generada por el microorganismo.

Los matraces analizados por espectroscopía se preparan de la siguiente manera:

- A) Matraz con agua destilada y abiótica.
- B) Matraz con 100 mL de medio del *Thiobacillus ferrooxidans* sin FeSO₄·7H₂O. Estrictamente estéril.
- C) Matraz con 100 mL de medio del *Thiobacillus ferrooxidans* dotado de 4.4 gr/L de FeSO₄·7H₂O. Estrictamente abiótico.
- D) Matraz inoculado con 1.5 gr de cultivo proveniente de cajas Petri, en medio acuoso de medio del *Thiobacillus ferrooxidans* carente de sulfato ferroso heptahidratado. Estrictamente axénico.
- E) Matraz obtenido mediante la siguiente secuencia: Cultivo de 2 semanas en caja Petri, siembra de 1.5 g de agar para incubación de 2 semanas en medio acuoso, se tomó muestra líquida de 10 mL de éste para sembrar 2 semanas en otro medio acuoso y finalmente inocular con 5 mL en matraz operativo. Todo en medio del *Thiobacillus ferrooxidans* sin sulfato ferroso. Estrictamente axénico.

Los cultivos anteriores fueron desarrollados en incubador orbital a 35°C y rapidez angular de 150 Hz, a ningún matraz se le ajusta el pH.

La toma de muestras para análisis se realiza en campana de flujo laminar con la técnica axénica de manejo de microorganismos.

II.3.4—Conductimetría.

La conductividad electrolítica es de los parámetros cuantificados un mayor número de veces en amplia diversidad de actividades: farmacéutica, alimenticia, el sector eléctrico, evaluación ambiental y control de solutos en agua [60].

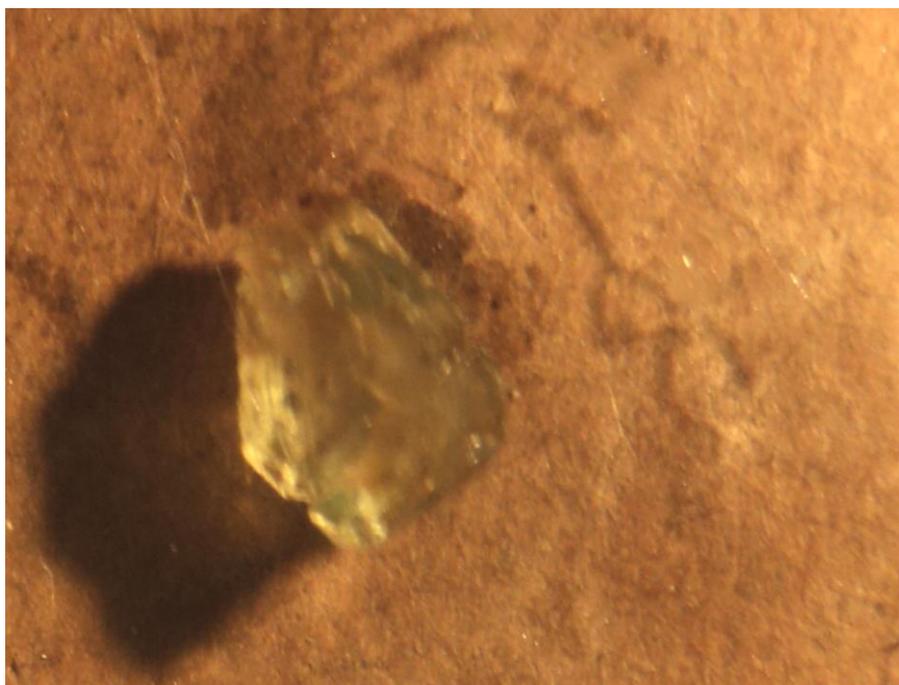


Figura 2.2.—Muestra dendrítica para el experimento de conductividad.

Para esta etapa se dispone del matraz E de espectroscopía de ultravioleta visible. A partir de su medio acuoso se prepara una dendrita de solución microbiana, ámbar y aséptica; se toma una muestra sólida, Figura 2.2, para preparar un solución con agua destilada abiótica y una concentración de 0.0456 gr matriz ámbar/litro. De esta solución llamada 100 %, se prepara una disolución con una cantidad del 80 % de la masa ámbar

inicial, así sucesivamente, hasta acercarse al 0 %. A todas las soluciones se les mide la conductividad [61].

11.4.—EXPERIMENTOS METALÚRGICOS

II.4.1.—Muestra de mineral

Las muestras de mineral fueron sometidas a trituración en mortero con el fin de exponer a las bacterias nativas para su eliminación por alcohol—acetona de Gram [62]. El mineral conminuido se deposita en cajas Petri estériles, se guardan en campana de flujo laminar, mientras permanecen en la misma, se saturan cuatros veces de alcohol—acetona, solución 1:1, permitiendo en cada etapa su evaporación total.

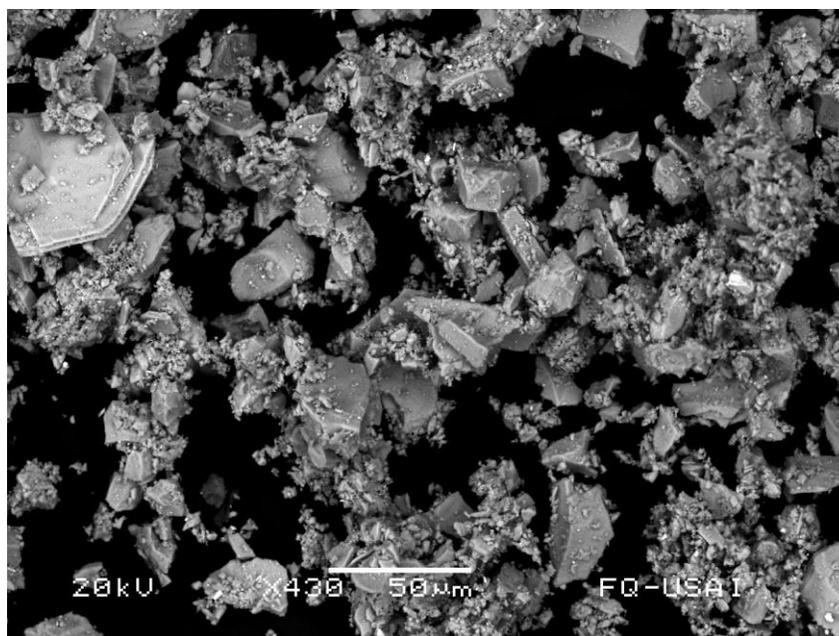


Figura 2.2.—Micrografía electrónica de calcopirita de la mina La Caridad, Nacozari de García, Estado de Sonora, 430 X.

El mineral utilizado fue proporcionado por la empresa Mexicana de Cobre, S.A de C.V. La muestra fue obtenida por barreno de la Unidad Minera “La Caridad”, Nacozari de García, Estado de Sonora, México. Una vez recibido el mineral, fue tomada una muestra representativa, preparada por molienda a 200 mallas. El mineral fue observado al microscopio electrónico de barrido, Figura 2.2, analizado por espectroscopía de energía

dispersa de rayos X (E.D.S.), Figura 2.3, asimismo por análisis químico; obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla II.5.

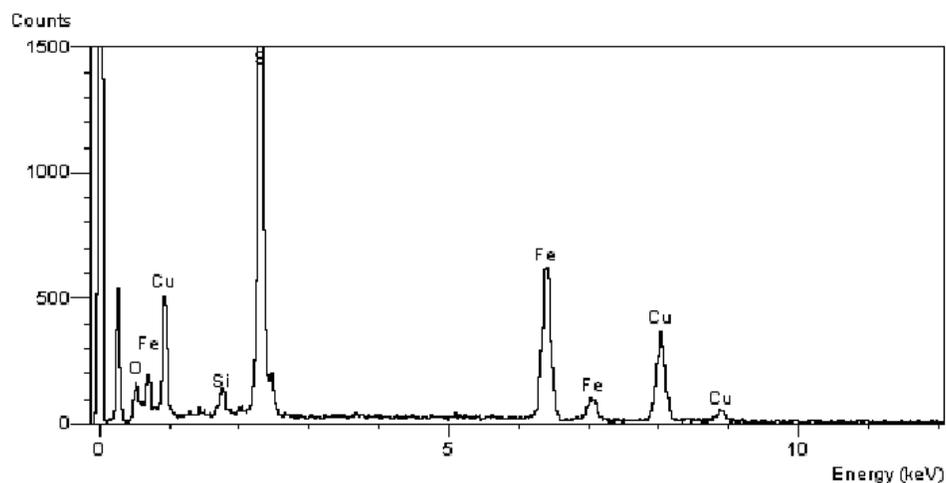


Figura 2.3.—Difractograma obtenido por E.D.S. de calcopirita de la mina La Caridad, Nacozari de García, Estado de Sonora.

Tabla II.5 Mineral experimental.

EXPERIMENT	NÚMERO DE MALLA	LEY DE Cu	LEY DE Fe	LEY CuFeS ₂
O				
Flotación	100	32.29 %	30.26 %	88.63 %
Lixiviación	200	35.11 %	31.93 %	94.31 %
EXPERIMENT	Cu POR CuFeS ₂	Cu NATIVO Y ÓXIDO	Fe POR CuFeS ₂	Fe ÓXIDO
O				
Flotación	30.70 %	1.59 %	26.98 %	3.28 %
Lixiviación	32.66 %	2.45 %	25.44 %	1.06 %

II.4.2—Flotación del mineral

Las pruebas de flotación fueron llevadas a cabo bajo el siguiente desarrollo experimental [63]:

- Se preparó un matraz de 250 ml con 95 ml de medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, sin ajuste de pH, carente de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- 0.2 g de mineral fueron usados en la prueba de flotación. Las leyes se reportan en la Tabla II.5.
- Un matraz testigo de 250 ml, fue preparado con 100 ml del medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, sin ajuste de pH, carente de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, adicionado con 0.2 g de mineral
- El primer matraz se inocula con 5 ml del matraz E del experimento de espectroscopía.
- Ambos matraces se cultivan en incubador orbital a 35°C y rapidez angular de 150 Hz.
- La cama de burbujas es barrida cada 24 horas con espátula.
- El concentrado de la prueba de flotación fue colectado en porta muestras de plástico, con 10 ml de solución alcohol—acetona 1 a 1 en volumen.

Tabla II.6 Concentración de cabezas.

VALORES DE COBRE		VALORES DE HIERRO	
Cu por CuFeS_2	0.0614 g	Fe por CuFeS_2	0.05396 g
Concentración en pulpa CuFeS_2	0.000614 g/ml	Concentración en pulpa CuFeS_2	0.000539 g/ml
Cu nativo y óxido	0.00318 g	Fe óxido	0.00656 g
Concentración en pulpa Cu nativo y óxido	0.000031 g/ml	Concentración en pulpa Fe óxido	0.000065 g/ml
Cu total	0.06458 g	Fe Total	0.06052 g
Concentración en pulpa Cu total	0.000645 g/ml	Concentración en pulpa Fe Total	0.000605 g/ml

- El nivel acuoso se mantuvo constante durante toda la prueba con agua abiótica y destilada.
- Las muestra de cabeza, concentrados y colas de la prueba de flotación fueron pesadas en húmedo, secadas a 30 °C y pesadas en seco.
- Las muestras de cabeza, colas y concentrado se prepararon para su observación al microscopio electrónico de barrido.

- En cada muestra se prepara un inóculo para siembra en caja Petri con agar del medio del *Thiobacillus ferrooxidans*, sin ajuste de pH y carente de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- Todos los pasos se realizan en estricto apego a la técnica axénica.
- El experimento se realiza por triplicado.

II.4.3—Lixiviación

Los cultivos se prepararon en matraces Erlenmeyer de 250 ml, el medio empleado fue el *Thiobacillus ferrooxidans* de la norma 9240—D, carente de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sin ajuste de pH, volumen total de 100 mL esterilizados. Las demás características se detallan en Tabla II.7, Tabla II.8, Tabla II.9 Y Tabla II.10.

Tabla II.7.—Sistemas experimentales de lixiviación de calcopirita

Matraz	CuFeS_2	Volumen de inóculo
Ce—1	0.2010 g	5 ml
Ome—2—testigo	0.2010 g	0 ml
Chicuace—6	0.2010 g	5 ml

Tabla II.8.—Sistemas experimentales de lixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita

Matraz	CuFeS_2	MoS_2	Volumen de inóculo
Yey—3	0.0997 g	0.0998 g	5 ml
Nahui—4—testigo	0.0998 g	0.0998 g	0 ml
Macuilli—5	0.1000 g	0.1010 g	5 ml

Las concentraciones de los valores se reportan en las Tablas II.7 y II.8.

Tabla II.9.—Concentraciones iniciales del experimento de lixiviación de calcopirita.

Valores de Cobre		Valores de Hierro	
Cu por CuFeS ₂	0.06532 g	Fe por CuFeS ₂	0.05088 g
Concentración en pulpa CuFeS ₂	0.000653 g/ml	Concentración en pulpa CuFeS ₂	0.000508 g/ml
Cu nativo y óxido	0.0049 g	Fe óxido	0.00212 g
Concentración en pulpa Cu nativo y óxido	0.000049 g/ml	Concentración en pulpa Fe óxido	0.000021 g/ml
Cu total	0.07022 g	Fe total	0.05300 g
Concentración en pulpa Cu Total	0.000702 g/ml	Concentración en pulpa Fe total	0.000530 g/ml

Los cultivos anteriores fueron desarrollados en incubador orbital a 35°C y rapidez angular de 150 Hz.

Se monitorearon periódicamente pH y potencial óxido—reducción con los electrodos combinados correspondientes, ambos con electrodos de Ag/AgCl como referencia interna. Se tomaron 2.5 ml de solución del matraz para aforarse en 25 mL, recuperándose el volumen con agua destilada abiótica, en las diluciones se cuantificaron las concentraciones de cobre y hierro por espectrometría de absorción atómica [64].

Tabla II.10.—Concentraciones iniciales del experimento de lixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita.

Valores de Cobre		Valores de Hierro	
Cu por CuFeS ₂	0.03266 g	Fe por CuFeS ₂	0.02544 g
Concentración en pulpa	0.00032 g/ml	Concentración en pulpa	0.000254 g/ml
Cu nativo y óxido	0.00245 g	Fe óxido	0.00106 g
Concentración en pulpa	0.000024 g/ml	Concentración en pulpa	0.0000105 g/ml
Cu total	0.03511 g	Fe total	0.02650 g
Concentración en pulpa	0.000351 g/ml	Concentración en pulpa	0.000265 g/ml

Todo experimento se realizó en estricto apego a la técnica axénica de manejo de microorganismos.

II.5—EXPERIMENTO ECOLÓGICO

A fin de determinar los primeros efectos de GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI en el medio ambiente, se procedió a germinar frijoles en algodón humedecido en agua potable. Desarrollada la planta, se le inocula con 1.5 g de agar de GARA—LIZ, procurando sea muestra superficial.

Asimismo en semillas con algodón humedecido, se le inoculó la misma cantidad de agar de microbios, a la espera de constatar la germinación o no de los frijoles. En ambos casos el testigo se prepara de manera igual, desde luego con agar de cultivo sin microorganismos.

CAPÍTULO TERCERO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1—CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.

III.1.1—Colonia.

La colonia joven de GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI, es blanca, superficial, extendida, amorfa, homogénea, no cambia ni de color, ni de aspecto y la colonia puede generar burbujas de diversos tamaños, Figura 3.1.

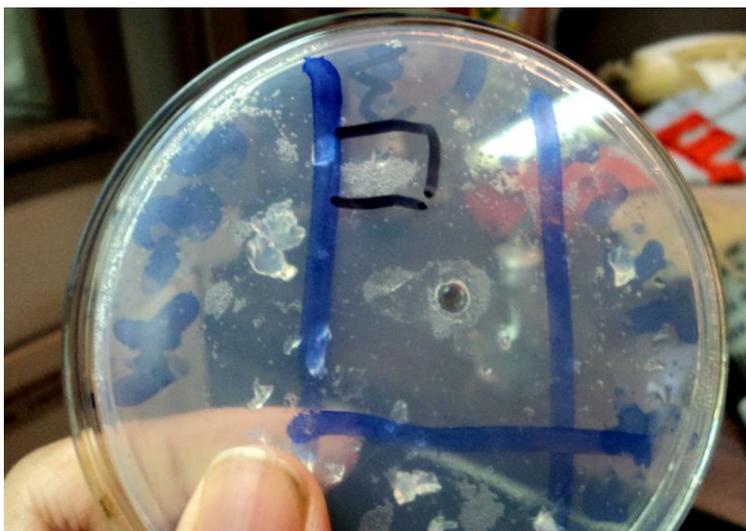


Figura 3.1— Colonias de GARA—LIZ en caja Petri y medio del *Thiobacillus ferrooxidans* sin catión ferroso, ni ajuste de pH.

Respecto a los medios de cultivo, se obtuvieron diferentes tiempos de desarrollo de colonias, de 24 a 72 horas, correspondiendo el lapso mayor a los medios menos adecuados: Medio del *Thiobacillus thioparus* y aislamiento. Los medios mejores de sustento son del *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*, aunque en éste la presencia de las partículas de S⁰ dificulta la visualización de las colonias.

III. 1.2—Respuesta a los cambios de temperatura y pH.

El punto térmico mortal es 50° C. La temperatura óptima es 45° C. El microorganismo metalúrgico puede desarrollarse en el rango de pH 3 a 7, conforme el medio se acidifica, más rápido es su crecimiento. El mejor desarrollo en agar se obtiene a

pH 2.7. A temperatura y pH óptimos, en 14 horas surge la primera colonia en agar/medio *Thiobacillus ferrooxidans*.

El experimento de lapso térmico mortal no alteró el desarrollo del microorganismo, se pudo comprobar que puede resistir las temperaturas de 40° y 45° C sin afectación durante 610 y 602 minutos respectivamente.

De lo anterior se concluye, que GARA—LIZ es termófila moderada, acidófila no estricta.

III.1.3—Capacidad ferrooxidante.

La oxidación visible del ion ferroso, en presencia del microbio metalúrgico, se realiza en menos de 48 horas, asimismo sólo se llevó a cabo en el área propiamente dicha de la colonia inoculada, en los otros sitios del tubo de ensayo, la solución permanece transparente. El testigo siempre es incoloro en todo el tiempo de estudio. El resultado experimental se confirmó en matraces agitados en incubador orbital a 35°C y rapidez angular de 150 Hz, Figura 3.2.



Figura 3.2— Experimento ferrooxidante. A la izquierda testigo, a la derecha sistema inoculado.

En la Figura 3.3, experimento ferrooxidante en tubos de ensayo, se aprecian una serie de detalles interesantes:

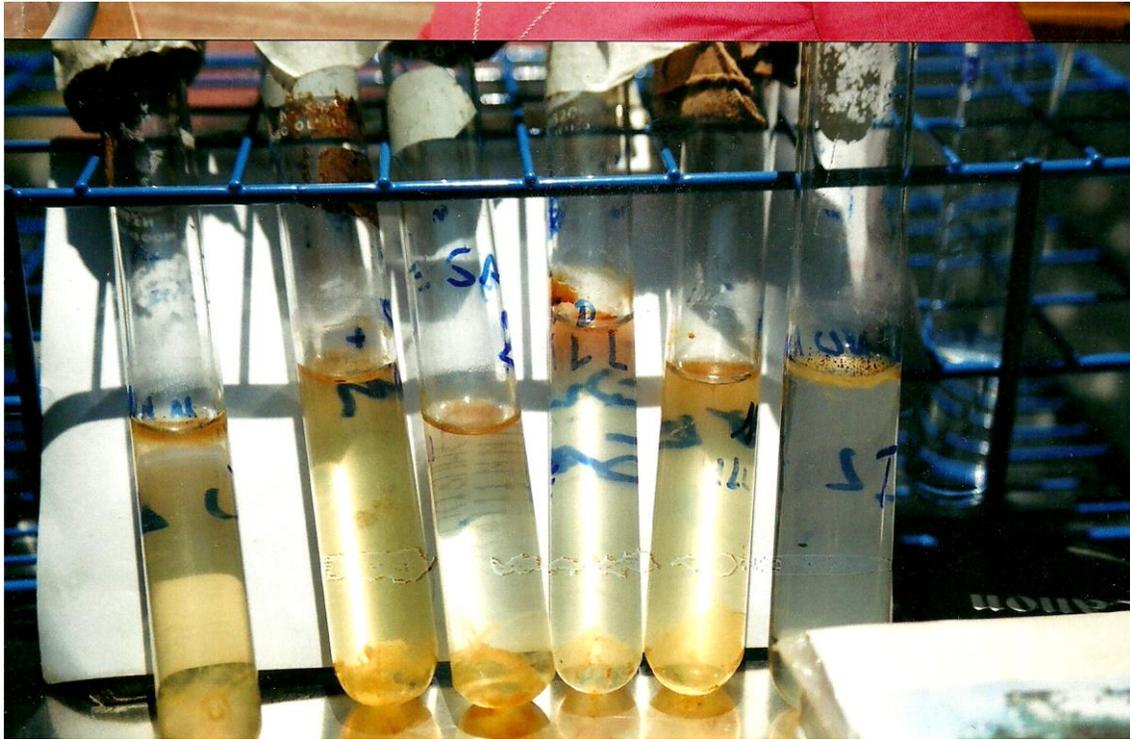


Figura 3.3.—Experimento ferrooxidante, el testigo se encuentra al extremo derecho, fondo negro.

- I) En el primer tubo de izquierda a derecha el agar precipitado tiene un tinte anaranjado y burbuja.
- II) El cuarto tubo presenta un fragmento flotante de agar inoculado, sólo en esta área se ha desarrollado el color naranja, el resto de la solución permanece incoloro.
- III) En el subsecuente tubo se ha sembrado solución del microorganismo, en este caso el cambio de color es en todo el medio.

III.1.4—Microscopía

La aplicación de la técnica de preparación de muestras Karnovski, previamente adaptada para observar los microbios metalúrgicos al microscopio electrónico de barrido, generó un resultado negativo durante 4 veces consecutivas.

La imagen de la preparación al microscopio óptico, 400 X, es muy deficiente, Figura 3.4, no se aprecia alguna forma biológica, por lo tanto, no es posible cuantificar al microorganismo por el método de la cámara Neubauer.

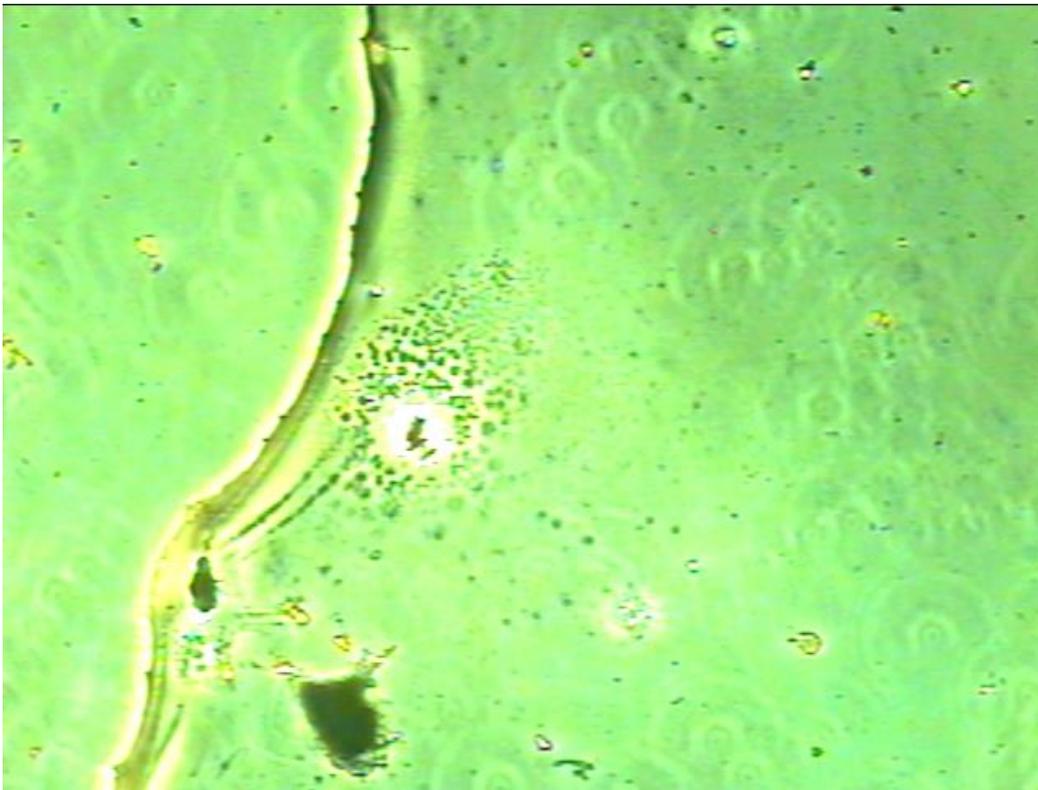


Figura 3.4— Preparación fija a
a 400 X con tinción de Gram.

La preparación fija con tinción de Gram a 1000 X, técnica de inmersión, 10 x 100 aumentos, Figura 3.5, revela tres aspectos:

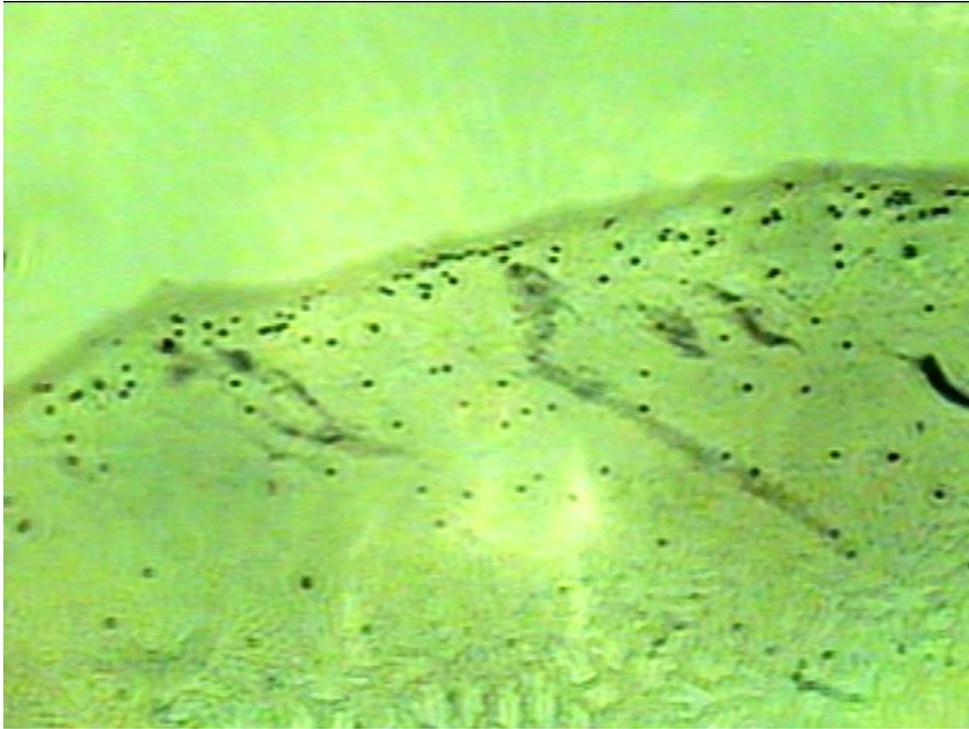


Figura 3.5—GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI
con tinción de Gram a 1000 X.

a) El microorganismo presenta forma claramente esférica, coloración violeta por absorción del complejo de yodo—cristal violeta, retenido en la membrana después del lavado con alcohol—acetona, comportamiento típico de una estructura rica en peptidoglucano, siendo gram—positiva, [65], Figura 3.5.



Figura 3.6—Cápsula de GARA—LIZ, aumento vacío de la Figura 3.5.

b) La presencia de una cápsula. En torno del microorganismo metalúrgico se observa una zona decolorada claramente circular, seguida de una zona oscura, ésta probablemente debida a una reacción con las tinturas, Figura 3.6.

c) El aspecto general de la preparación fija es dendrítica, Figura 3.7.

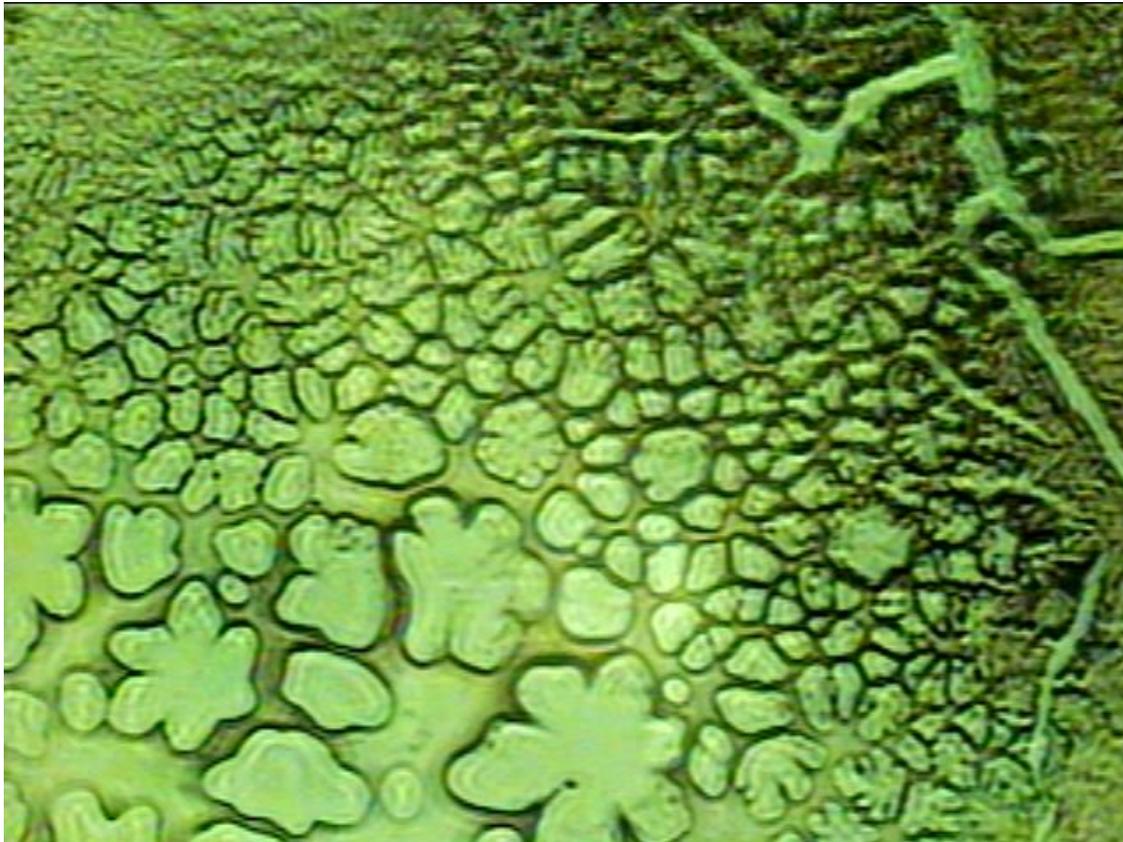


Figura 3.7—Dendritas de GARA—LIZ
con tinción de Gram a 1000 X.

El Manual de Bergey de determinación bacteriológica clasifica 15 géneros diferentes de bacterias Gram positivas, para el caso, sólo menciona las químiolitotróficas mesófilas y termófilas extremas, no cita a las termófilas moderadas formadoras de dendritas como el microorganismo en estudio [66].

III.1.5—Espectroscopía de ultravioleta visible

III.5.1—Evolución del espectro.

Los espectros en ultravioleta visible de la agua y del medio de *Thiobacillus ferrooxidans* carente de sulfato ferroso, matraces A y B, presentan una línea recta, sin ninguna absorción, Figura 3.8.

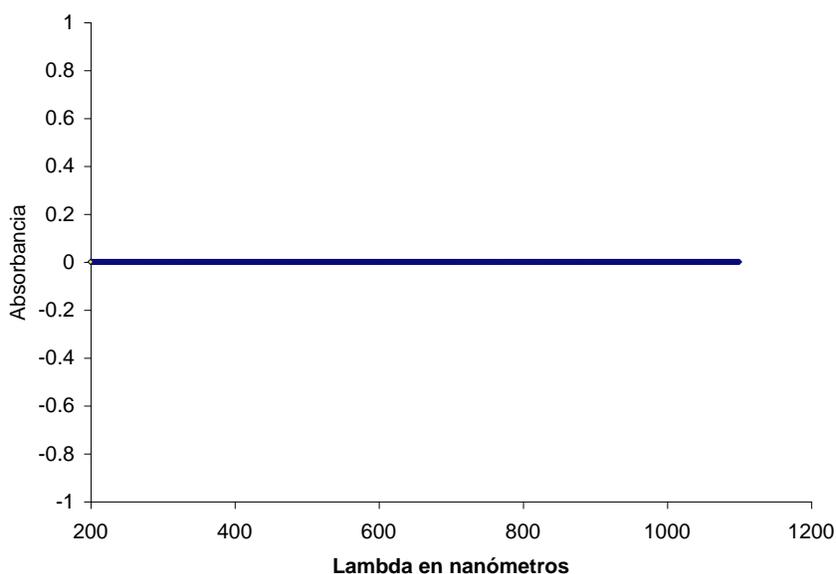


Figura 3.8.—Espectro en ultravioleta visible del medio de *Thiobacillus ferrooxidans* sin $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

El espectro del medio de *Thiobacillus ferrooxidans*, Figura 3.9, preparado conforme a la Norma 9240—D, matraz C, se caracteriza en el rango de 250 a 280 nm por una intensa absorción, contigua una señal negativa, de 300 a 500 nm hay una ligera absorción, en longitudes de onda superiores no se detecta señal alguna.

La muestra del matraz D, microorganismo al tiempo inicial, produce una señal de absorbancia similar a la del medio normalizado, incluso en la misma ubicación, alrededor de 270 nm emite una radiación intensa, muy superior al medio de la Norma 9240—D, en el rango contiguo absorbe ultravioleta hasta los 370 nm, Figura 3.10.

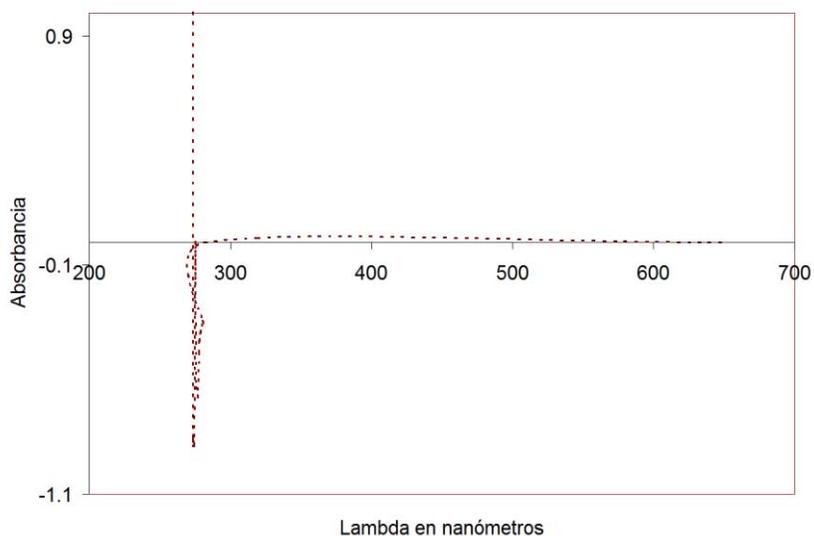


Figura 3.9.—Espectro del medio de *Thiobacillus ferrooxidans*, Norma 9240—D, observe el rango de radiación cercano a 270 nm

Petersen y Dixon, como ya se mencionó en el capítulo primero, afirman el carácter exotérmico de las reacciones producidas por actividad metabólica de los microbios metalúrgicos, es factible que el microorganismo en estudio emita alguna radiación detectada por el espectroscopio de ultravioleta visible, la cual el equipo interpreta como “absorbancia negativa”.

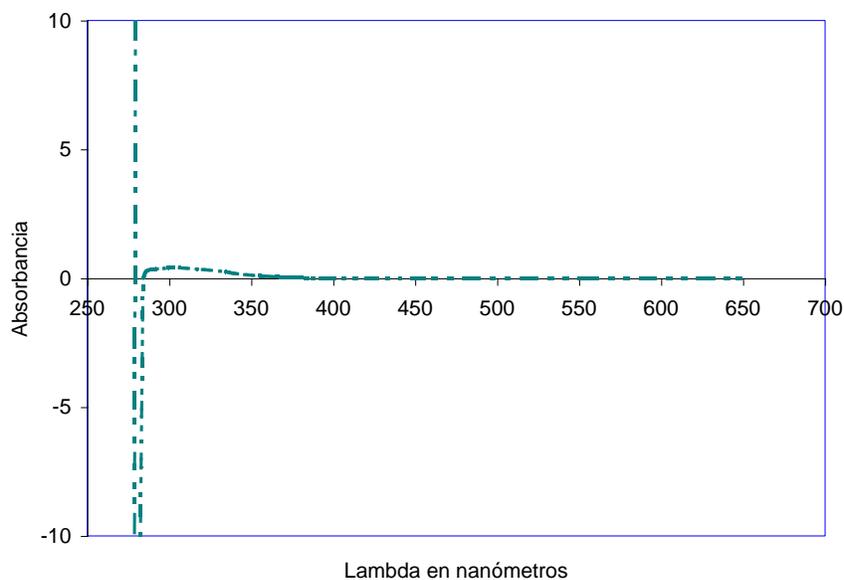


Figura 3.10.—Espectro de ultravioleta visible de GARA—LIZ recién inoculada.

La muestra del matraz D, 3 días de cultivo, presenta una señal de absorbancia de incremento notorio, oculta la señal primaria de emisión, figura 3.11.

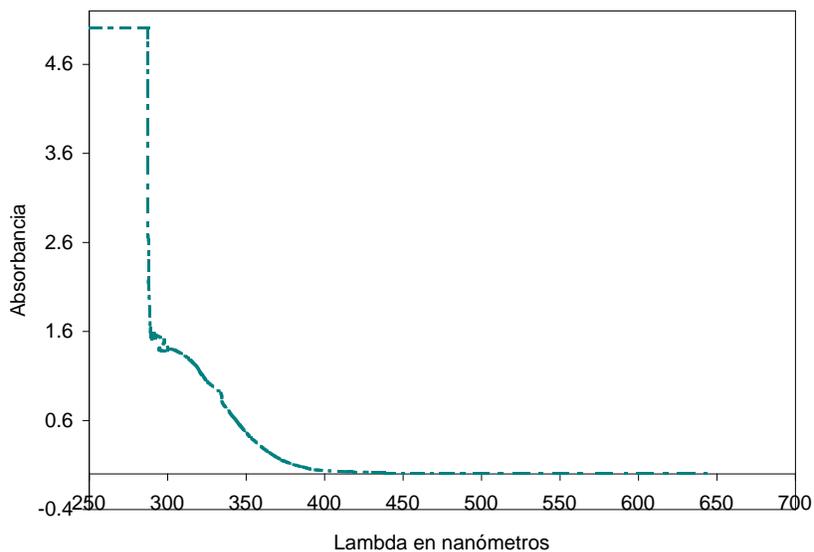


Figura 3.11.—Espectro de ultravioleta visible de GARA—LIZ después de 3 días de cultivo.

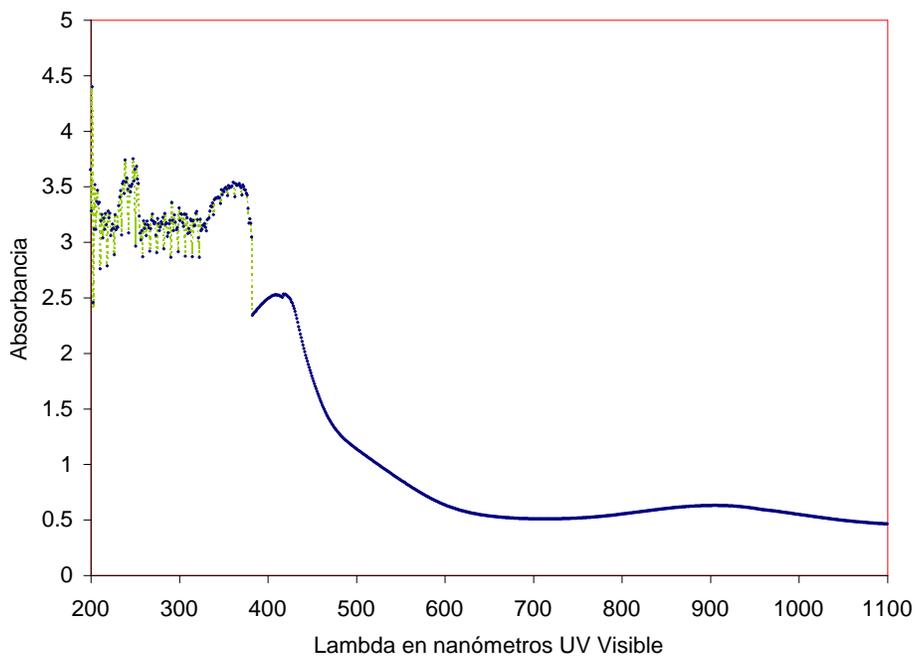


Figura 3.12.—Espectros completos de GARA—LIZ, matraz E.

En la muestra proveniente del matraz E, la absorción es tan intensa como para ocultar la radiación, Figura 3.12. En los valores extremos de longitud de onda se aprecian zonas de señal. La señal izquierda es muy notoria, al séptimo día se observa la aparición de una contigua, plenamente desarrollada a la semana siguiente. En todo momento, aunque la absorción sea muy pequeña, por ejemplo 0.01414 a 519 nm, nunca se suprime en todo el rango.

III.1.5.2—Interferencias, absorción y rapidez de crecimiento exponencial.

Respecto a los experimentos de cuantificación de microorganismos, iones ferroso, férrico, sulfuro y sulfato, se hacen las siguientes acotaciones:

I.— Los aniones sulfatos generan espectro cuantificable a 420 nm, pero en esa longitud de onda, una vez inoculada la bacteria, se generan una serie de diferentes absorbciones. Al primer día es de 0.03821, al séptimo de 0.39966 y al décimocuarto de 2.52114; (valores promedio de tres lecturas).

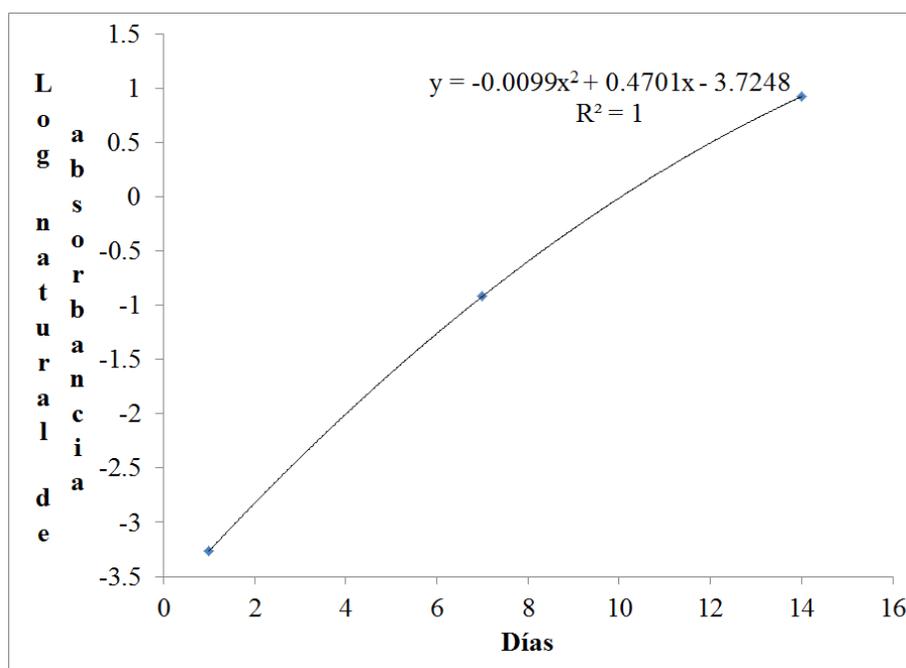


Figura 3.13.—Logaritmo natural de la absorbancia a 420 nm. Valores promedio.

Aunque no se trata de una especie química, el cómputo de microbios por la técnica de la Curva Mc Farland también se realiza en la longitud de onda del ion sulfato. Para este conjunto de datos, considerando el logaritmo natural del promedio de absorbancia microbiana, la ecuación mejor para representarlos es $y = -0.099 x^2 + 0.4701 x - 3.7248$ con un valor de $R^2 = 1$, Figura 3.13.

II.— La lectura del catión ferroso se realiza a 510 nm. Recién inoculada la bacteria, se generan una serie de interferencias, al primer día es de 0.01523, al séptimo de 0.10049 y al décimocuarto de 1.08012; (valores promedio de tres lecturas).

Para este conjunto de datos, considerando el logaritmo natural del promedio de absorbancia microbiana, la ecuación mejor para representarlos es $y = 0.3282 x - 4.5445$ con un valor de $R^2 = 0.9994$, Figura 3.14.

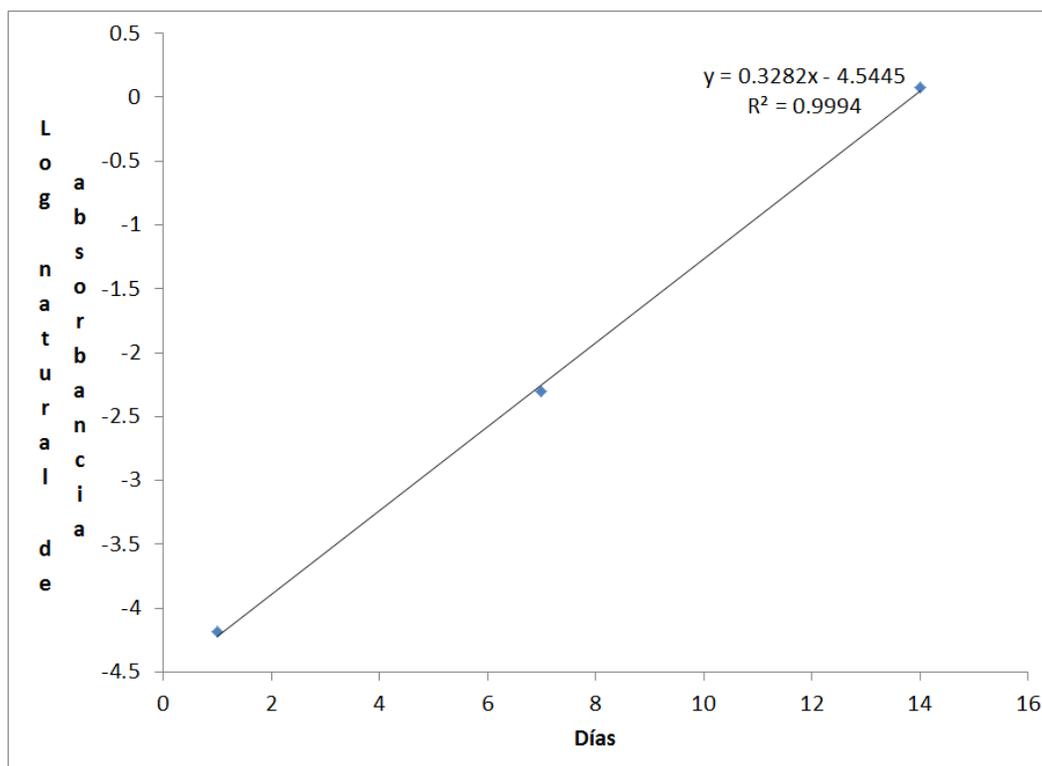


Figura 3.14.—Logaritmo natural de la absorbancia a 510 nm. Valores promedio.

Moreira Dos Santos [66] y Zamora Rodríguez [67], consideran al valor de la pendiente de la anterior ecuación lineal, $0.3282 \text{ Ln (Absorbancia/días)}$, como la rapidez de crecimiento exponencial del microorganismo [68].

III.— Los aniones sulfuros se detectan en la longitud de onda de 670 nm, pero en esa longitud de onda, una vez inoculada la bacteria, se generan una serie de interferencias, al primer día es de 0.023893, al séptimo de 0.03085 y al décimocuarto de 0.51671; (valores promedio de tres lecturas).

Para este conjunto de datos, considerando el logaritmo natural del promedio de absorbancia microbiana, la ecuación mejor para representarlos es $y = 0.0277x^2 - 0.179x - 3.5829$ con un valor de $R^2 = 1$, Figura 3.15.

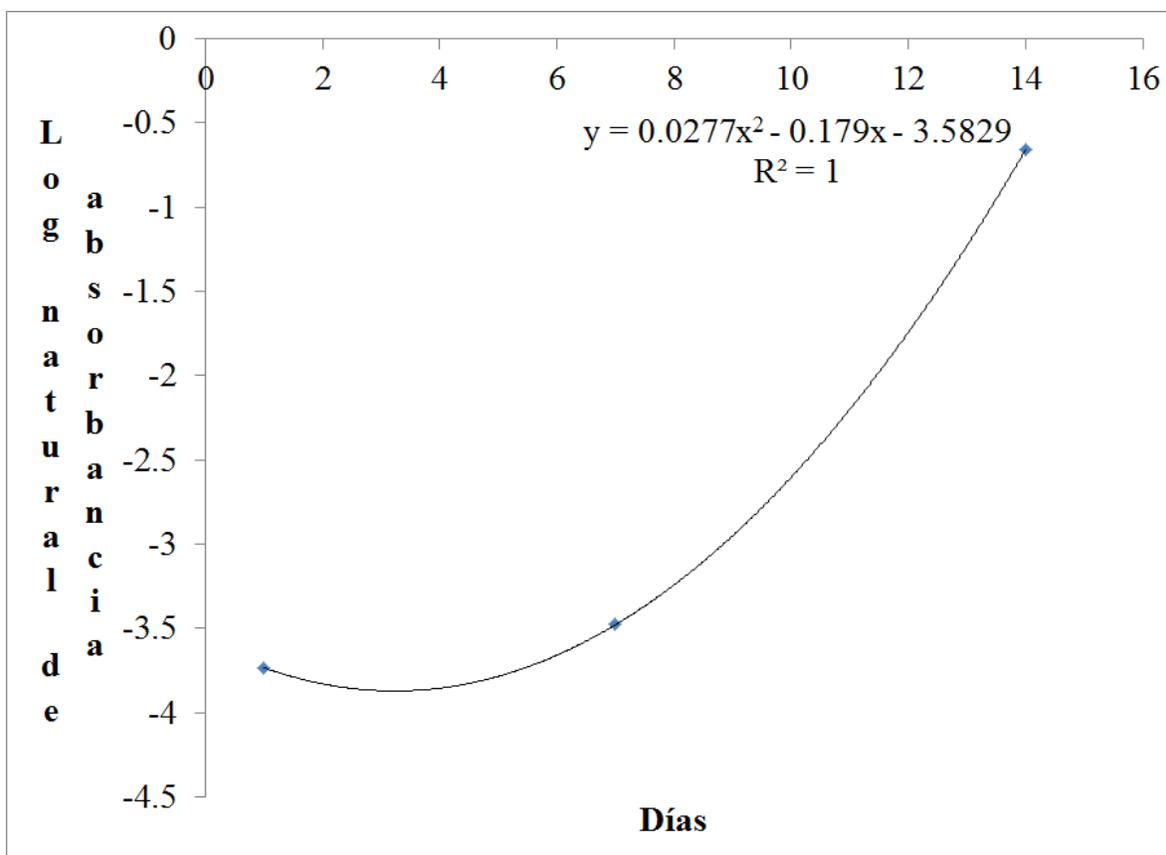


Figura 3.15.—Logaritmo natural de la absorbancia a 670 nm. Valores promedio.

En todo momento la actividad metabólica de la bacteria, se traduce en una fuente de interferencia en las lecturas de los iones de interés y en el cómputo de microbios por espectroscopía. Al tomar como alternativa medir un sistema sin ferroso, para fungir de “cero” respecto a uno con ion ferroso o mineral, la cuestión no se resuelve, porque no se puede determinar el impacto en la nutrición del microbio con y sin el compuesto agregado.

III.1.5.3—Bandas hipsocrómicas.

Asimismo, el espectro de la Figura 3.16 guarda un interesante parecido con la zona izquierda de la señal del microorganismo en estudio, se trata de la absorción producida por un tensoactivo de la familia del sulfato de 2,2—diundecil—1, 3—dioxan—4—1 1 metil—4,5 bis—trietilamonio metano, compuestos desarrollados y estudiados hace 23 años. La señal generada a longitudes de onda inferiores a 289 nm corresponde a las cadenas alifáticas mayores a 8 carbonos, así como a los grupos funcionales del anfifilo.

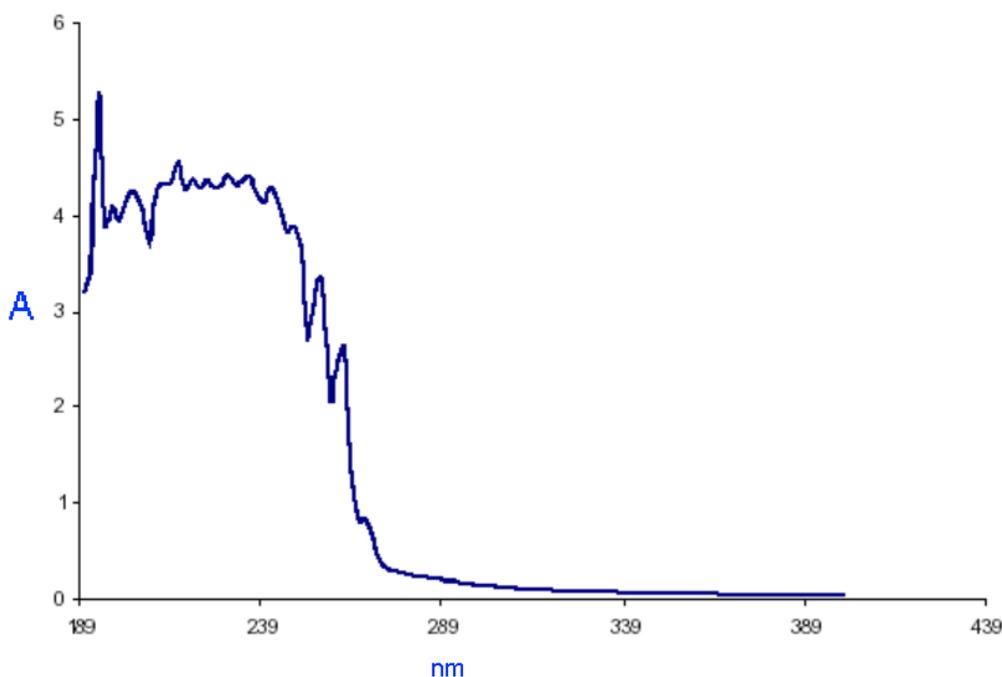


Figura 3.16.—Espectro en ultravioleta visible de un anfifilo enantiómero [25].

En el caso del microorganismo en estudio se detectan claramente las siguientes bandas hipsocrómicas, ver Figura 3.17:

- 1) Absorción en el rango [230, 270] nm, correspondiente a las bandas de anillos bencénicos y nafténicos.
- 2) Banda Soret, alrededor de 410 nm, característica de compuestos porfirínicos.
- 3) Bandas a 510 y 570 nm denominadas α y β respectivamente, las cuales están asociadas a porfirinas coordinadas con metales divalentes [69].

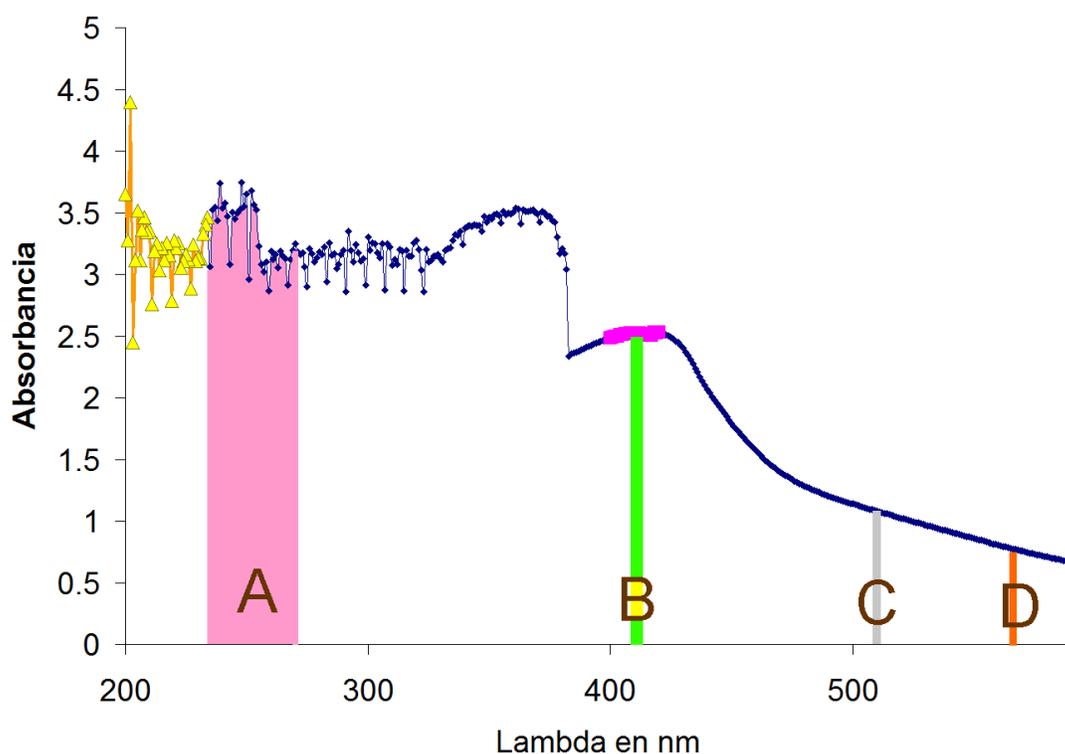


Figura 3.17.— Bandas hipsocrómicas detectadas:

A.—Banda de anillos bencénicos y nafténicos. B.—Banda Soret. C.—Banda α . D.—Banda β .

III.1.6.—Fenómeno de tensión superficial.

Un experimento completo del matraz E debe durar alrededor de 45 días, al prepararse la muestra posterior al día 14 para su estudio, y tratar de vertirse en la celda de cuarzo para su análisis por ultravioleta visible, simplemente el fluido no descendió del matraz aforado, permaneció líquido dentro de su recipiente.

El contenido del matraz aforado es una solución acuosa, nunca gelifica, ni tiende a solidificarse con el transcurso del tiempo, en su preparación se toma una muestra del matraz de GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI. La solución no es el líquido en sí del matraz de cultivo, sino una dilución con agua destilada, debe por tanto haber una concentración en la cual el fenómeno es factible.



Figura 3.18.—El fenómeno de GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI.

A la izquierda al invertirse. A la derecha matraz invertido.

En la Figura 3.18 se observa un matraz aforado invertido sin derramarse, puede permanecer así durante semanas. Hasta la fecha este fenómeno no se ha reportado en la bibliografía.

III.1.7.—Conductividad.

El escalón de la Figura 3.19 corresponde a la concentración micelar crítica, cuando teóricamente se tiene una capa íntegra sobre la superficie del líquido, pero el fenómeno de tensión superficial no se presenta en este punto, ni siquiera en sus inmediaciones, además hay 3 concentraciones en las que se puede repetir el fenómeno, mientras la conductividad permanece lineal en esa zona. Desde luego a reserva de obtener puro al colector.

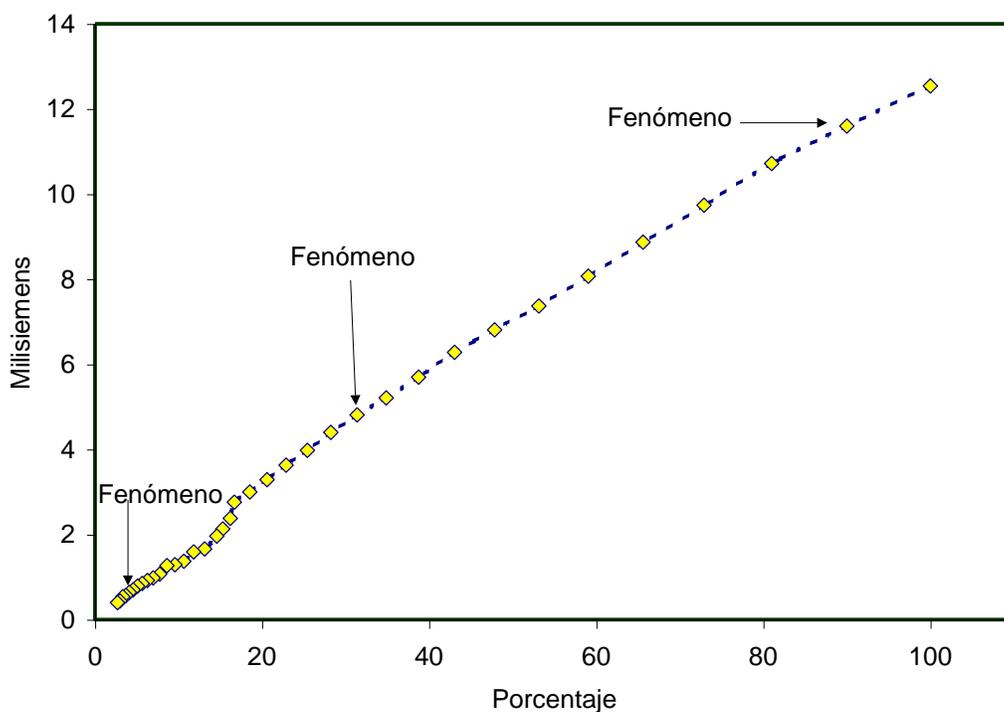


Figura 3.19.— La conductividad y el fenómeno de GARA—ELIZABETH XOCHQUETZALLI.

En conjunto, las características biológicas del microorganismo en estudio se resumen en la Tabla III.1.

Tabla III.1.

CARACTERÍSTICAS DE GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI	
Colonia	Blanca, superficial, amorfa.
Morfología individual	Coco.
Medio de cultivo óptimo	Medio de <i>Thiobacillus thiooxidans</i> .
Comportamiento Gram	Positivo.
Peculiaridades de tinción Gram	Presencia de dendritas.
Rango de pH de crecimiento	[2.58, 7.8], 2.7 pH óptimo en agar.
Peculiaridad de sus soluciones	Tensión superficial modificada.
Temperatura óptima	45° C.
Punto térmico mortal	50° C.
Lapso térmico mortal	Interminable a 40° y 45° C.
Prueba de oxidación del catión Fe ²⁺	Positiva.
Rapidez de crecimiento exponencial a 35° C	R = 0.3282 Ln (Absorbancia/días).
Compuestos detectados por espectroscopía de ultravioleta visible	Anillos bencénicos y nafténicos, compuestos porfirínicos y coordinados con metales bivalentes.
Concentración micelar crítica	0.0091 gr matriz ámbar/litro.

III.2.— CARACTERIZACIÓN METALÚRGICA

III.2.1—Experimento de flotación.

Los resultados de 5 días de experimentos de flotación, se presentan en la Tabla III.2.

Tabla III.2.—Flotación por el microorganismo.

Muestra	Ley de Cu	Ley de Fe	Ley de CuFeS ₂	Masa	Observaciones
Cabeza	32.29 %	30.26 %	88.63 %	0.20000 g	
Concentrado	34.43 %	31.44 %	99.42 %	0.05650 g	Se detectó Mo y W
Colas	1.01 %	0.93 %	3.05 %	0.05084 g	
Lixiviado	48.15 %	46.74 %	70.90 %	0.09266 g	Valores calculados

Técnica de análisis: Microscopía electrónica de barrido.

Los valores reportados de lixiviado corresponden a la diferencia generada entre el balance de cabeza, colas y concentrado. De estos datos se concreta la Tabla III.3.

Tabla III.3.— Características del concentrado.

Rango de pH	[3.11, 5.5]*.	Tiempo máximo de flotación continua	45 días *.
Porcentaje de recuperación de Cu	30.11 %.	Porcentaje de recuperación de CuFeS_2	31.68 %.
Razón de enriquecimiento de Cu	1.06.	Razón de enriquecimiento de CuFeS_2	1.12.

* Dato obtenido de la prueba de lixiviación.

Datos de análisis entre valores experimentales de flotación y calculados de lixiviación derivados de esta prueba, se presentan en la Tabla III.4.

Tabla III.4.—Comparación general.

Cu en cabezas	0.06458 g.	Cu en colas	0.00051 g.
Cu recuperado	99.22 %	Cu perdido	0.78 %.
Cu flotado	30.11 %	Cu lixiviado	69.11%

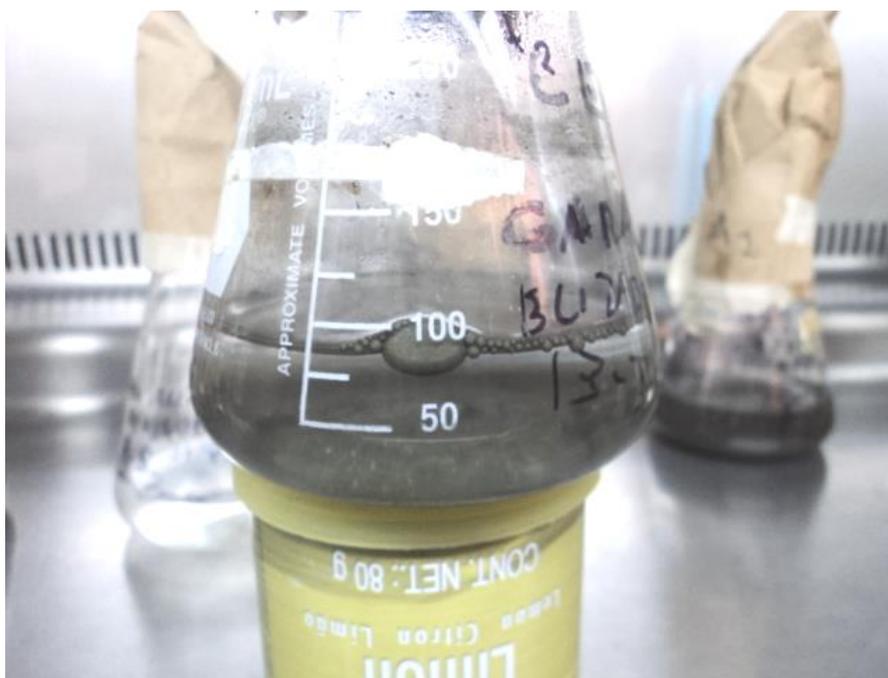


Figura 3.20.—Matraz experimental de flotación inoculado con GARA—LIZ.

Observe las burbujas cubiertas de mineral.

Observaciones:

- a) El experimento no se realizó a pH y temperatura de crecimiento idóneos del microorganismo.
- b) No se emplearon depresores, acondicionadores, sulfurantes y espumantes.
- c) El dispositivo empleado no genera burbujas, las detectadas se forman por actividad microbiana, Figura 3.20.
- d) En el testigo no hay flotación.
- e) Los lixiviados no generaron lecturas fiables por espectrometría de absorción atómica. Punto a retomar más adelante.
- f) El análisis químico del microscopio electrónico de barrido se efectúa en un volumen definido por la superficie de la muestra y una profundidad de 0.5 a 10 micras [70].
- g) El concentrado también flota en una solución 1 a 1 de alcohol—acetona. Figura 3.21.

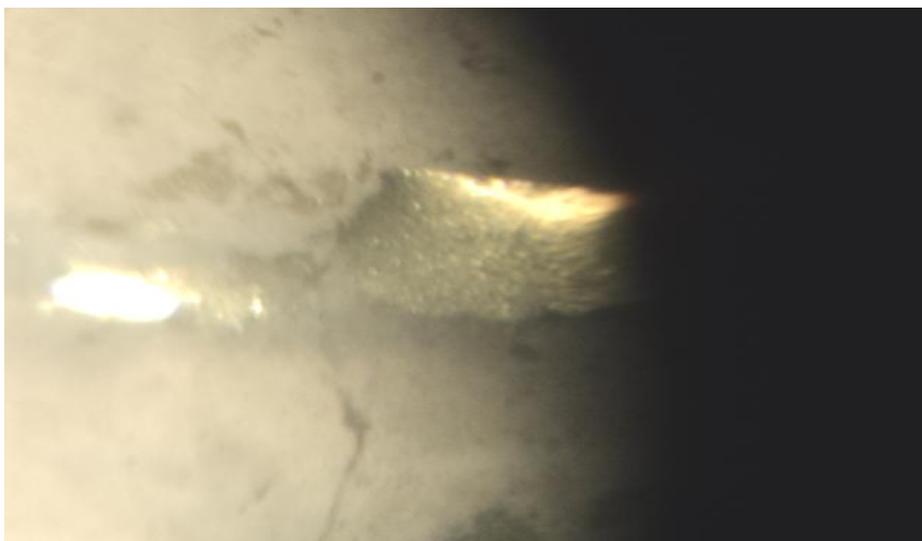


Figura 3.21.—Concentrado sobre alcohol—acetona, foto a 40 X.

Por las observaciones anteriores, no se trató del experimento definitivo, sino la base para considerar a GARA—ELIZABETH XOCHQUETZALLI, una forma de vida

posiblemente interesante para los procesos de beneficio e hidrometalurgia del cobre, Figura 3.22.

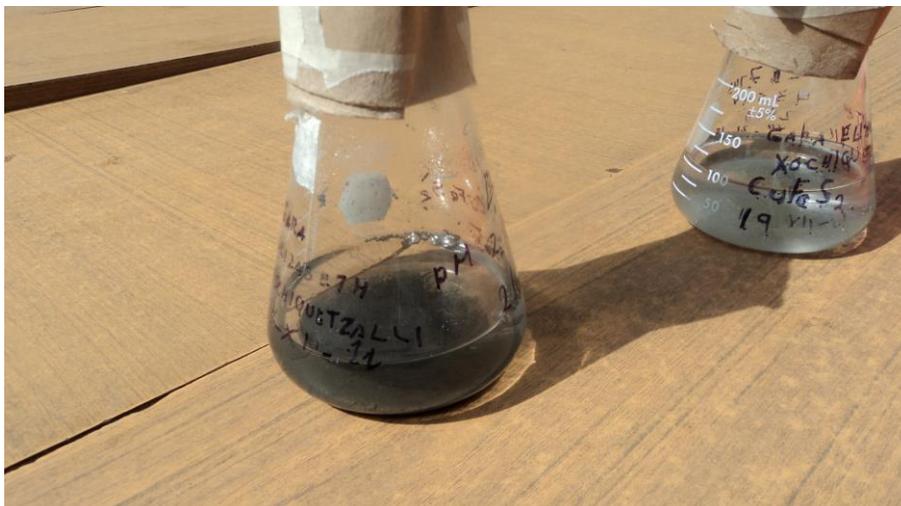


Figura 3.22.—A la derecha un matraz experimental de flotación, a la izquierda su testigo.
Foto al final del experimento, día 5.

III.2.1.—Otros minerales flotados.

Respecto al Mo y W disponibles en el concentrado, una revisión a detalle pone de manifiesto la presencia de partículas blancas al microscopio, Figura 3.23, de un estudio puntual sobre alguna de ellas, se obtiene los resultados de la Figura 3.24 y Tabla III.8.

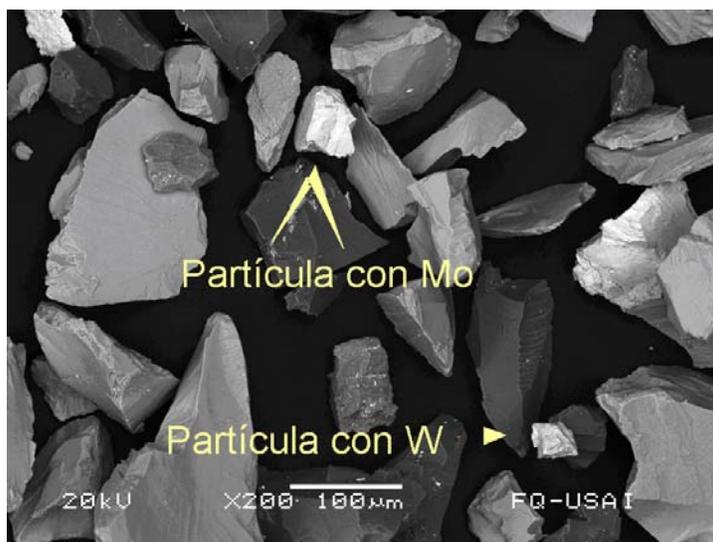
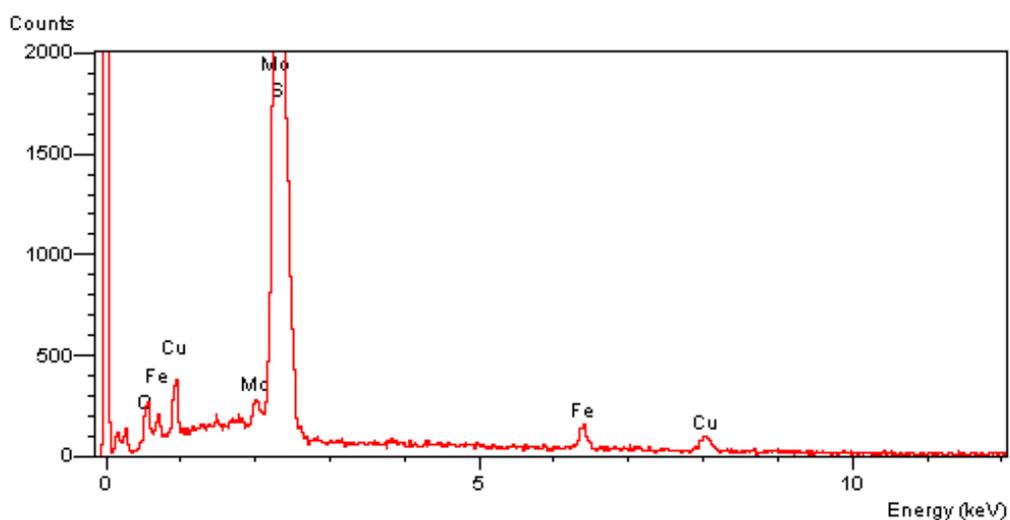


Figura 3.23.—Concentrado flotado, 200 X.

Tabla III.8.—Análisis de partícula rica en MoS₂.

ELEMENTO	PORCENTAJE EN MASA	PORCENTAJE ATÓMICO
O	5.09	15.32
S	35.20	52.89
Fe	2.75	2.38
Cu	3.20	2.43
Mo	53.76	27.00

Técnica de análisis: Microscopía electrónica de barrido.

Figura 3.24.—Difractograma de la partícula rica en MoS₂.

El principal mineral de este metal es la molibdenita, cuya fórmula es MoS₂ [71]. Con esta consideración y los datos obtenidos se elabora la Tabla III.9.

Tabla III.9 Composición molecular de la partícula rica en MoS₂.

CuFeS ₂	Cu nativo y óxido	MoS ₂	Mo en molécula diversa	Porcentaje de MoS ₂ respecto al total de sulfuros
9.035 %	0.072 %	85.80 %	0.146 %	90.472 %

Aquí surge un punto interesante. Encontrar cobre nativo o su óxido en la naturaleza no es nada extraordinario, pero no así el molibdeno.

No todas las partículas corresponden a sitios ricos en molibdenita. En la partícula blanca inferior, menos brillante, de la Figura 3.23, el análisis proporciona los resultados de la Tabla III.7 y Figura 3.25.

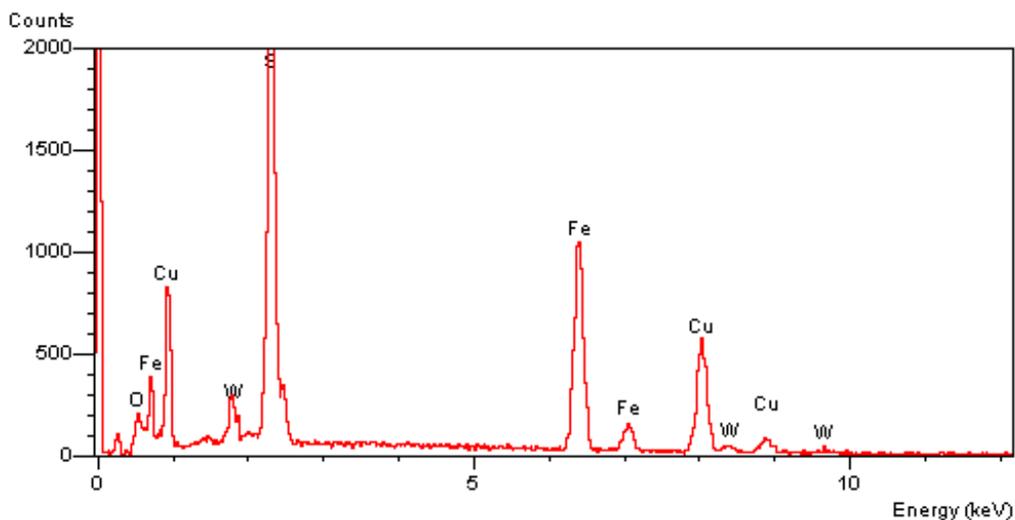


Figura 3.25.—Difractograma de la partícula con W.

Tabla III.7.—Análisis de partícula de CuFeS_2 con W.

ELEMENTO	PORCENTAJE EN MASA	PORCENTAJE ATÓMICO
O	5.21	14.30
S	29.4	40.25
Fe	29.37	23.09
Cu	30.40	21.01
W	5.61	1.34

Técnica de análisis: Microscopía electrónica de barrido.

Nuevamente se detecta calcopirita, la molibdenita se ausenta y en una escala muy reducida surge el tungsteno.

III.3—Lixiviación

III.3.1.— El pH durante la biolixiviación de la calcopirita.

El matraz chicuace o 6, explotó al momento de flamear la boca para garantizar condiciones axénicas, Figura 3.26, todo su contenido se proyectó, no se reportan datos de este sistema, posible presencia de cicloalcanos detectados por espectroscopía de infrarrojo.



Figura 3.26.—Matraz chicuace o 6 después de la explosión.

El medio empleado en este estudio tiene un pH inicial de 6.97. Después de 50 días de actividad microbiana, el matraz ce—1 se acidificó a un pH 2.78, lo cual excede al valor óptimo de crecimiento en agar. El matraz ome—2 o testigo, aunque presenta descensos y aumentos de una unidad pH, tiende a permanecer en valores cercanos al del momento de su inoculación, Figura 3.27.

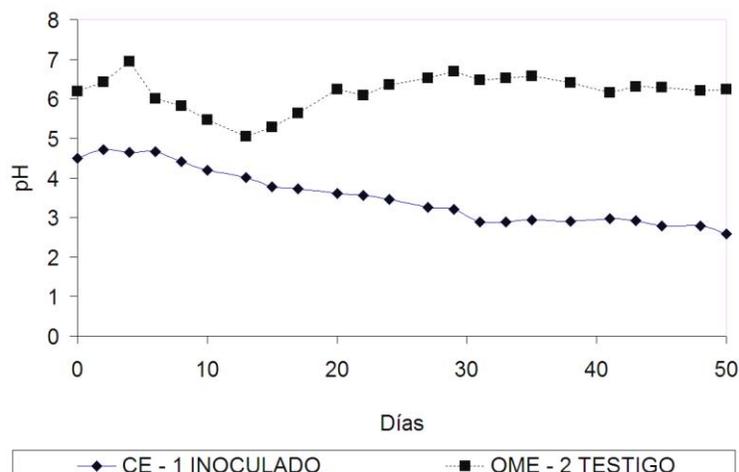


Figura 3.27.— Evolución de pH durante la biolixiviación de la calcopirita.

La tendencia de estabilidad del matraz testigo es más perceptible en la Figura 3.28, donde los valores de pH son transformados a $[H^+]_{(ac)}$ en mol/litro.

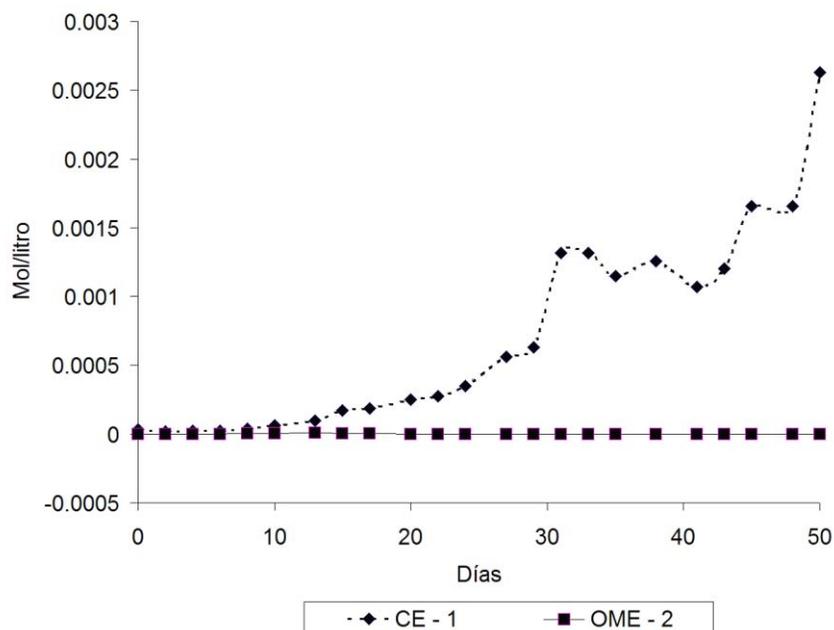


Figura 3.28.— Evolución de la concentración de H^+_{ac} durante la biolixiviación de la calcopirita, sistemas ce—1 inoculado y ome—2 testigo.

Cuando se inicia un experimento con un testigo de pH modificado únicamente por la adición de mineral al medio sin acidular, hay similitud con una mina, el material recibe

agua de lluvia y comienza a evolucionar, requiere sólo la disolución continua de sus componentes para presentar fuertes variaciones de pH, al final se tiende hacia la estabilidad.

Al introducir microorganismos acidófilos a un matraz abiótico, se encuentra una disminución de pH, pero ésta no es la propia del metabolismo. Por la sola presencia del mineral en el medio de cultivo, el pH no permanece estable. Así, ajustarlo al inicio del experimento se cambia involuntariamente el fenómeno.

En este trabajo como en el álgebra vectorial, se resta al valor final el inicial, es decir, al valor provocado por las bacterias se sustrae el carente de las mismas, estableciendo el valor del pH neto o del metabolismo microbiológico, Figura 3.29.

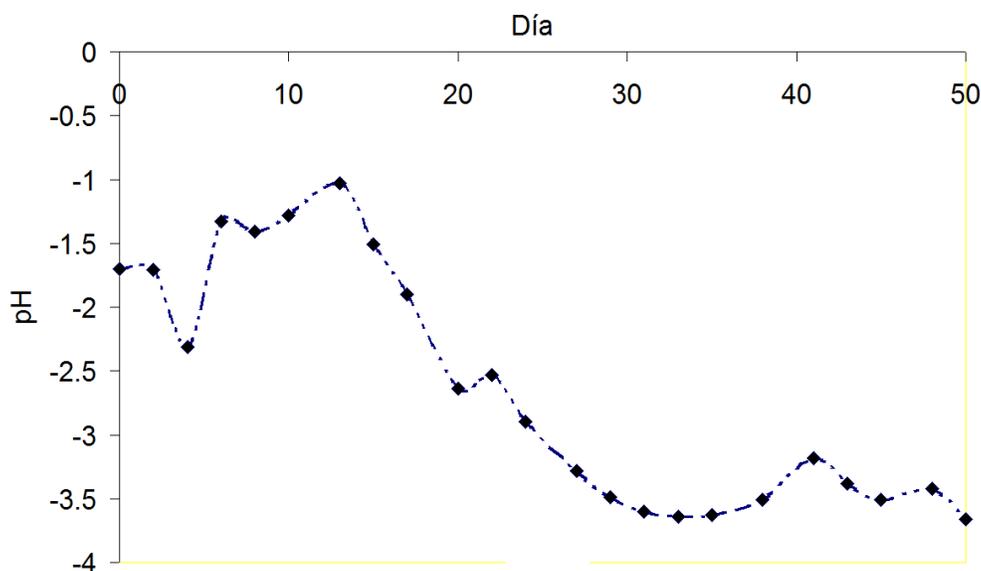


Figura 3.29.— Evolución del pH neto durante la bioliviación de la calcopirita.

En un primer ataque químico, tiempo = 4 días, no se liberan todos los componentes ácidos de una muestra mineral, tampoco los elementos neutralizadores, es durante el segundo ataque, tiempo = 8 días, cuando se liberan la totalidad de las bases más fuertes disponibles [72].

En la Figura 3.29, se observa que GARA—LIZ empieza a disminuir el pH de forma muy notoria del tercer al sexto día, pero se encuentra las primeras bases, seguramente fuertes porque el pH neto se eleva rápidamente, hasta el día 13 el microorganismo termina esta etapa, luego disminuye el pH hasta el día 20, entonces encuentra más bases para modificar la tendencia del pH y vuelve a acidularse a partir del día 30, ahora el cambio abrupto de pendiente se torna una curva claramente cóncava, el microorganismo liberó nuevas bases y procede a neutralizarlas.

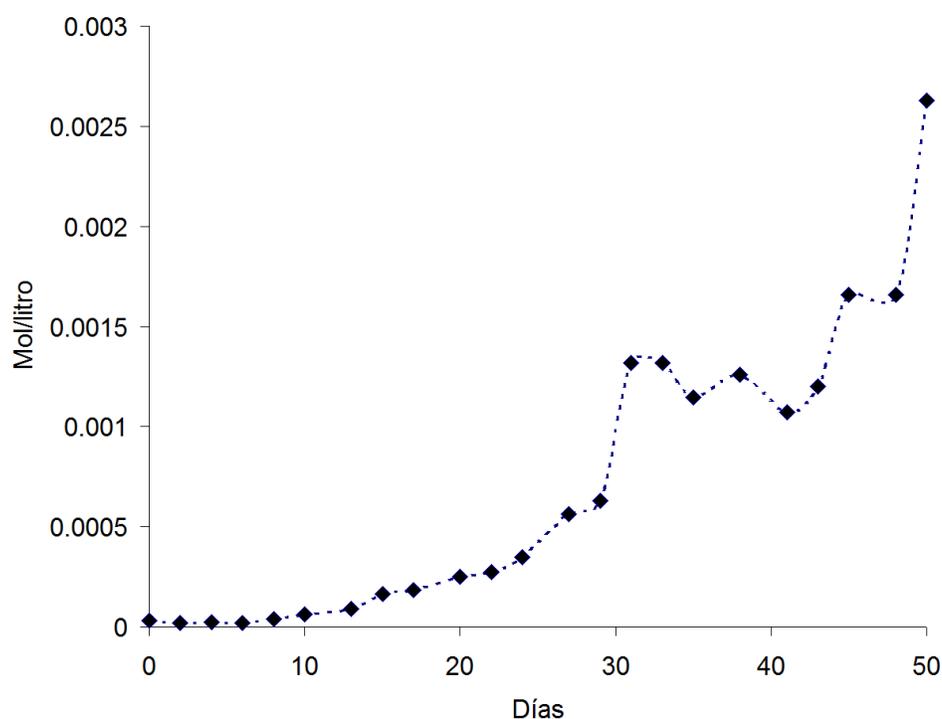


Figura 3.30.— Concentración neta de catione $H^+_{(ac)}$,
diferencia entre los sistemas Ce 1 inoculado — Ome 2 testigo,
diferencia entre matraces 1 — 2.

La presencia de las bases a partir del día 30 se confirma en las gráficas de $[H^+]_{(ac)}$ neta, Figura 3.30, donde también hay 3 cambios de pendiente, tiempo = 35, 41 y 48 días.

III.3.2— El pH durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita.

Para los sistemas yey, nahui y macuilli, (3, 4 y 5); se tuvo un comportamiento similar, Figura 3.31.

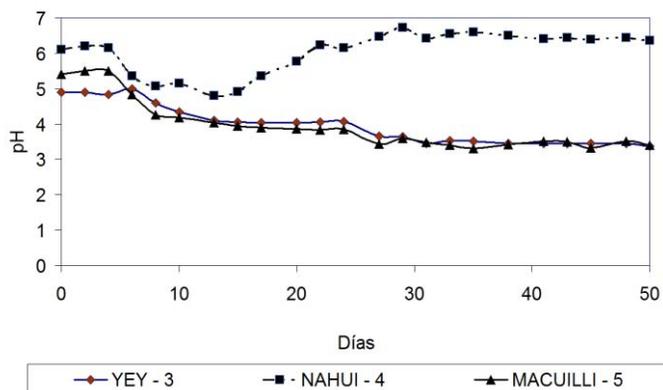


Figura 3.31.— Evolución del pH durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita, sistemas yey 3 y macuilli 5 inoculados, nahui 4 el testigo.

Como en el caso anterior, a partir del día 20 la tendencia del testigo a la estabilidad se verifica a un pH mayor, cercano al neutro, como se aprecia claramente en la Figura 3.31 y mejor en la Figura 3.32.

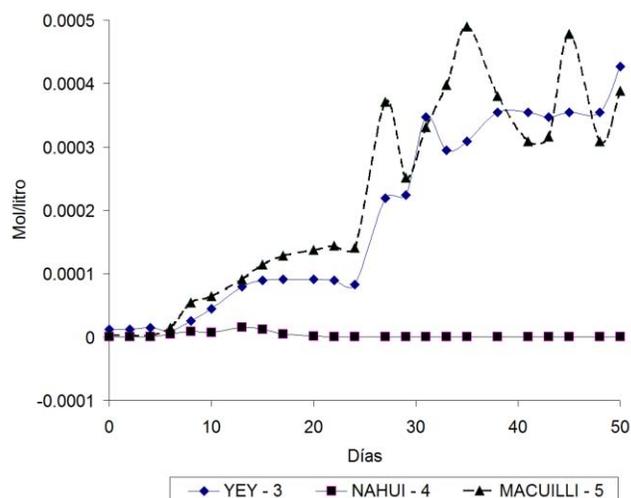


Figura 3.32.— Concentración del catión $H^+_{(ac)}$ durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita. Sistemas 3 y 5 inoculados, 4 el testigo.

Después de los primeros 10 días los sistemas yey y macuilli, comienzan a tener un comportamiento químico muy similar al presentado en la Figura 3.9, pero no en la 3.10, en virtud del manejo numérico de los valores.

Con calcopirita y molibdenita, GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI, tardó poco más de 5 días en iniciar el procedimiento definitivo hacia valores de pH ácidos, con un pequeño ascenso en el décimo inmediatamente neutralizado, Figura 3.33. En los sistemas yey—3 y macuilli—5, a partir del 5° día el comportamiento es muy similar según la Figura 3.11, en varios intervalos prácticamente el mismo.

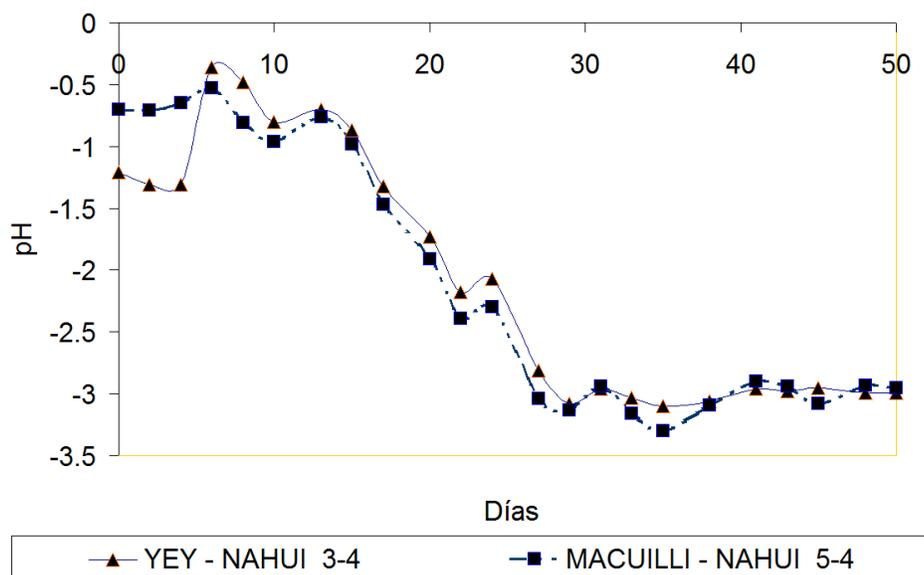


Figura 3.33.— El pH neto durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita.

En la Figura 3.34, generación neta de $[H^+]$, se acentúa la reproducibilidad del comportamiento dentro de los primeros 25 días, a partir de este punto las conductas no son similares.

De los tres sistemas con microbios metalúrgicos, resulta evidente un primer ataque liberador de la mayoría de las bases, al grado de basificar súbitamente el medio,

posteriormente puede resurgir más de una vez la presencia de las bases fuertes en la solución ácida.

Esto revela una situación muy importante en caso de un hipotético derrame accidental de microorganismos metalúrgicos en una laguna, presa, pozo de agua; se presentaría una fuerte acidulación del medio, sin reaccionar en principio, con bases fuertes o débiles naturales que puedan neutralizar su acción, como el microorganismo presenta preferencia a permanecer en el agar, es posible que se asiente en el vaso del cuerpo de agua. GARA—LIZ puede crecer con medios muy bajos de nutrientes, no requiere de sulfuros o minerales para prosperar, luego, en el cuerpo de agua contaminado puede haber suficientes reactivos para permitir el desarrollo del microorganismo. Igual situación se pronostica para el caso de que el derrame llegue a los mantos freáticos. En suma, sería difícil eliminarla del ecosistema. La segunda opción de posible uso del microbio metalúrgico es la lixiviación en terreros.

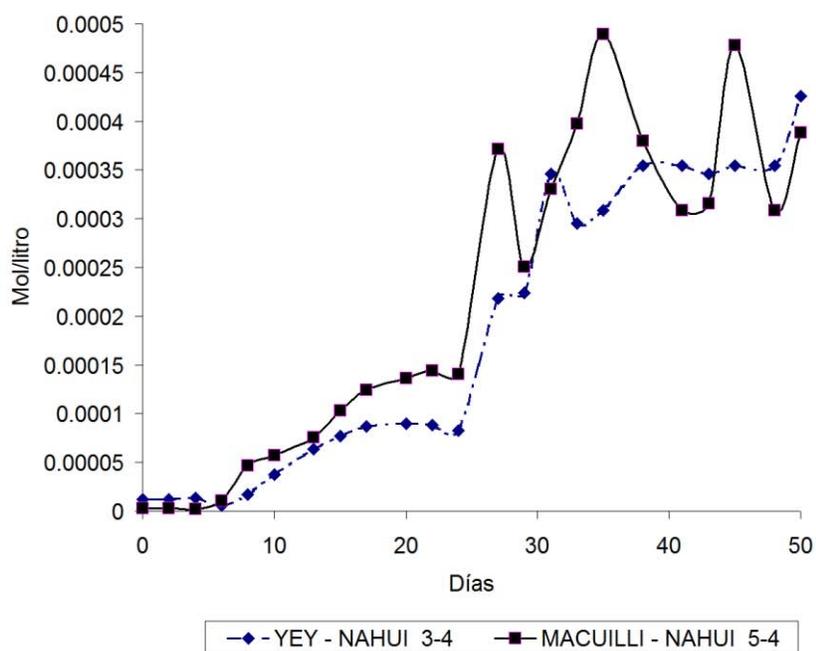


Figura 3.34.— Concentración neta del catión $H^+_{(ac)}$ durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita. Yey inoculado—nahui testigo y macuilli inoculado—nahui testigo.

III.3.3.—Mecánica de acidulación de GARA—LIZ.

Por otra parte, considerando al mineral cubierto de una película exterior de óxido, el microbio lixivía acidulando el medio, eliminada la capa oxidada, aparecen las bases, localizadas posiblemente en el porcentaje del material ajeno al mineral de interés. Las bases neutralizan inmediatamente las primeras moléculas de ácido sulfúrico biótico, el pH se eleva, el microbio metalúrgico vuelve a acidificar el medio acuoso, cuando aparentemente todo debería continuar acidulándose, surge una cantidad de bases, posiblemente encapsuladas con el mineral, que notoriamente elevan el pH, pero no en cantidad suficiente para detener el proceso de acidificación más de 3 días, entonces vuelve a incrementarse la concentración del catión $H^+_{(ac)}$. Como las partículas principales de base han sido neutralizadas en los primeros 10 días, las segundas sólo pueden estar inducidas con la calcopirita y molibdenita. Neutralizadas, nuevamente surge un tercer grupo de bases, probablemente se encuentran en la parte más interna de la partícula mineral. ¿Quiere decir esto que los sulfuros de cobre, dentro de la naturaleza, cristalizan en una base?

De ser factible lo anterior, entonces la lixiviación de GARA—LIZ presenta las siguientes etapas:

- A.—Ataque superficial y homogenizador de las condiciones del cultivo.
- B.—Liberación de las bases de la ganga.
- C.—Neutralización de las bases.
- D.—Acidificación del medio.
- E.—Posible segunda aparición de bases, liberadas por la lixiviación del mineral, e inmediata neutralización.
- F.—Acidificación hasta condiciones cercanas al valor óptimo de crecimiento microbiano.
- G.—Exposición nuevas bases al lixivarse el mineral.
- H.—Neutralización de bases y nueva exposición para reiniciar este ciclo desde el punto F.

Hasta el momento no se han encontrado datos de otros valores de pH neto para microbios metalúrgicos, no es factible establecer si este comportamiento es propio del microorganismo en estudio, o un ejemplo de una regla, si no una ley natural. Se denomina por el momento *Mecánica de acidulación de GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI*.

III.3.4.— Potencial óxido—reducción, P.O.R. durante la biolixiviación de calcopirita.

El P.O.R. del sistema ce—1 tiene un comportamiento de tendencia contraria a la del testigo, salvo dos puntos, durante los primeros 18 días, posteriormente el potencial del testigo decrece, mientras el de ce tiende a incrementarse, Figura 3.35.

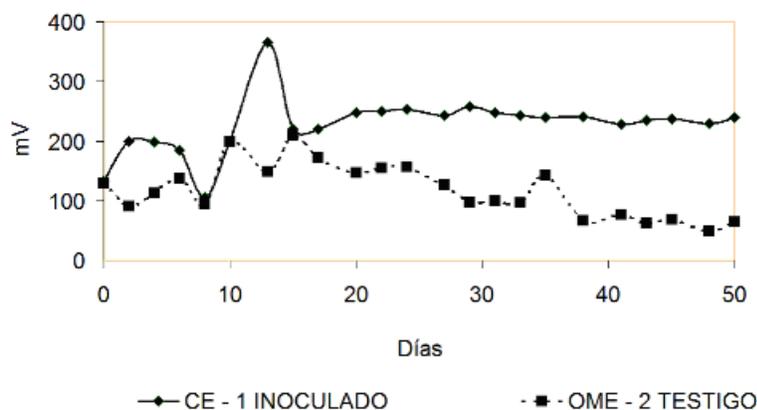


Figura 3.35.— P.O.R. durante la biolixiviación de calcopirita.
Sistemas ce—1 inoculado y ome—2 testigo.

La Ecuación de Nerst [73] modela el potencial electroquímico de un sistema de la manera siguiente:



$$E = E^{\circ} - \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (\text{Ecuación 4})$$

En la ecuación 3

M^{n+} es un catión metálico oxidado.

ne^{-} es “n” moles de electrones.

M^0 es un catión metálico con número de oxidación 0.

En la ecuación 4

E = Potencial óxido reducción del sistema.

E° = Potencial óxido reducción del sistema en condiciones normales de presión y temperatura.

R = Constante del gas ideal.

T = Temperatura del sistema en Kelvin.

n = Número de equivalentes químicos.

F = Constante de Faraday.

Q = Es la razón de la concentración de las especies $\frac{[\text{reds}]}{[\text{oxs}]}$

La ecuación 4 se encuentra definida para un solo ion, se puede suponer que la concentración neta de los iones oxidados y reducidos en el testigo tiende al equilibrio, mientras que en el matraz de microbios metalúrgicos se dirige hacia los valores de oxidación como se aprecia en la Figura 3.36.

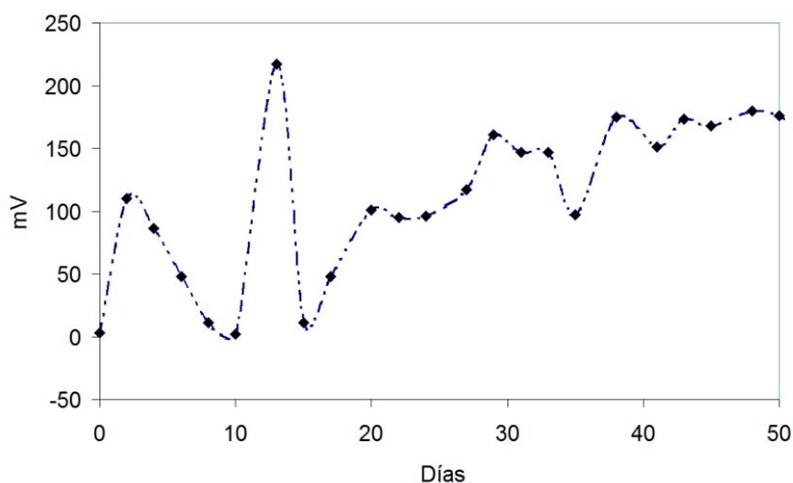


Figura 3.36.— P.O.R. neto durante la biolixiviación calcopirita.

Como en el caso de pH neto, se considera el valor de P.O.R. del testigo como inicial y el del matraz ce como final, el resultado se aprecia en la Figura 3.14. Para su interpretación, la ecuación 4 de Nerst se modifica de la manera siguiente:

$$E - E^* = - \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[\text{reds}]}{[\text{oxs}]} \right) \quad (\text{Ecuación 5})$$

Los términos de la ecuación 5 se definen a continuación:

E = Potencial óxido reducción del sistema.

E^* es el potencial electroquímico del sistema sin adición de microorganismos, diferente del potencial óxido reducción del sistema en condiciones normales de presión y temperatura o E^0 . En la definición de la ecuación 4, el término E^0 corresponde al potencial del sistema cuando carece de afectación, por lo tanto es su constante característica. La segunda parte de la adición corresponde a los cambios del sistema por factores de temperatura, concentración y el comportamiento de la reacción en el intercambio de cargas. A efecto de realizar una analogía vectorial, se considera que el potencial del matraz testigo es E^* , correspondiente a un “valor inicial”.

R es la constante del gas ideal, siempre tiene valor positivo.

T es la temperatura en grado Kelvin, siempre es mayor que cero.

F es la constante de Faraday, siempre es positiva.

n es el número de equivalentes químicos, también siempre es mayor que cero.

\ln es el logaritmo natural, adopta el valor de cero cuando la razón es igual a 1, es decir, la concentración de especies reducidas y de las oxidadas son iguales. Si la razón es mayor a uno, entonces \ln adopta valores positivos, si la concentración de especies reducidas supera por lo menos en un orden de magnitud a las oxidadas, $\ln \geq 1$. Si las especies oxidadas tienen mayor concentración que las reducidas, entonces $\ln < 0$. De manera análoga, si las especies oxidadas superan en un orden de magnitud a las reducidas, $\ln \leq -1$.

Como sólo el logaritmo natural puede adoptar valores menores a cero, la única forma de que la diferencia $E - E^*$ sea positiva, es cuando la concentración de especie oxidada supera la concentración de especie reducida.

De ser correcto el planteamiento de la diferencia de potenciales, entonces al ser los valores netos del sistema inoculado mayores a cero, las concentraciones de especies oxidadas son superiores a las reducidas. De conformidad a este criterio, en la Figura 3.36, se resalta que GARA—ELIZABETH XOCHQUETZALLI tiende a oxidar fuertemente al sistema, a pesar de las importantes caídas del potencial sufridas en todo el lapso experimental.

Se parte de CuFeS_2 , es decir cobre y hierro con estados de oxidación 2^+ , el cobre no se puede oxidar más, en cambio el hierro y el azufre se oxidan. Sí son las únicas especies de concentración mayoritaria, entonces la gráfica informa la evolución de los iones sulfuro y ferroso a sulfato y férrico. Como los valores netos mantienen tendencia ascendente, se concluye que el microbio metalúrgico no ha terminado su proceso de “oxidante fuerte”.

III.3.5.— Potencial óxido—reducción, P.O.R. durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita.

De manera análoga se procede con los sistemas yey, nahui y macuilli, (3, 4 y 5), Figura 3.37.

Como en el caso del pH, alrededor del día 18 de reacción, el comportamiento de yey—3 y macuilli—5 es casi el mismo, sin necesidad de la gráfica de P.O.R. neto, se aprecia como el sistema testigo tiende a igualar las concentraciones de las especies reducidas y oxidadas, mientras que los sistemas inoculados siguen oxidándose fuertemente.

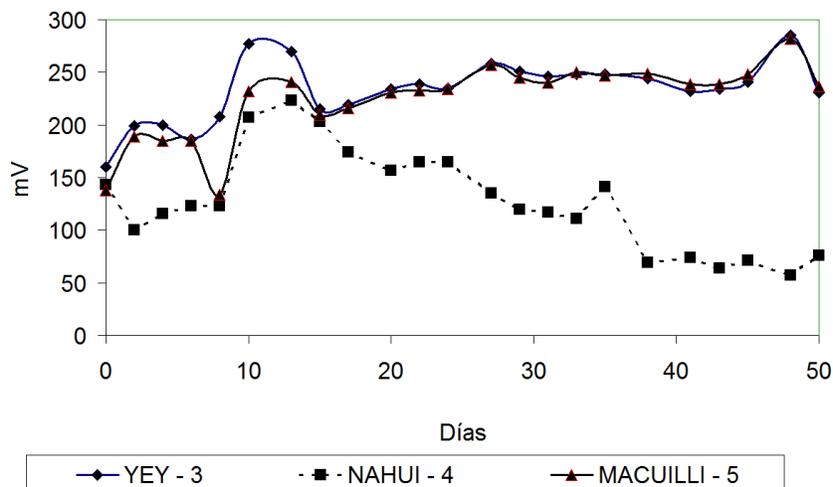


Figura 3.37.— P.O.R. de biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita propios de los sistemas Yey—3 (Inoculado), Nahui—4 (Testigo) y Macuilli—5 (Inoculado).

En la figura 3.37 se aprecia una tendencia oxidante fuerte en los sistemas inoculados y enriquecidos con molibdenita, asimismo las caídas de potencial son menos drásticas, las mayores caídas también ocurren más o menos en los días 11 y 15, aunque no son las únicas, como se observa en la Figura 3.38.

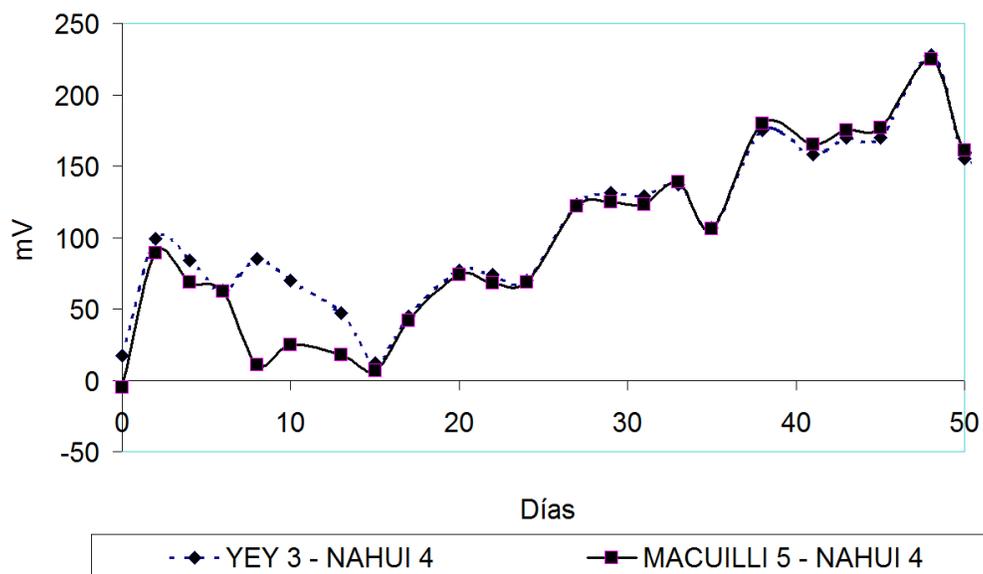
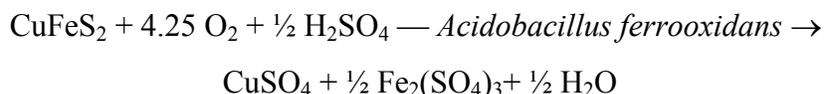


Figura 3.38.— Valores netos de P.O.R. durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita. Yey Inoculado—Nahui Testigo y Macuilli Inoculado—Nahui Testigo.

III.4— EL PRINCIPIO DE JUFI—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI.

Petersen y Dixon propusieron una reacción donde la calcopirita interactúa con ácido sulfúrico bajo condiciones bacterianas [5]:



Esta ecuación no es aplicable al presente caso, al momento de inocular con la bacteria en estudio, no se agrega al sistema ninguna cantidad de ácido sulfúrico, luego, se propone la siguiente ecuación para los experimentos de lixiviación efectuados con calcopirita:



En las gráficas de pH neto, se aprecia la tendencia de acidulación detenida en puntos específicos, lo que se ha interpretado como reacción con bases minerales, de tomar en cuenta las cantidades consumidas en la titulación, se puede calcular la producción del catión H^+ , al considerarse la estequiometría de la ecuación propuesta, es posible obtener la gráfica de la tendencia de extracción de cobre, en la Figura 3.39 se muestran las curvas de los sistemas ce—1 y yey—3.

No obstante lo anterior, la selección del factor adecuado permite convertir de manera aceptable las concentraciones de H^+ en Cu^{2+} . La fórmula respectiva de manera provisional se le ha denominado “Principio de JUFI—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI”, para abreviar “JUFI—LIZ” (JUFI es el acrónimo de Juárez Ferreyra Inocente, papá del autor):

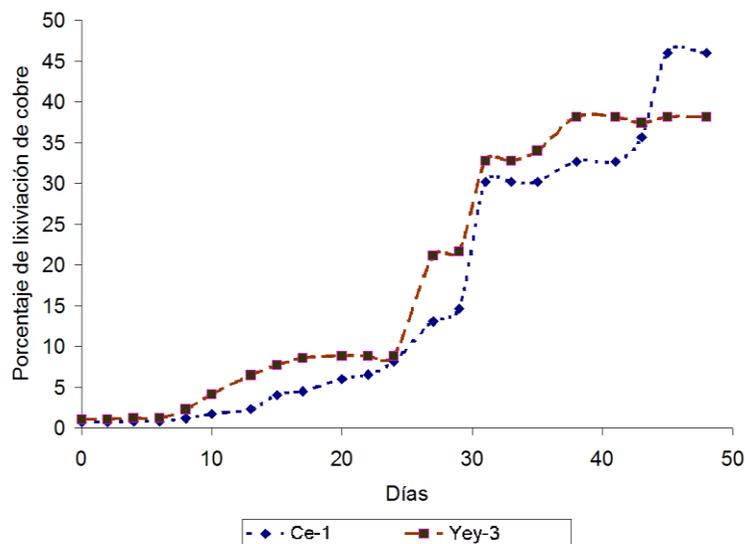


Figura 3.39.—Tendencia teórica de lixiviación de cobre.

En un sistema de biolixiviación de calcopirita sin ajuste inicial de pH, se calcula la producción de H^+ a partir de las gráficas de pH neto, entonces

$$n * \text{Moles de } H^+_{\text{Producido}} = \text{Moles de } Cu^{2+}_{\text{Lixiviado}} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Con $n > 0$, $n \in \mathbb{N}$.

Una comparación entre algunos valores estimados por el Principio de JUFÍ—LIZ y el análisis de los licores realizados por espectrofotometría de absorción atómica se presenta en las Tablas III.5 y III.6.

TABLA III.5. Porcentajes de recuperación de Cu^{2+} , teóricos y experimentales durante la biolixiviación de calcopirita, sistema ce—1.

DÍA	Lixiviación según Principio JUFÍ—LIZ		Análisis por absorción atómica	
	μgmol	Porcentaje	μgmol	Porcentaje
0	19.1697	1.7351	19.3265	1.7493
15	26.0317	2.3562	24.8484	2.2491
24	72.5676	6.5683	77.3072	6.9973
35	361.2803	32.7005	358.9292	32.4877
48	508.4252	46.0190	535.6324	48.4816

TABLA III.6. Recuperación de Cu^{2+} , teóricos y experimentales durante la biolixiviación de calcopirita en presencia de molibdenita, sistema yey—3.

Día	Lixiviación según Principio JUFÍ—LIZ		Análisis por absorción atómica	
	μgmol	Porcentaje	μgmol	Porcentaje
0	11.8215	1.0700	11.0437	0.9996
15	85.2763	7.7186	84.9857	7.6923
24	97.6856	8.8418	91.1119	8.2468
35	375.7192	34.0074	378.2558	34.2370
48	421.4994	38.1511	441.7595	39.9849

De aplicar numéricamente la definición de límite, se pueden determinar los valores de las derivadas parciales de las concentraciones de Cu^{2+} y H^+ respecto al tiempo, con estos datos se construye la gráfica de la Figura 3.40 correspondiente al sistema ce—1 inoculado en calcopirita.

En las gráficas se observa la gran semejanza de las curvas, de hecho la superior parece una traslación de la otra, entonces uno se siente tentado a enunciar la Ecuación del PRINCIPIO DE JUFÍ—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI, la cual semeja un caso específico de un balance de H^+ y de Cu^{2+} en la solución y permitirá establecer que:

$$\frac{\partial [\text{Cu}^{2+}]}{\partial t} = K \frac{\partial [\text{H}^+]}{\partial t} \quad \text{Ecuación (7).}$$

Apreciación confirmada para el sistema yey—3 inoculado en calcopirita y molibdenita, Figura 3.41.

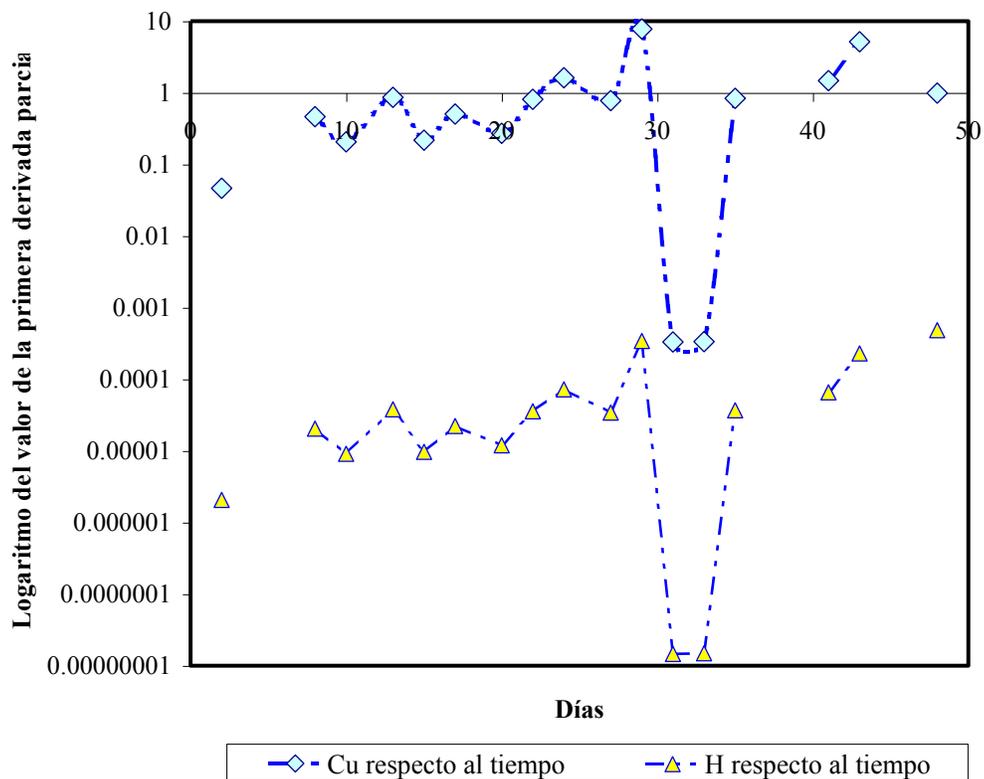


Figura 3.40.—Derivadas numéricas parciales del matraz ce—1.

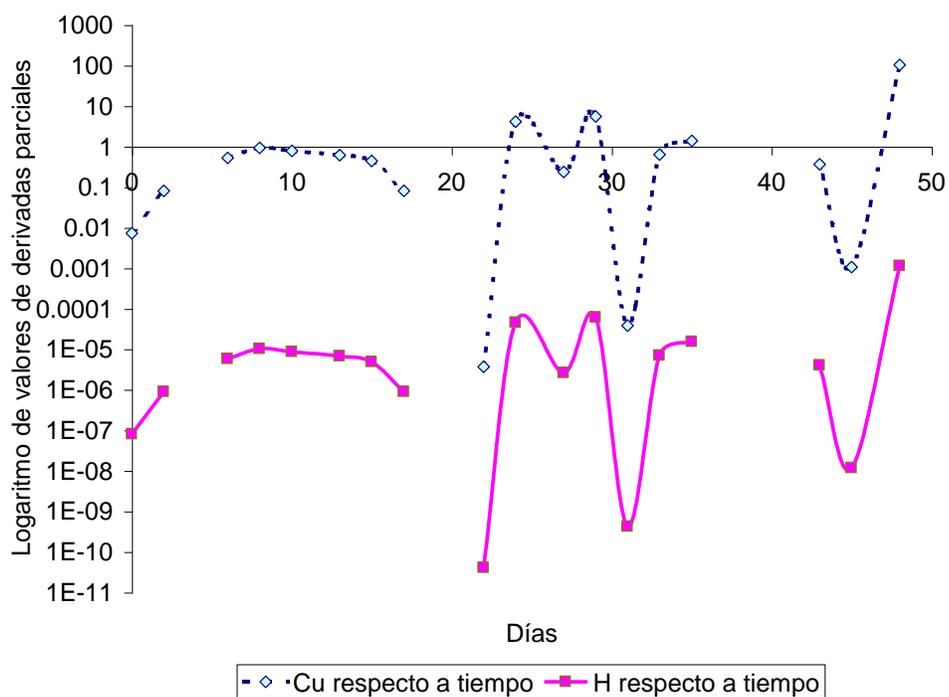


Figura 3.41.—Derivadas numéricas parciales del matraz yey—3.

III.5— IMPACTO ECOLÓGICO.

Los experimentos ecológicos revelaron siempre el mismo comportamiento, mientras las semillas de los testigos pueden germinar y desarrollarse sin problemas, la presencia de GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI siempre se traduce en la degradación de las semillas y la raíz del frijol.

En la Figura 3.42 se aprecia como surgen los primeros brotes en los testigos, en los frascos con inoculación bacteriana no germina absolutamente nada. Es notorio el cambio de la semilla ante la presencia del microorganismo, simplemente la parte interna no sólo cambia al color negro, sino que parece totalmente desbastada.

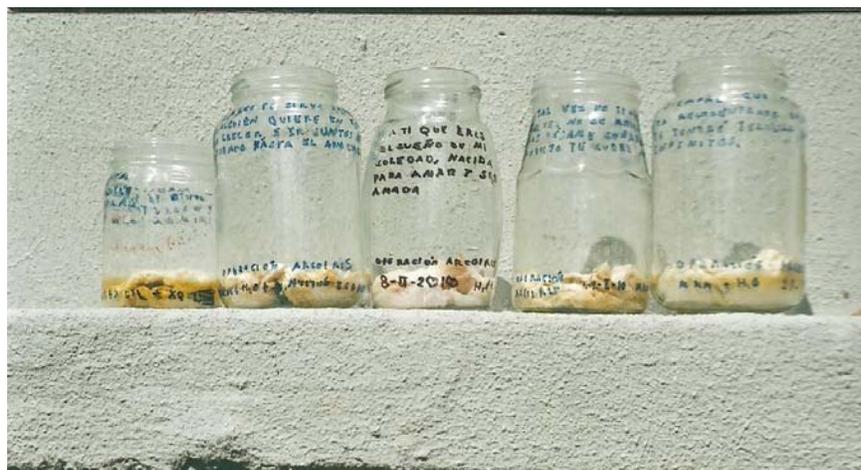


Figura 3.42.—A la derecha dos testigos germinan, las demás semillas no lo hacen al ser inoculadas con GARA—LIZ.

En el caso de la Figura 3.43 se permitió la germinación de la semilla, una vez el brote presenta viabilidad, 4 de los 5 frascos fueron inoculados, mientras el testigo se desarrolla sin problema alguno, los demás detienen su desarrollo y empiezan a decaer.

Ambos tipos de experimentos ecológicos se repitieron otras 3 veces, sin que en ninguna de las ocasiones se observara un cambio de comportamiento.



Figura 3.43.—En el centro un testigo sano en pleno crecimiento, los demás se marchitan al ser inoculados con GARA—LIZ.

Otro rasgo que no puede soslayarse es el accidente de la explosión. Manufacturar un anfifilo implica necesariamente producir una cadena de hidrocarburos, en este caso tan especial, que no es afectada por los solventes alcohol y acetona. Como se fabrican hidrocarburos, se trabaja con un material peligroso que pudo detonar fácilmente con sólo el flameo del matraz. El microbio incorporado a celdas de flotación implicaría medidas propias de ambientes caracterizados por gases explosivos y manejo de hidrocarburos.

No se debe perder de vista el fenómeno de flotación mineral, aunque no se realizó prueba específica, se debe considerar el impacto del tensoactivo microbiano en un ecosistema acuático. La vida en un cuerpo de agua depende de la tensión superficial del líquido, la cual se traduce no sólo en la capacidad que tiene la H_2O para absorber y retener el oxígeno disuelto, sino también en la facultad de los seres acuáticos para obtener el oxígeno necesario para su sobrevivencia, simplemente si la tensión es inadecuada no lo pueden extraer y mueren por asfixia, punto.

Es claro que pequeñas cantidades de anfifilo, pueden modificar sensiblemente la tensión superficial, no sólo de la agua, sino incluso de solventes como el alcohol y acetona, el grado de permitir la flotación del concentrado de cobre en ellos. Posiblemente por sí sola,

GARA—ELIZABETH XOCHQUETZALLI aniquilaría a un lago no sólo por el tensoactivo, sino por la formación de ácidos fuertes, hidrocarburos contaminantes e incorporación de metales pesados al ecosistema.

Como se puede observar, aunque los experimentos propiamente industriales revelan a una especie completamente adecuada para el beneficio del cobre, las consideraciones ecológicas llevan a afirmar que se trata de un ente muy problemático, tanto en el medio ambiente fabril como en el natural. GARA—ELIZABETH XOCHQUETZALLI es una responsabilidad mayúscula.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Fue posible obtener un microorganismo con capacidad ferrooxidante de muestras diferentes a horizontes mineros. El microorganismo fue denominado GARA—ELIZABETH XOCHIQUETZALLI, en forma abreviada GARA—LIZ.

2. El mejor medio de crecimiento del microorganismo es el adecuado para el *Thiobacillus ferrooxidans*.

3. La morfología del microorganismo es coco, su colonia es blanca, superficial y amorfa.

4. La mejor temperatura de crecimiento es de 45° C y su temperatura de muerte es 50° C.

5. El microorganismo se puede desarrollar desde pH 7.8, hacia los rangos acidez, el idóneo en caja Petri es 2.7.

6. La probable rapidez de crecimiento exponencial es 0.3020 Ln Absorbancia/días (35° C).

7. El microorganismo no se distingue a 400 X, no se pudo contabilizar por el método de cámara Neubauer.

8. El microorganismo interfiere con los espectros de ultravioleta visible, no se puede emplear esta técnica para determinar por su metabolismo concentraciones de sulfuros, sulfatos, fierro o cómputo de microbios por la Curva Mc Farland.

9. La interferencia se debe a la formación de diversos hidrocarburos, especialmente bencénicos y nafténicos, además de porfirinas de metales divalentes.

10. El microorganismo produce un colector capaz de flotar principalmente calcopirita, puede recuperar las pequeñas cantidades de molibdeno y wolframio probablemente no liberadas del sulfuro de cobre.

11. La ley del concentrado es de 99.2 % de calcopirita, la recuperación de cobre por flotación fue de 30.11 %, en colas sólo se pierde el 0.78 % de cobre, lo demás es lixiviado. Los resultados respectivos pueden ser discutibles.

12. Para esta flotación, GARA—LIZ no requiere de los reactivos usados en el beneficio de minerales, puede sustituirlos.

13. A partir de pH cercano al neutro, el microorganismo tiende a disolver en varias etapas las bases disponibles, etapas concatenadas a fuertes incrementos de acidez, hasta acercarse al pH de crecimiento idóneo.

14. El desarrollo del potencial óxido—reducción revela un microorganismo fuertemente oxidante del medio.

15. GARA—LIZ tiene capacidad de lixiviar la calcopirita en medio acuoso a pH bajo, en condiciones normales de presión y temperatura.

16. GARA—ELIZABETH XOCHQUETZALLI destruye semillas y cultivos de frijol. Por su capacidad de producir anfifilos e hidrocarburos, es una especie peligrosa en los medios ambientes acuáticos e industriales confinados y su aplicación requerirá tomar las medidas y precauciones adecuadas.

BIBLIOGRAFÍA



“Que se eduque a los hijos del labrador y del barrendero como a los del más rico hacendado”.

D. José María Morelos y Pavón,
El Rayo del Sur.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. R. COLMER, K. L. TEMPLE y M. E. HINKLE, An iron-oxidizing bacterium from the acid drainage of some bituminous coal mines, *Rev. Science*, 59 (1950), 317—328.
- [2] D. HOLMES y J. MENACHO, Biolixiviación, la nueva minería, *Ed. Centro de Investigación Minera y Metalúrgica*, Santiago, Chile, 2005.
- [3] B. RAMÍREZ SERRANO, R. ESCUDERO GARCÍA y F. J. TAVERA MIRANDA, Flotación en columnas de complejos cobre—amilxantato en función del pH, *Rev. Minería y Geología*, 1 (2009), 1—22.
- [4] A. LÓPEZ VALDIVIESO y J. L. REYES BAHENA, Flotación de calcopirita, pirita y molibdenita en minerales de cobre tipo pórfidos, Memoria del X Simposio sobre Procesamiento de Minerales, Chillán, Chile, 14—18 noviembre 2005, 1—29.
- [5] M. A. MENADIER STAVELOT, Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas, Tesis licenciatura, Universidad de Chile, 2009.
- [6] J. F. BANFIELD Y K. H. NEALSON, Eds., Geomicrobiology: Interaction Between Microbes and Minerals, *Ed. Mineralogical Society of America*, 6 (1997), 448.
- [7] J. BECKEL, El proceso hidrometalúrgico de lixiviación en pilas y el desarrollo de la minería cuprífera en Chile, *Ed. Comisión Económica para América Latina CEPAL*, 2000, 58.

[8] K. KINZLER, W. SAND, J. TELEGDI y E. KALMAN, An AFM—study on the adhesion of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* to surfaces of pyrite, Memoria del 15th International Biohydrometallurgy Symposium (IBS 2003), 14—19 septiembre 2003, Atenas, Grecia, vol. 4, 1003—1009.

[9] I. A. JAQUE LIBERONA, Estudio de biolixiviación de pirita por un cultivo de *Sulfobacillus acidophilus* a 45° C, Tesis licenciatura, Universidad de Chile, 2012, 81.

[10] B. ESCOBAR, M. J. HEVIA y T. VARGAS, Evaluating the growth of free and attached cells during bioleaching of chalcopyrite with *Sulfolobus metallicus*, Memoria del 15th International Biohydrometallurgy Symposium (IBS 2003), 14—19 septiembre 2003, Atenas, Grecia, vol. 4, 1091—1097.

[11] J. PETERSEN y D. G. DIXON, Lixiviación en pilas termofílicas de un concentrado de calcopirita, *Rev. Ingeniería de Materiales*, 11 (2002), 777—785.

[12] J. PETERSEN y D. G. DIXON, Biolixiviación competitiva de pirita y calcopirita, *Rev. Hidrometalurgia*, 1—4 (2006), 40—49.

[13] E. ENRÍQUEZ, En busca de una mayor concentración, *Rev. Minería Chilena*, 352, (2010), 3.

[14] S. K. KAWATRA, Froth Flotation Fundamentals, Texto de la Universidad Tecnológica de Michigan, online http://www.chem.mtu.edu/chem_eng/faculty/kawatra/Flotation_Fundamentals.pdf.

[15] Y. VAZIFEH1, E. JORJANI1 y A. BAGHERIAN; Optimization of reagent dosages for copper flotation using statistical technique, *Rev. Nonferrous Met. Soc.*, 20 (2010), 2371—2378.

[16] R. L. CERRO, Contact Angles: Laplace—Young equation and Dupre—Young relationship, Conferencia de la Universidad de Alabama en Huntsville, Santa Fe, Estados Unidos, 16 de abril de 2010.

[17] T. P. PHETLA y E. MUZEDA, A multistage sulphidisation flotation procedure for a low grade malachite copper ore, *Rev. World Academy of Science, Engineering and Technology*, 69 (2010), 255—261.

[18] S. PRABHAKAR y P.R. KHANGAONKAR, Flotation and adsorption studies of chalcopyrite with cupferron. *Rev. International Journal of Mineral Processing*, 9 (1982), 87—95.

[19] S. LLANO TORRE, Utilización de ácido cítrico en limpieza de pintura, Tesis maestría, Universidad Politécnica de Valencia, España, 2008, 135.

[20] J. SANCHIZ SUÁREZ, Capacidad coordinante del hierro (III) con ácidos tetrametilcarboxílicos derivados de orto—fenantrolinas, Tesis doctorado, Universidad del País Vasco, España, 1996, 286.

[21] R. SINGH, Development of flotation reagents with chelating functional groups, *Rev. Froth Flotation: Recent Trends*, 7 (1998), 68—78.

[22] N. S. GUERRERO GÁRATE, Estudio de surfactantes y su implicancia en el proceso de obtención de agua potable en la planta La Atarjea, XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún, México, 27 al 31 de octubre de 2002, 1—6.

[23] K. LEE, D. ARCHIBALD, J. MCLEAN y M.A. REUTER, Flotation of mixed copper oxide and sulphide minerals with xanthate and hydroxamate collectors, *Rev. Elsevier*, artículo en prensa aceptado el 5 de noviembre de 2008, 7.

[24] P. H. LÓPEZ PRÍNCIPE y O. S. IPANAQUÉ LIZAMA, Caracterización y optimización de flotación a nivel laboratorio del mineral de cobre de la minera Candelaria, Tesis licenciatura, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú, 2008, 110.

[25] J. SUSTERSICK CAÑAS, Síntesis y caracterización de un surfactante tipo gemelo, Tesis maestría, Instituto Politécnico Nacional, 2004, 75.

[26] J.—L. SALAGER y A. FERNÁNDEZ, Surfactantes: Generalidades y materias primas, Texto de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de los Andes, Venezuela, 2004, 23.

[27] SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES, México, Tensoactivos, Texto de SEMARNAT, p.8, online <http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/sitioscontaminados/GTZ/E-Clasificacion%20de%20Tensoactivos.pdf>.

[28] I. JIMÉNEZ DÍAZ, Desarrollo de metodología analítica para la determinación de tensioactivos y sus productos de degradación mediante diferentes técnicas separativas, Tesis doctoral, Universidad de Granada, España, 2009.

[29] R. PORTELA RODRÍGUEZ. Eliminación fotocatalítica de H₂S en aire mediante TiO₂ soportado sobre sustratos transparentes en el UV—A, Tesis doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, España, 2008, 190.

[30] V. M. MIRANDA TOVAR, Estudio experimental de la movilización de antraceno en ortodichlorobenceno en un medio poroso mediante un surfactante gemelo en solución acuosa, Tesis maestría, Instituto Politécnico Nacional, 2006, 107.

[31] M. M. MILOSAVLJEVIĆ, A. D. MARINKOVIĆ, S. D. PETROVIĆ y M. SOVRLIĆ, A new ecologically friendly process for the synthesis of selective flotation reagents, *Rev. Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 15 (2009), 257—262.

[32] V. H. A. CIRIBENI, P. E. SARQUÍS y M. GONZÁLEZ; Estudio del efecto depresor de reactivos orgánicos naturales en la flotación de sulfuros, Memoria de Conamet/SAM—Simposio Materia 2002, 4.

[33] K. A. NATARAJAN y S. K. KAWATRA Eds., Mineral Biotechnology, *Ed. Society for Mining, Metallurgy and Exploration, Inc. (SME)*, Littleton, Estados Unidos, 2001, 263.

[34] La biotecnología en minería abre nuevos horizontes en Chile, *Rev. Tiempo Minero*, 25 de agosto de 2011, on line <http://www.tiempominero.com/>.

[35] Reporte del estado del medio ambiente en la Columbia Británica, Canadá, Traductora Margarita Morales Torres, *Ed. Consejo de Minería Ambiental de la Columbia Británica*, 1993, 26.

[36] C. MARCILLO, *et al.*, Impacto en afluentes del río Pilcomayo por contaminantes adicionales de drenaje ácido de minas desde Cerro Rico, Potosí—Bolivia, *Revista Avances en Ciencias e Ingeniería*, 5 (2014), 17.

[37] Inti Raymi: el oro y la plata se explotan a cielo abierto, *La Razón*, diario de La Paz, Bolivia, domingo 17 de septiembre de 2000.

[38] L. JUÁREZ GARCÍA, Determinación del potencial de generación de ácido en muestras de jales, Tesis licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007, 136.

[39] M. DE J., SÁNCHEZ, Microbiología de Suelos—Técnicas, métodos y medios de cultivo, *Ed. Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 2004, 47.

[40] R. M. RAMÍREZ GAMA, editora, Manual de Prácticas de Microbiología General, *Ed. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 2008, 141.

[41] I. ROSAS HERNÁNDEZ, Caracterización e identificación de microorganismos con resistencia a compuestos mercuriales, Tesis maestría, Instituto Politécnico Nacional, 2008, 70.

[42] Norma 9240, Standard methods for the examination of water and wastewater, *Ed. American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation*, 2007.

[43] L. C. CORRALES, L. C. SÁNCHEZ, P. SÁNCHEZ CORTES, A. SÁNCHEZ LEÓN, V. SÁNCHEZ QUINTERO y J. ZÁRATE DÍAZ; Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del Departamento de Boyaca, *Rev. Nova*, 5 (2006), 57—63.

[44] C. A. GARCÍA GALINDO, J. A. ASCACIO VALDES, R. CRUZ QUIROZ DE LA, C. N. AGUILAR y A. PRADO BARRAGÁN; Aislamiento y conservación de microorganismos contaminantes de jugo de arándano, *Rev. Acta Química Mexicana*, 6 (2011), 61—67.

[45] W. W. LEATHEN, S. A. BRALEY, SR. y L. D. MCINTYRER; The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuritic constituents associated with bituminous coal, *Rev Science*, s. i. (1952), 65—68.

[46] A. I. VOGEL, Química Analítica Cuantitativa Teoría y Práctica, *Editorial Kapelusz*, vol. 1, 1960, 635.

[47] I. L. KHODAKOVSKII y V. B. PARKER, Thermodynamic properties of the aqueous ions (2+ and 3+) of iron and the key compounds of iron, *Ed. Chemical Kinetics and Thermodynamics Division de National Institute of Standards Technology*, Maryland, 1995, 46.

[48] M. DE L. CARRERA CABEZAS, Producción de *Bacillus thuringiensis*, Berliner a nivel de laboratorio, Tesis doctorado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, 2009, 87.

[49] E. VERDÚ, G. GARCÍA—ALÍAS, J. M. VELA, J. CUADRAS, R. LÓPEZ VALES y X. NAVARRO, Morphological characterization of photochemical graded spinal cord injury in the rat, *Rev. Journal of Neurotrauma*, 5 (2003), 483—499.

[50] M. A. LÓPEZ HERNÁNDEZ, Disolución microbiológica de jales inactivos y no alterados de la presa El Fraile provenientes del proceso de flotación Zn/Pb, Tesis, *de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 2009, 120.

[51] R. CABRERA AGUILAR, Obtención y caracterización de recubrimientos de sialon mediante RF sputtering, Tesis licenciatura, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, México, 2007, 90.

[52] T. COLEY BENJUMEA y D. P. ZAPATA ZULUAGA, Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores de cianuro, Tesis licenciatura, Universidad EAFIT de Colombia, 2006, 110.

[53] M. de los A., AQUIAHUATL RAMOS *et al.*, Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general, México, *Ed. Unidad Iztatapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitama*, 2012, 75.

[54] B. MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: Nisina Z y lactococina 972, Tesis doctorado, Universidad de Oviedo, 1996, 110.

[55] M. G. VILLACÍS AVEIGA, Determinación de la cinética de inactivación de la *Escherichia Coli* con ozono, Tesis licenciatura, Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2006, 66.

[56] V. DEAN ADAMS, Water & Wastewater Examination Manual, *Ed. Lewis Publishers*, 1991, 264.

[57] GARCÍA RODRÍGUEZ, José A., coordinador, Métodos básicos para estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos, *Ed. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2000, 54.

[58] M. A. ARMIENTA, V. ZAMORA y F. JUÁREZ, Manual para el Análisis Químico de Aguas Naturales, en el Campo y en el Laboratorio, *Ed. Instituto de Geofísica de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 1996, 84.

[59] M., JUÁREZ JUÁREZ, FRANCO HERNÁNDEZ M. O. y V. P. ASCENCIO RASGADO, Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Ambiental I, *Ed. Instituto Politécnico Nacional*, 2009, 64.

[60] L. PARTIDA RUVALCABA, T. DE J. VELÁZQUEZ ALCARAZI, B. ACOSTA VILLEGAS¹ y C. E. ANGULO GAXIOLA; Extractos vegetales y su efecto en la conductividad eléctrica de dos suelos salinos y de soluciones, *Rev Terra Latinoamericana*, 1 (2006), 83—89.

[61] CENTRO NACIONAL DE METROLOGÍA, México, Sistema Primario de Conductividad Electrolítica, Centro Nacional de Metrología, Querétaro, México, on line http://www.cenam.mx/sm_2012/pdf/S2E2.pdf

[62] A. J. HERNÁNDEZ BIBIANO y F. PIEDRA GARCÍA, Aislamiento e identificación de *Thiobacillus ferroxidans* de los lixiviados de los jales mineros de Taxco de Alarcón, Tesis licenciatura, Universidad Autónoma de Guerrero, 2012, tesis en revisión.

[63] C. A. PÉREZ ALONSO, J. L. REYES BAHENA y M. DEL C. OJEDA ESCAMILLA; Optimización de la recuperación—grado de minerales sulfuros mediante un tratamiento estadístico, Memoria del XIV Encuentro Sobre Procesamiento de Minerales, 8—10 octubre 2008, San Luis Potosí, México. 1—16.

[64] R. E. RIVERA SANTILLÁN *et al*; Estudio de biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias *Tio-* y *Ferro-oxidantes* en condiciones termófilas, *Revista de la Facultad de Ingeniería*, 26 (2011), 65—73.

[66] W. L. MOREIRA DOS SANTOS, Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origen cárnico, Tesis doctorado, Universidad Complutense de Madrid, 1993, 294.

[67] L. M. ZAMORA RODRÍGUEZ, Aislamiento, Identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero, Tesis doctorado, Universidad de Girona, 2003, 255.

[68] A. J. DOS SANTOS EDUARDO, Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos, Tesis doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona, 2007, 255.

[69] G. CHÁVEZ, E. VIVAS, B. BRAVO, F. YSAMBERTT Y N. MÁRQUEZ; Isolation and characterization of neutral, acid and basic fractions from a heavy crude oil and its natural surfactants, *Revista Técnica e Ingeniería*, 3 (2003), 151—161.

[70] G. GONZÁLEZ MANCERA y M. E. NOGUEZ AMAYA, Principios de microscopía electrónica de barrido y microanálisis por rayos X característicos. *Ed. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México*, 2006, 151.

[71] J. ANGENAULT, Diccionario Enciclopédico de Química, *Compañía Editorial Continental, S.A.*, 1998, 576.

[72] A. TESSIER, P.G.C. CAMPBELL y M. BISSON, Sequential extraction procedure for speciation of particulate trace metals, *Rev. Analytical Chemistra*, 7 (1979), 844—851.

[73] F. J. BUECHE, Física general, *Ed. Mc Graw Hill*, 2013, 407.



“Nadie hace bien lo que no sabe, por consiguiente, nunca se hará República con gente ignorante, sea cual fuera el plan que adopte”.

D. Doroteo Arango Arámbula,

General Francisco Villa.

Con este trabajo doy por lograda la gran promesa realizada a la Pequeña Flor Bonita, a su Padre del Cielo, a quien le pedí un microbio para ella, es el momento de cumplir con su Dios, Cristo, la Patria México, mi familia y ella; todos a una sin falla alguna.

Preciosa flor bonita, salvo tu deseo, con esto me despido y te doy mi bendición. Sí de algo te sirve saber que comparto contigo la fe y las tardes de lluvia conmigo quisieras tener. Sí de algo te sirve saber que alguien quiere en tu vida crecer y fuéramos juntos por el tiempo hasta el anochecer. Tal vez no te alcance mi voz, tal vez no se mitigue el dolor, más déjame soñar que siquiera un poquito te cubre mi amor.

Yo agradezco a Gran Jehová Señor Dios de los Ejércitos, a El Maestro Jesús Cristo, por haber permitido servir con devoción a su pequeña Elizabeth—Hija de Dios, lamento profundamente mi torpeza para desarrollar el obsequio.

Wir sind metallurgischen Chemie—Ingenieure, Das Elizabeth's verwegene Truppe.
Wir stürmen wie die Tiger hervor. Wir fürchten nicht Hitze und Wüstensand. Wir trotzen dem Durst und dem Sonnenbrand. Wir rächen Nordmexiko und rächen Südosten Mexiko's, das einst sie uns feige gestohlen.

...Bis einst die Sonne des Friedens uns scheint und wieder gen México wir fahren.
Denn ihr Herz ist voller Süßigkeit, zarter Duft entströmt dem Blütenkleid.

...Und das heißt: Elizabeth.

Al que el cielo le ha de dar,

No ha desesperar.

Refrán Mexicano

(OPERACIÓN RIEGELBERG)

El Camino de la Rosa

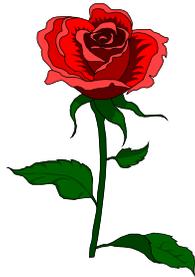
...Flor Exquisita...

Quizá diligente
 Entre prados y fuentes
 La miran pasar,
 Los libros y estantes
 Como un “endenantes”
 A la joven sin par.

Sus bellos luceros
 Serán lo primero
 Que lleves en ti,
 y es su energía
 Fulgor de los días
 En labios rubí.

Mas nadie adivina
 De angustia la espina
 Que lleva en su ser,

Y todo al ocaso
Observa su trazo
De linda mujer.



Elizabethzita,
Muchacha bonita
Sin sombra o rival.
Elizabethzita,
Quien fuera en visita
Hasta tu portal.

Suspiro, suspiro,
Cuando yo te admiro
Y tiemblo mi bien,
Pues busco sincero
Decirte te quiero
Y te amo también.

Que tú eres mi vida
Por siempre querida
En tierna ilusión,
Que tienes conmigo

Cariño y abrigo,
Leal corazón.

Elizabethzita
Muchacha bonita
Bonita en verdad,
Elizabethzita,
La flor exquisita
De la sociedad.

Te quiero y te añoro
Muy joven tesoro,
No ha habido otro hombre
Que guarde tu nombre,
Tu nombre de amor.

Cipactli Ocelotl

(LIETZE!, ICH LIEBE DICH WOHL!
...ICH WILL DIR IMMER GEHORSAM SEIN)