

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EFECTO INHIBITORIO DEL BENZOATO DE SODIO  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE BACTERIAS HIERRO  
OXIDANTES EN AGUAS RESIDUALES DE ACTIVIDADES  
MINERAS EN EL ECUADOR

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO

SANGOLQUÍ, NOVIEMBRE DE 2007

# HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

## ELABORADO POR

---

Alberto Alejandro Aguirre Bravo

## COORDINADORA DE LA CARRERA

---

M.Sc. Alma Koch Kaiser

## SECRETARIO ACADÉMICO

---

Abg. Vinicio Zabala

Lugar y fecha: Sangolquí, 27 de noviembre de 2007

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. ALBERTO ALEJANDRO AGUIRRE BRAVO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

27 de noviembre de 2007

Fecha

---

Ing. Patricia Moreira  
DIRECTORA

---

M.Sc. Alma Koch  
CODIRECTORA

## **LEGALIZACIÓN DEL PROYECTO**

**“EFECTO INHIBITORIO DEL BENZOATO DE SODIO SOBRE LA  
ACTIVIDAD DE BACTERIAS HIERRO OXIDANTES EN AGUAS  
RESIDUALES DE ACTIVIDADES MINERAS EN EL ECUADOR”**

**ELABORADO POR:**

---

Alberto Alejandro Aguirre Bravo

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

---

M.Sc. Alma Koch  
COORDINADORA ACADÉMICA

**Sangolquí, 2007-11-27**

## **DEDICATORIA**

A Mariana, mi madre, por haber forjado a un hombre de principios;  
a Luis Alberto, mi padre, el ingeniero más ingenioso que conozco;  
a Giselle y Karla, por su ejemplo de superación y perseverancia;  
a la Lola, por iluminar mis pasos y sostenerme en los momentos de desazón;  
a todos ustedes con inefable afecto y gratitud...

“Con ignorancia y necesidad encontrarás solo nimitad;  
con sabiduría, amor y conocimiento llegarás a las estrellas”.

**Alberto Alejandro**

## **AGRADECIMIENTO**

Al personal Docente y Administrativo de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, de manera especial a la Ing. Patricia Moreira, por su invaluable dirección para la culminación del presente trabajo; a la M.Sc. Alma Koch, por su orientación en la formulación de este proyecto y apoyo durante el transcurso del trabajo; y, al Ing. Marco Taipe, por su orientación y apoyo técnico en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la presente investigación.

Al personal técnico y administrativo de la Empresa Minera Orenas S.A, por su valioso apoyo técnico y logístico, en especial al Ing. Efrén Jaramillo y al Dr. Carlos Aspiazu.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Central del Ecuador, por haber facilitado el uso del laboratorio de Biotecnología para la consecución de buena parte de este trabajo.

A la Dra. Blanca Esthela Bravo, por la ayuda incondicional ofrecida en mi formación personal y profesional, por ser mi preceptora y ejemplo a seguir.

A todas las personas que de manera directa o indirecta colaboraron en el presente trabajo.

**Alberto Aguirre**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
<b>LISTADO DE TABLAS</b> .....	x
<b>LISTADO DE CUADROS</b> .....	xii
<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>LISTADO DE ANEXOS</b> .....	xvi
<b>NOMENCLATURA UTILIZADA</b> .....	xix
<b>RESUMEN</b> .....	xxi
<b>ABSTRACT</b> .....	xxii
<b>CAPÍTULOS</b>	
<b>1 CAPÍTULO: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos de la investigación.....	5
1.3.1 Objetivo general .....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Marco teórico .....	6
1.4.1 Aguas ácidas en minería .....	6
1.4.2 Biolixiviación en la Empresa Minera Orenas S.A .....	9
1.4.3 Microorganismos hierro oxidantes en procesos de biolixiviación .....	14
1.4.4 Métodos de tratamiento de aguas ácidas .....	31
1.4.5 Benzoato de sodio .....	36

1.5	Sistema de hipótesis.....	44
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
2.1	Participantes.....	45
2.2	Zona de estudio .....	45
2.3	Período de tiempo de investigación .....	45
2.4	Diseño .....	46
2.5	Procedimientos .....	46
2.5.1	Material biológico .....	46
2.5.2	Muestreo.....	46
2.5.3	Tratamiento y transporte de las muestras colectadas .....	47
2.5.4	Almacenamiento de muestras en laboratorio .....	47
2.5.5	Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana .....	48
2.5.6	Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana .....	55
2.5.7	Factores estudiados .....	58
2.6	Análisis de datos .....	61
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO: RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
3.1	Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana.....	63
3.1.1	Hierro ferroso.....	66
3.1.2	Hierro férrico .....	75
3.1.3	pH .....	84
3.2	Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana.....	95
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO: DISCUSIÓN .....</b>	<b>98</b>
4.1	Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana.....	98
4.1.1	Ensayos de inhibición con benzoato de sodio .....	98
4.1.2	Ensayos de inhibición con texapon.....	101
4.1.3	Ensayos de neutralización BIOX™ .....	104



4.2 Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana.....	109
<b>5 CAPÍTULO: CONCLUSIONES</b> .....	111
<b>6 CAPÍTULO: RECOMENDACIONES</b> .....	113
<b>7 CAPÍTULO: BIBLIOGRAFÍA</b> .....	115
<b>ANEXOS</b> .....	120

## LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Tratamientos con benzoato de sodio y dosis correspondientes.....	49
Tabla 2.2 Tratamientos con texapon y dosis correspondientes.....	52
Tabla 2.3 Tratamientos que utilizaron la técnica BIOX™ y sus dosis correspondientes.....	55
Tabla 2.4 Composición del medio 9K empleado en la investigación.....	57
Tabla 3.1 Tratamientos aplicados en el transcurso de la investigación.....	62
Tabla 3.2 Análisis de la varianza (ADEVA) para cada una de las muestras que intervinieron en la experiencia.....	64
Tabla 3.3 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 1 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>2+</sup> .....	67
Tabla 3.4 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 2 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>2+</sup> .....	69
Tabla 3.5 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 3 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>2+</sup> .....	71
Tabla 3.6 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 4 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>2+</sup> .....	73

Tabla 3.7 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 1 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>3+</sup> .....	76
Tabla 3.8 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 2 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>3+</sup> .....	78
Tabla 3.9 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 3 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>3+</sup> .....	80
Tabla 3.10 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 4 y en donde se determinó la concentración de Fe <sup>3+</sup> .....	82
Tabla 3.11 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 1 y en donde se determinó el valor de pH.....	86
Tabla 3.12 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 2 y en donde se determinó el valor de pH.....	88
Tabla 3.13 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 3 y en donde se determinó el valor de pH.....	90
Tabla 3.14 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 4 y en donde se determinó el valor de pH.....	92

## LISTADO DE CUADROS

Página

Cuadro 1.1 Microorganismos activos, o con posible potencial de futuro, en la biolixiviación de minerales sulfurados.....	17
Cuadro 1.2 Características de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> .....	19
Cuadro 1.3 Características de <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> .....	20
Cuadro 1.4 Características de <i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> .....	21
Cuadro 1.5 Características de distintas bacterias termófilas.....	23
Cuadro 1.6 Concentración de algunos elementos críticos para mantener la viabilidad vital de las bacterias quimioautótrofas hierro oxidantes.....	29
Cuadro 1.7 Composición de algunos medios empleados para el enriquecimiento de microorganismos involucrados en procesos de biolixiviación.....	30
Cuadro 1.8 Propiedades fisicoquímicas del benzoato de sodio.....	36
Cuadro 1.9 Porcentaje de distribución del benzoato de sodio.....	38
Cuadro 1.10 Toxicidad oral aguda del benzoato de sodio.....	39
Cuadro 1.11 Pruebas de irritación de la piel con benzoato de sodio.....	39
Cuadro 1.12 Pruebas de irritación ocular con benzoato de sodio.....	40

Cuadro 1.13 Benzoato de sodio y toxicidad aguda para peces.....	41
Cuadro 1.14 Benzoato de sodio y toxicidad aguda para invertebrados acuáticos.....	42
Cuadro 1.15 Benzoato de sodio y toxicidad aguda para plantas acuáticas.....	42
Cuadro 1.16 Benzoato de sodio y toxicidad aguda para bacterias.....	42

## LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Procesamiento global del mineral aurífero refractario en Empresa Minera Orenas S.A.....	12
Figura 1.2 Operación de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A en Guayaquil.....	13
Figura 1.3 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos Fe-oxidantes.....	14
Figura 1.4 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos Fe-oxidantes.....	15
Figura 1.5 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos S-oxidantes.....	15
Figura 1.6 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos S-oxidantes.....	15
Figura 1.7 Mecanismo directo e indirecto de biolixiviación.....	26
Figura 1.8 Importancia del gradiente de pH en bacterias hierro oxidantes.....	27
Figura 1.9 Fórmula estructural del benzoato de sodio.....	36
Figura 1.10 Vías metabólicas de benzoatos.....	37
Figura 3.1 Concentraciones de hierro ferroso (ppm) durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio en la muestra 1.....	74
Figura 3.2 Concentraciones de hierro ferroso (ppm) durante la inhibición de la actividad bacteriana con texapon y métodos BIOX™ en la muestra 1.....	75
Figura 3.3 Concentraciones de hierro férrico durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio en la muestra 1.....	83
Figura 3.4 Concentraciones de hierro férrico durante la inhibición de la actividad bacteriana con texapon y métodos BIOX™ en la muestra 1.....	84

Figura 3.5 Valores de pH durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio en la muestra 1.....	93
Figura 3.6 Valores de pH durante la inhibición de la actividad bacteriana con métodos BIOX™ en la muestra 1.....	94
Figura 3.7 Valores de pH durante la inhibición de la actividad bacteriana con texapon en la muestra 1.....	94
Figura 3.8 Tubo de ensayo correspondiente al tratamiento control. ....	95
Figura 3.9 Tubos de ensayo control (izquierda) y con inhibidor (derecha).....	96
Figura 3.10 Tubos de ensayo control (derecha) y los correspondientes a todos los tratamientos inhibitorios aplicados sobre la muestra 2 (izquierda y atrás).....	96
Figura 3.11 Tubos de ensayo control (derecha), blanco (segundo desde la izquierda) y control positivo (primero desde la izquierda).....	97

## LISTADO DE ANEXOS

Página

Anexo 1: Materiales involucrados en el proceso de biolixiviación dentro de la Empresa Minera Orenas S.A	
Concentrados de flotación.....	120
Material pétreo acondicionado antes de entrar a la torre de biolixiviación.....	120
Anexo 2: Planta de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A	
Torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.....	121
Anexo 3: Torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A	
Vista de la parte superior de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.....	122
Anexo 4: Minerales auríferos involucrados en el proceso de biolixiviación en la Empresa Minera Orenas S.A	
Mineral aurífero refractario proveniente de mina.....	123
Mineral aurífero refractario después del proceso de biolixiviación.....	123
Anexo 5: Descargas líquidas de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A	
Agua residual de la torre de biolixiviación.....	124



Anexo 6: Muestreo en la torre de biolixiviación.

Toma de muestra del sitio de descarga de la torre de biolixiviación.....	125
--	-----

Anexo 7: Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana

Muestra de agua residual en el laboratorio.....	126
---	-----

Preparación de muestras antes de ser suplementadas con benzoato de sodio y/o texapon.....	126
---	-----

Anexo 8: Muestras durante los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana

Disposición de muestras dentro del agitador orbital.....	127
--	-----

Muestras de agua residual dentro de agitador orbital durante los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana.....	127
--	-----

Anexo 9: Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana

Tubos de ensayo con medio 9K tras inoculación con muestras provenientes de la fase de inhibición de la actividad bacteriana.....	128
--	-----

Tubos de ensayo en incubador estático durante los ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana.....	128
--	-----

Anexo 10: Adición de nutrimentos en la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A

Adición de medio 9K a la torre de biolixiviación.....	129
---	-----

Anexo 11: Resultados de los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana

Muestras de agua residual luego de ser sometidas a tratamientos con benzoato de sodio.....130

Muestras de agua residual luego de ser sometidas a tratamientos con texapon.....130

Anexo 12: Tratamiento BIOX™ convencional

Agua residual tratada mediante tratamiento BIOX™ convencional, se evidencia la presencia de una fase sólida (precipitados) en la parte inferior del envase.....131

Anexo 13: Fase sólida del tratamiento BIOX™ convencional

Precipitados provenientes del tratamiento BIOX™ convencional de las muestras de agua residual de la torre de biolixiviación.....132

Anexo 14: Tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio

Agua residual tratada mediante tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio, se evidencia la presencia de una fase sólida (precipitados) en la parte inferior del envase.....133

Anexo 15: Tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad

Agua residual tratada mediante tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad, se evidencia la presencia de una fase sólida (precipitados) en la parte inferior del envase.....134

## NOMENCLATURA UTILIZADA

**MINERAL AURÍFERO REFRACTARIO:** mineral aurífero de difícil recuperación de los metales preciosos por cianuración, generalmente el oro se encuentra encapsulado dentro de la pirita y la arsenopirita.

**BACTERIA:** organismo procariota unicelular perteneciente al reino Monera, capaz de dividirse por fisión binaria.

**MICROORGANISMO QUIMIOAUTÓTROFO/ QUIMIOLITOAUTÓTROFO:** microorganismo que obtiene su energía de la oxidación de sustancias inorgánicas sencillas, el carbono procede del CO<sub>2</sub>, y el resto de elementos a partir de sales inorgánicas, por lo que puede vivir en soluciones de sales minerales en ausencia de luz.

**BACTERIA QUIMIOAUTÓTROFA HIERRO OXIDANTE:** bacteria con capacidad de emplear CO<sub>2</sub> para utilizarlo como fuente de carbono en su metabolismo; adicionalmente obtiene la energía necesaria para su desarrollo a partir de la oxidación del hierro ferroso o de sulfuros metálicos.

**BIOLIXIVIACIÓN:** proceso biohidrometalúrgico en el que se solubiliza el valor metálico (Cu, Zn, U, Ni, Co) de un mineral o concentrado sulfurado mediante el uso de bacterias quimioautótrofas hierro y azufre oxidantes.

**pH:** logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno; es una medida del grado de acidez.

**ACIDEZ:** es una medida del grado en el que es ácida una sustancia.

**DRENAJE ÁCIDO DE MINA:** efluente típico de actividades mineras en las que se explotan minerales auríferos; se caracteriza básicamente por presentar altos niveles de acidez y metales pesados.

**ÁCIDOS ORGÁNICOS:** compuestos orgánicos que poseen al menos un grupo ácido ---carboxilo, hidroxilo, tiol, enol, sulfonato-en su estructura.

**SURFACTANTE ANIÓNICO:** compuesto químico que tiene la propiedad de disminuir la tensión superficial de líquidos.

**TENSIÓN SUPERFICIAL:** fenómeno por el cual la superficie de un líquido tiende a comportarse como si fuera una delgada película elástica debido a la manifestación de las fuerzas intermoleculares del mismo.

## RESUMEN

Se evaluó durante seis semanas el efecto inhibitorio de diferentes dosis de benzoato de sodio sobre la actividad de bacterias hierro oxidantes presentes en 30 ml agua residual ácida proveniente de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A, bajo condiciones de temperatura de 25,8°C y 100 rpm de agitación. La evaluación de la inhibición de la actividad bacteriana se llevó a cabo mediante determinaciones periódicas de  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y del valor de pH de las muestras sometidas a los tratamientos. Las dosis de benzoato aplicadas fluctuaron entre 0,01 y 0,05 gramos del compuesto orgánico. De forma alternativa y con el objeto de comparar los resultados de la inhibición de la actividad de las bacterias hierro oxidantes producida por el benzoato de sodio, se emplearon tratamientos convencionales de manejo de aguas ácidas: el detergente comercial Texapon y el método de neutralización de aguas ácidas BIOX™. Todos los tratamientos de benzoato de sodio inhibieron la actividad de las bacterias hierro oxidantes; sin embargo, los tratamientos que utilizaron dosis de 0,03; 0,04 y 0,05 gramos de benzoato de sodio presentaron la mejor efectividad de inhibición y son adecuados para ser incorporados dentro de procesos de tratamiento de las aguas residuales de la torre de biolixiviación, disminuyendo de esta forma la generación de acidez y la disolución de metales pesados por la interrupción en los mecanismos bacterianos de oxidación de los sulfuros metálicos presentes en el agua residual de la torre.

**Palabras clave:** bacterias hierro oxidantes, biolixiviación, benzoato de sodio, inhibición bacteriana, tratamiento de aguas ácidas de minas.

## **ABSTRACT**

The inhibitory effect of different doses of Sodium Benzoate over the activity of iron oxidizing bacteria that were present in 30 ml of acid water of Orenas Mining Company's bioleaching tower was evaluated during six weeks under conditions of 25,8°C and 100 rpm. The evaluation of activity inhibition was done by periodic determinations of  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  and pH of the samples that were under treatments' influence. The applied doses of benzoate fluctuated among 0,01 and 0,05 grams of the organic compound. At the same time and for comparing the results of inhibition of the activity produced by Sodium Benzoate, conventional treatments of water managing were used, these were: Texapon commercial detergent and BIOX™ neutralization process. All of the Benzoate's treatments inhibited bacterial activity. However, treatments that used Benzoate doses of 0,03; 0,04 and 0,05 grams had the best inhibition efficiency and are able to participate inside treatment processes of bioleaching tower's waste water, therefore they decrease acid generation and metal dissolution by breaking the bacteria's mechanisms that contribute to the oxidation of metal sulfides present in tower's waste water.

**Key words:** Sodium Benzoate, iron oxidizing bacteria, bioleaching, inhibitory effect, acidic mine water treatment.

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1 Formulación del problema

Las actuales innovaciones de la minería se hallan orientadas a la introducción de nuevas tecnologías de producción y a la práctica de la producción limpia, permitiendo de esta manera el desarrollo económico y social de los pueblos.

Los procesos hidrometalúrgicos son sumamente importantes en el campo minero, permitiendo la recuperación de metales por procesos menos agresivos con el ambiente.

La Biominería, rama de la biotecnología aplicada a la industria minero-metalúrgica, surgida debido a la tendiente práctica de procesos de investigación y desarrollo, actualmente compite con tecnologías convencionales mineras (Arrascue, 2002). El objetivo fundamental de la Biominería se basa en la recuperación de metales, tales como cobre, oro, uranio, níquel, cobalto, zinc, etc., a partir de minerales utilizando microorganismos.

La biolixiviación de minerales metálicos sulfurados permite recuperar eficientemente los respectivos metales, pero, al mismo tiempo se generan vertidos o efluentes líquidos con altos contenidos de ácido sulfúrico, iones de metales pesados y microorganismos propios de estos ambientes; estos vertidos al ser descargados libremente al ambiente ocasionan daños irreversibles al ecosistema, sobre todo, produciendo un deterioro de la calidad de las aguas superficiales y subterráneas.

Adicionalmente, y de manera natural, se producen vertidos en minas abandonadas, en donde la conjunción de factores adecuados para la generación de aguas ácidas es óptima, estas aguas se conocen como “drenaje ácido de mina” y su descarga continua al ambiente genera degradaciones en las aguas, suelo, animales y plantas.

La industria minera en el Ecuador no está exenta al uso de tecnologías biomineras. Actualmente, la Empresa Minera Orenas S.A se encuentra implementando una planta de biolixiviación en el distrito aurífero de Ponce Enríquez, provincia del Azuay; sin embargo, será menester el adecuado manejo de las descargas líquidas y sólidas de la planta, basado principalmente en el tratamiento de las aguas ácidas residuales y en el control de los microorganismos hierro oxidantes presentes en las mismas, todo ello para evitar el detrimento del ambiente aledaño a aquella zona de explotación minera.

Se debe subrayar que las técnicas de manejo a implantarse para los residuos de la planta podrían aplicarse en el control de la generación del drenaje ácido de minas abandonadas en el Ecuador.



## 1.2 Justificación del problema

El mayor problema que representa la minería frente a las aguas es la descarga de efluentes ácidos ricos en sulfatos y con contenidos variables de metales pesados. Tanto en actividades mineras en explotación como en aquellas abandonadas, existe la liberación de efluentes ácidos, denominados en general “drenaje ácido de mina”, siendo éstos el resultado de la lixiviación natural de sulfuros metálicos o de la pirita debido a una serie de reacciones en las que algunas bacterias actúan como catalizadores.

En las operaciones industriales mineras de biolixiviación que utilizan bacterias en la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley, también existe la descarga de efluentes ácidos con contenidos variables de metales pesados.

Los valores de pH -1,5 a 4,5- de todas estas aguas alteran las características químicas de los cuerpos receptores de agua, contaminándolos y provocando impactos en los ecosistemas acuáticos; de igual manera, la acidez de estas aguas es propicia para la disolución de ciertos metales presentes en los minerales (hierro, manganeso, arsénico, cobre, cinc, níquel, mercurio y otros) y que a la postre pueden llegar hasta los cuerpos receptores de agua y concentrarse en los sedimentos o incluso en los organismos (Sánchez, 1999).

En general, los impactos ambientales de las aguas ácidas se resumen en: aguas contaminadas imposibilitadas para su uso urbano o industrial – debido a su carácter corrosivo sobre estructuras metálicas y de hormigón–, interrupción del crecimiento y reproducción de plantas y animales, reducción de la biodiversidad e impactos negativos en el turismo (Lorber, 1997).

En el distrito aurífero de Ponce Enríquez –provincia del Azuay– se han venido realizando actividades mineras relacionadas a la explotación y beneficio de minerales auríferos sulfurados, lo que ha permitido desarrollar un trabajo alternativo –y en algunos casos definitivo– para muchos pobladores que también se dedican a actividades agrícolas; todos estos asentamientos mineros

se desarrollan con una carencia de técnicas modernas de explotación, por lo que ocasionan graves impactos ambientales. Los principales sulfuros metálicos auríferos explotados en la zona contienen piritita y arsenopiritita. En la actualidad se planea la implementación de una planta de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A en la zona de Ponce Enríquez, para la extracción de oro oculto en los sulfuros metálicos; sin embargo, un mal manejo de los efluentes del proceso coadyuvaría a la contaminación del factor biótico y abiótico de los alrededores.

En conocimiento de que las descargas líquidas ácidas de la planta contienen bacterias hierro oxidantes, las mismas que son las principales catalizadores en la oxidación de los sulfuros metálicos, el estudio de agentes que permitan su inhibición aportará a la mitigación del impacto ambiental causado por las emisiones líquidas de la planta y será de aplicación general para la prevención de la contaminación ambiental en las actividades mineras del sector de Ponce Enríquez y en otras zonas mineras del país.

## **1.3 Objetivos de la investigación**

### **1.3.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto inhibitorio del benzoato de sodio sobre la actividad de bacterias hierro oxidantes presentes en aguas residuales de actividades mineras en el Ecuador, a fin de encontrar métodos efectivos para paliar la contaminación ambiental que estos microorganismos ocasionan en las aguas residuales que provienen de actividades mineras.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Realizar ensayos de inhibición de la actividad de bacterias hierro oxidantes mediante la aplicación de diferentes dosis de benzoato de sodio sobre aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.
- Realizar ensayos de comprobación de la efectividad de las pruebas de inhibición empleadas.
- Comparar los resultados de la inhibición de la actividad de las bacterias hierro oxidantes producida por el benzoato de sodio, con los resultados de tratamientos convencionales, como es el caso de la utilización del detergente comercial Texapon y el método de neutralización de aguas ácidas BIOX™.

## **1.4 Marco teórico**

### **1.4.1 Aguas ácidas en minería**

El agua es uno de los recursos naturales más abundantes y constituye el medio básico de todos los procesos de la vida. A pesar de su abundancia, la disponibilidad de agua para hacer frente a la creciente demanda de uso por el hombre es cada vez más limitada.

La minería es una de las actividades industriales que se encuentra más estrechamente ligada al agua, pues, por un lado, se necesita en un gran número de operaciones y, por otro, se generan grandes volúmenes de aguas residuales. La contaminación del agua se debe en general a la introducción de sustancias o de ciertas formas de energía que provocan cambios en sus características físicas y químicas.

El agua en la minería procede fundamentalmente de las infiltraciones de los acuíferos interceptados y de la escorrentía superficial, así como también de los efluentes de las plantas de tratamiento de minerales, pues frecuentemente la concentración se realiza por vía húmeda. Aunque se recircule parte del agua en el proceso mineralúrgico y se utilice un determinado porcentaje del agua de drenaje en ciertas operaciones mineras, suele existir un excedente cuya mala calidad tiene diversos efectos adversos en el medio ambiente (Instituto Geológico y Minero de España, 2004).

#### **1.4.1.1 Aguas ácidas**

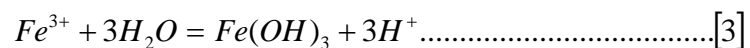
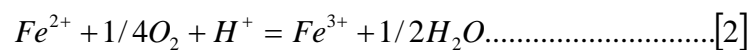
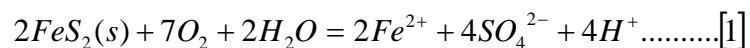
Las aguas ácidas de mina se caracterizan por presentar valores de pH bajos, una gran cantidad de sólidos en suspensión y un alto contenido en sulfato y metales disueltos (Fe, Al, Mn, Zn, Cu, Pb, entre otros), alcanzando sus concentraciones las decenas y centenas de miligramos por litro. Estos elementos en esas concentraciones son nocivos para la actividad biológica, contaminan los cauces, y además esas aguas pueden llegar a dañar la estructura y la cimentación de construcciones (López, 2002).

El ácido es generado en las instalaciones mineras cuando los sulfuros metálicos minerales son oxidados. Los sulfuros minerales están presentes en el interior de las rocas asociados con diferentes metales. Anteriormente a la minería, la oxidación de estos minerales y la formación de ácido sulfúrico correspondían a procesos de oxidación de los metales. Este es un proceso muy lento. Los procesos de extracción y beneficio asociados a la actividad minera incrementa el grado de estas reacciones químicas debidos a la movilización de grandes volúmenes de materiales, y al incrementar el área de exposición de las rocas al aire y al agua (Soriano, 2004).

Los manantiales, fuentes y ríos cercanos a afloramientos de roca, cuya composición mineralógica presenta una proporción elevada de minerales sulfurosos –como piritita, marcasita, arsenopiritita, pirrotita, calcopiritita, entre otros –, pueden ser acidificados como consecuencia de la oxidación natural de los mismos minerales (European Commission of Energy, 2003).

#### 1.4.1.2 Generación de aguas ácidas

Una serie de reacciones químicas describen la generación de aguas ácidas, la cual resulta de la exposición de la piritita ( $FeS_2$ ) – normalmente presente en minas – a diversos factores, entre ellos el oxígeno atmosférico, el agua y las bacterias hierro y azufre oxidantes, como el *Thiobacillus ferrooxidans* (Gurdeep & Miss, 1988).



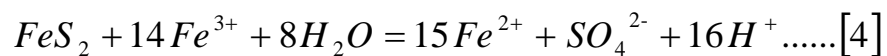
La estequiometría de la ecuación 1, muestra que una mol de  $FeS_2$  produce dos moles de ácido ( $H^+$ ). El  $Fe^{2+}$  generado por la reacción de la ecuación 1 puede oxidarse fácilmente a  $Fe^{3+}$  y producir tres moles adicionales de ácido (ecuación 3). En total, por cada mol de piritita oxidada, cuatro equivalentes de ácido ( $H^+$ ) son producidos (Gurdeep &

Miss, 1988).

A un valor de pH cercano a la neutralidad (etapa 1), los niveles de oxidación debida al aire y al *Thiobacillus ferrooxidans* son comparables. Esta etapa es típica de minas expuestas o abandonadas. A pesar de la alta concentración de pirita, el nivel de oxidación –tanto por oxígeno como por *Thiobacillus ferrooxidans* – es relativamente bajo y la alcalinidad del agua puede neutralizar efectivamente el ácido formado en esta etapa (Gurdeep & Miss, 1988).

Cuando la capacidad neutralizante del ambiente es superada, el ácido empieza a acumularse y el pH decrece (etapa 2). Conforme el pH decrece, el nivel de hierro oxidado por *Thiobacillus ferrooxidans* se incrementa. La acción de las bacterias provoca la producción de ácido, lo cual coopera a un decremento adicional del pH (Gurdeep & Miss, 1988).

Cuando el pH en las cercanías de la pirita cae a un valor cercano a 3, la incrementada solubilidad del hierro y el nivel decreciente de precipitación de  $Fe(OH)_3$  afectan el nivel global de producción de ácido (etapa 3). En este momento, el ión ferroso es oxidado por *Thiobacillus ferrooxidans* y el hierro férrico oxida la pirita:



En la tercera etapa, el nivel de producción de ácido es alto y está limitado por la concentración de iones  $Fe^{3+}$ . La actividad del ión férrico se vuelve significativa a un pH aproximado de 2,5; un ciclo continuo de oxidación de la pirita y oxidación bacteriana de  $Fe^{2+}$  resulta de los efectos combinados de las reacciones de las ecuaciones 2 y 4. El nivel de la reacción de la ecuación 2 ejerce un control primario en el ciclo, limitando la disponibilidad de  $Fe^{3+}$ , el cual es el mayor oxidante de la pirita.

La inhibición de la actividad de *Thiobacillus ferrooxidans* puede prevenir la oxidación férrica de la pirita y de esta manera reducir la formación de ácido, al menos en un 75% (Gurdeep & Miss, 1988).

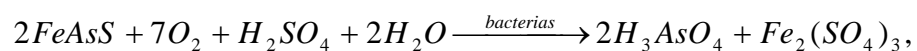
## 1.4.2 Biolixiviación en la Empresa Minera Orenas S.A

### 1.4.2.1 Generalidades

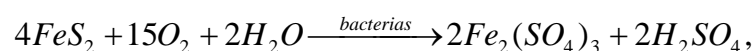
La Empresa Minera Orenas S.A. realiza el proceso industrial de biolixiviación de minerales auríferos refractarios. Los minerales auríferos refractarios no permiten la recuperación del oro y la plata por el proceso de cianuración, ya que tienen una matriz mineralógica conformada por pirita y arsenopirita que impide el contacto entre los metales preciosos y la solución de cianuro de sodio.

La biolixiviación es una alternativa importante que permite la oxidación de la pirita y arsenopirita, con lo que se degrada la matriz mineralógica y se transforma en minerales porosos y de fácil cianuración, todo lo cual facilita la recuperación del oro y plata metálicos.

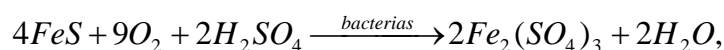
Según Aswegen, Niekerk & Olivier (2007), las principales reacciones involucradas en la biolixiviación tienen que ver con la oxidación microbiológica de la pirita, arsenopirita y pirrotita, representadas de la siguiente forma:



Arsenopirita



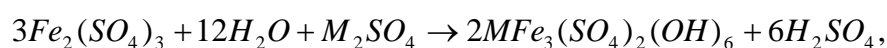
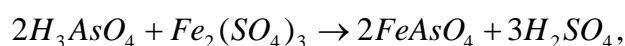
Pirita



Pirrotita

Las reacciones de oxidación anteriores indican la alta demanda de oxígeno necesaria para la oxidación de los minerales, por esta razón se requiere suministrar y dispersar elevados niveles de aire a la solución.

También se presentan reacciones secundarias, incluyen la precipitación del arsenato férrico ( $FeAsO_4$ ), la disolución ácida de carbonatos y la precipitación de jarosita:



donde  $M^+$  es  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ , o  $H_3O^+$

#### 1.4.2.2 Descripción de los procesos de biolixiviación

De acuerdo a las observaciones y la descripción que los operarios y técnicos brindan en cuanto a los procesos que se llevan a cabo dentro la planta de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A, se distinguen varios procesos dentro de la planta: el mineral aurífero refractario proveniente de las labores mineras es sometido a una variedad de operaciones físicas y procesos químicos con la finalidad de recuperar el oro y plata metálicos.

En la figura 1.1 se presenta una representación esquemática del procesamiento global del mineral aurífero refractario.

En primer lugar, el mineral aurífero refractario es sometido a una trituración y molienda a fin de transformarlo en un material muy fino; posteriormente se lo somete al proceso de concentración por flotación, para



eliminar aquellas fracciones de minerales estériles. El concentrado formado tiene un alto contenido de pirita, arsenopirita y metales preciosos, todos formando una matriz mineralógica refractaria y de muy baja porosidad a líquidos (ver Anexo 1).

A continuación se procede a la operación de acondicionamiento, en la que trozos de material pétreo inerte son recubiertos con una película del concentrado aurífero refractario con el objeto de crear una mayor superficie de contacto y de esta forma facilitar las reacciones de oxidación microbiológica (ver Anexo 1); luego este mineral acondicionado se carga por la parte superior de la torre de biolixiviación (ver Anexo 2 y Anexo 3).

En la torre de biolixiviación se produce íntimo contacto entre el mineral aurífero refractario, el licor lixivante, y el aire. Bajo estrictas condiciones de operación, los microorganismos degradan u oxidan a los minerales auríferos refractarios, transformándolos en minerales auríferos altamente porosos (ver Anexo 4).

Cumplida la etapa de biolixiviación, se procede a la descarga de la torre y la subsiguiente separación de sólidos y líquidos. Las fracciones separadas corresponden a: trozos de material pétreo inerte, que se los recircula a la etapa de acondicionamiento; los sólidos finos de mineral aurífero degradado que se los conduce a la etapa de cianuración, y finalmente la descarga de líquidos residuales de la biolixiviación. Parte de estos líquidos se recirculan a la etapa de acondicionamiento del licor lixivante, otra parte se descarga libremente al ambiente, lo cual conduce a una destrucción o degradación del ambiente ya que estos vertidos se hallan constituidos por una variedad de sustancias altamente tóxicas (ver Anexo 5).

En la figura 1.2 se presenta una representación esquemática de la operación en la torre de biolixiviación.

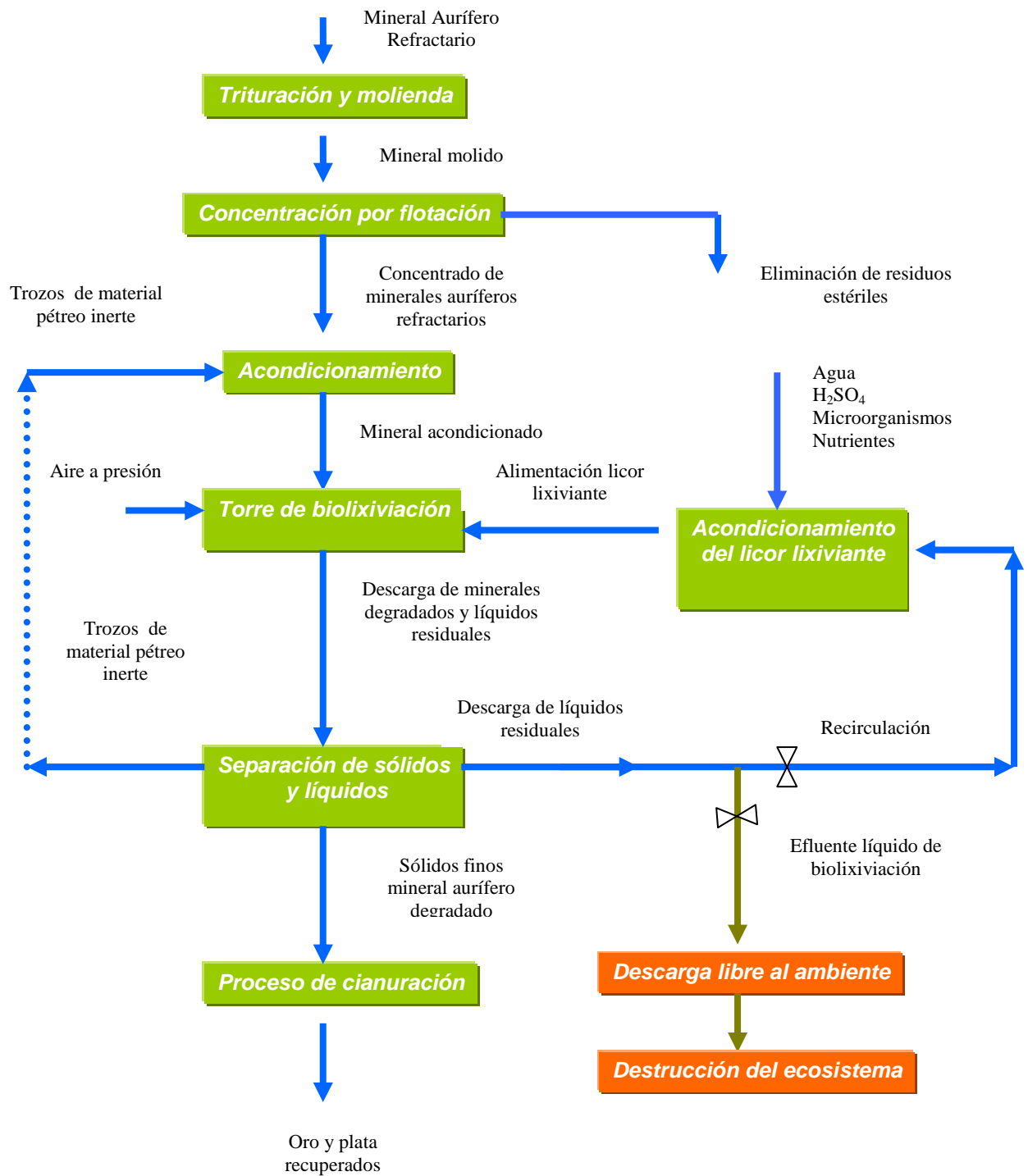


Figura 1.1 Procesamiento global del mineral aurífero refractario en Empresa Minera Orenas S.A.

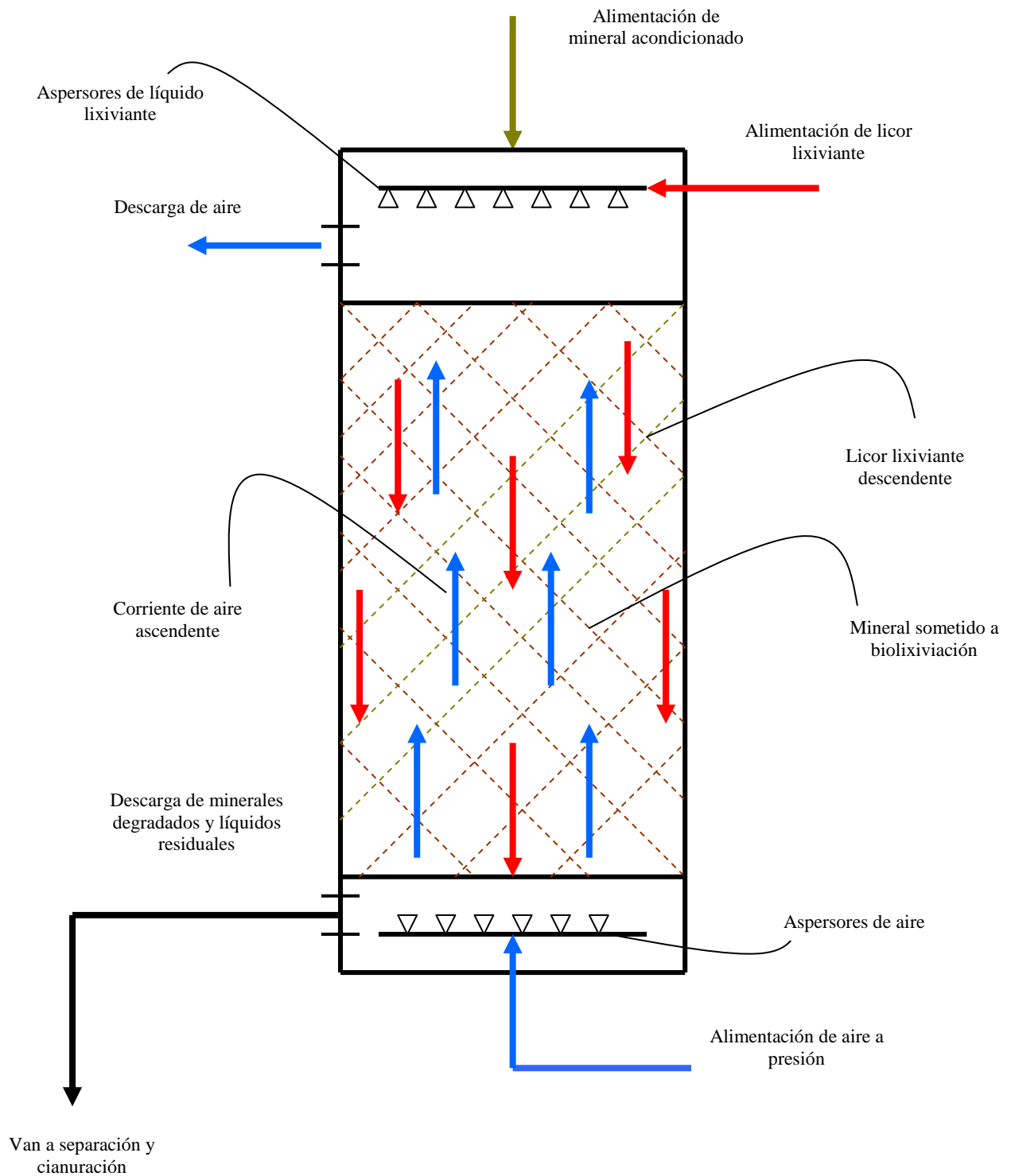


Figura 1.2 Operación de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A en Guayaquil.

### 1.4.3 Microorganismos hierro oxidantes en procesos de biolixiviación

Los microorganismos hierro oxidantes más importantes relacionados con la biolixiviación de minerales son aquellos responsables de la producción de hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y en algunos casos de ácido sulfúrico, ambos requeridos para las reacciones de biolixiviación. Independientemente del tipo de proceso o las temperaturas a las cuales operan, estos microbios tienen características en común que los hacen apropiados para su función en la disolución de minerales, éstas son: crecen autotróficamente fijando  $\text{CO}_2$  desde la atmósfera; obtienen su energía usando tanto hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o compuestos inorgánicos reducidos de azufre (algunos usan ambos) como donador de electrones; generalmente usan oxígeno como aceptor de electrones; son acidófilos; crecen en ambientes de pH bajo (pH 1.4 -1.6 frecuentemente); adicionalmente, son remarcablemente tolerantes a un amplio rango de iones metálicos.

Estos microorganismos autótrofos poseen requerimientos nutricionales modestos, el aire les provee la fuente de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y el oxígeno, el agua, el medio para el crecimiento y el mineral, la fuente de energía y ciertos elementos traza (Rawlings, 2007). Las figuras 1.3, 1.4, 1.5 y 1.6 exponen micrografías de microorganismos hierro y/o azufre oxidantes que frecuentemente se encuentran en ambientes de lixiviación.

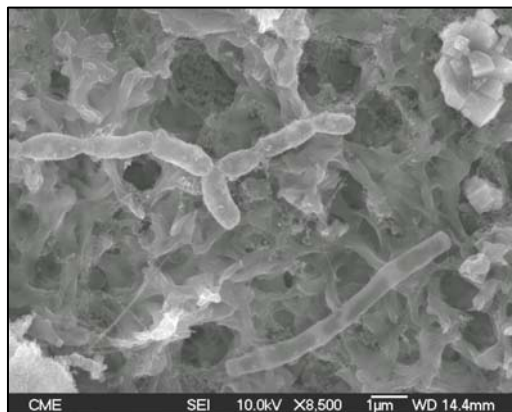


Figura 1.3 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos Fe-oxidantes (Muñoz, 2005).

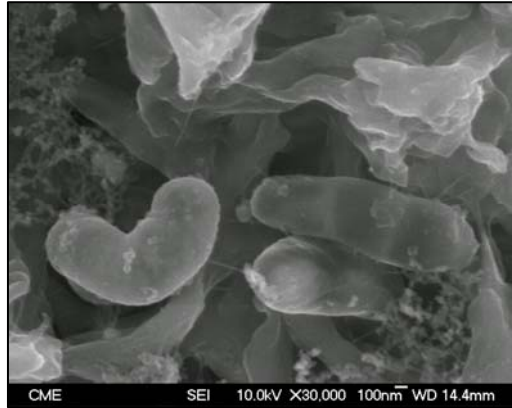


Figura 1.4 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos Fe-oxidantes (Muñoz, 2005).

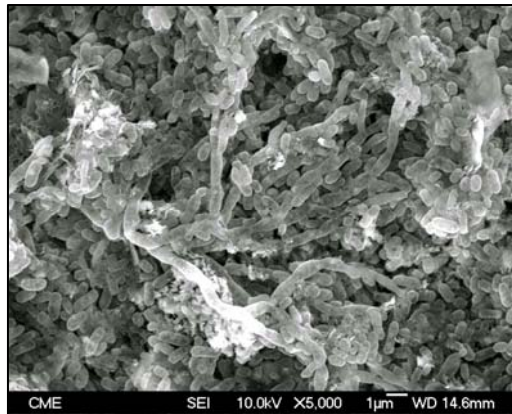


Figura 1.5 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos S-oxidantes (Muñoz, 2005).

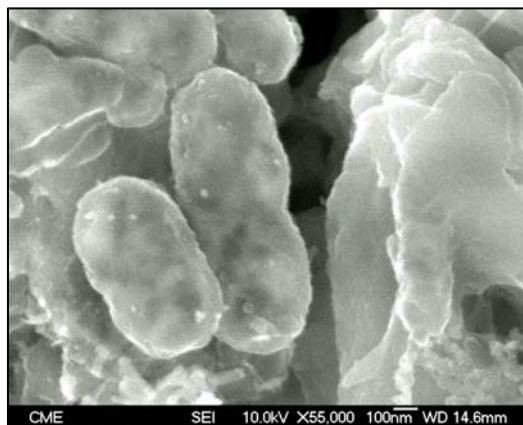


Figura 1.6 Micrografía FEG de microorganismos mesófilos S-oxidantes (Muñoz, 2005).

#### **1.4.3.1 Caracterización de los microorganismos hierro oxidantes**

Tanto en ambientes naturales como en operaciones industriales de biolixiviación, resulta proverbial la participación activa de microorganismos hierro oxidantes, peculiares por su fácil adaptación a condiciones extremas de pH, tolerancia a altas concentraciones de metales pesados y en algunos casos, elevadas temperaturas. En estos ambientes, dichos microorganismos utilizan como fuente primaria de energía al hierro ferroso, sulfuros metálicos y en dependencia del microorganismo, ciertas especies reducidas de azufre (Ballester, Sancho & Verdeja, 2007).

El cuadro 1.1 recoge los nombres y características fisiológicas de algunos de estos organismos acidófilos.

Cuadro 1.1 Microorganismos activos, o con posible potencial de futuro, en la biolixiviación de minerales sulfurados.

<b>Grupo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Características fisiológicas</b>
Mesófilos	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Oxida a $Fe^{2+}$ , $S^0$ , $S_2O_3^{2-}$ , sulfuros metálicos, etc.
	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Oxida a especies reducidas del azufre a ac. sulfúrico; no oxida a sulfuros minerales
	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Oxida a $Fe^{2+}$ pero no a S
Termófilos moderados	<i>Sulfobacillus</i>	
	<i>Thermosulfidooxidans</i>	Oxida a $Fe^{2+}$ y S
Termófilos extremos	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Oxida a $Fe^{2+}$ y S; reduce el $Fe^{3+}$ anaeróbicamente
	<i>Acidianus brierleyi</i>	Oxida a $Fe^{2+}$ , S y $CuFeS_2$
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	No hay datos

Fuente: (Ballester et al., 2007)

#### 1.4.3.1.1 Microorganismos mesófilos

Destacan por su importancia, los del género *Thiobacillus* y más concretamente el *T. ferrooxidans*. Además, se hace también referencia al denominado *Leptospirillum ferrooxidans* (Ballester et al., 2007).

Recientemente, se han descubierto arqueobacterias acidófilas y mesófilas hierro oxidantes, las cuales pertenecen a los *Thermoplasmales*, y hay dos especies conocidas, *Ferroplasma acidiphilum* y *F. acidarmanus* (Mishra, 2004).

#### ***Thiobacillus ferrooxidans***

En la actualidad *T. ferrooxidans* es la bacteria más utilizada en biolixiviación. Fisiológicamente se trata de una bacteria Gram negativa, acidófila, mesófila y quimioautótrofa. Las células son cortas y forman una especie de cilindros de aproximadamente 1-2  $\mu\text{m}$  de largo y de 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Algunas cepas poseen flagelos y/o pilis. Este microorganismo satisface sus requerimientos biosintéticos de carbono utilizando el anhídrido carbónico a través del ciclo de Calvin–Benson y, también, por la carboxilación de distintas sustancias orgánicas, más o menos, complejas (Ballester et al., 2007).

*T. ferrooxidans* puede usar tanto el ión ferroso ( $2\text{Fe}^{2+} + 1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ ) cuanto el azufre ( $\text{S}^0 + 1/2 \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$ ) como fuente de energía y ha sido estudiada extensamente como el agente de la lixiviación bacteriana (Suzuki, 2001).

Sus necesidades energéticas se obtienen de la oxidación del ión ferroso o de especies reducidas del azufre. Esta energía se utiliza en la fijación del  $\text{CO}_2$  y en otras funciones intermedias del metabolismo. El sistema de oxidación del ión ferroso está asociado con la membrana celular. La enzima más importante durante la oxidación del hierro es la  $\text{Fe}^{2+}$  citocromo *c* oxidoreductasa; los citocromos *a* y *Q* también están asociados con el proceso.



*T. ferrooxidans* presenta de igual manera una alta resistencia a metales en disolución; sin embargo, esta tolerancia depende de cada cepa, el estado fisiológico del organismo, de su historia previa en cuanto a la exposición al tóxico, de las condiciones ambientales durante la exposición y del método empírico por el cual se determina la tolerancia a la toxicidad (Ballester et al., 2007).

*Thiobacillus ferrooxidans* parece ser particularmente resistente a los metales y hay reportes de que la bacteria crece en medios que contienen  $\text{Co}^{2+}$ (30g/l),  $\text{Cu}^{2+}$ (55g/l),  $\text{Ni}^{2+}$ (72g/l),  $\text{Zn}^{2+}$ (120g/l),  $\text{U}_3\text{O}_8$ (12g/l) y  $\text{Fe}^{2+}$ (160g/l) (Rawlings, 1997). El cuadro 1.2 resume las características de este microorganismo.

Cuadro 1.2 Características de *Thiobacillus ferrooxidans*.

<b>Características</b>	<b><i>Thiobacillus ferrooxidans</i></b>
Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) y forma de la célula	0,3-0,5x 1,0-1,7 Cilíndrica
Pared celular	Gram negativa
Flagelos	+ (uno)
Pili	+
Fuente de energía para el crecimiento:	
Azufre elemental	+
Tiosulfato	+
Tetrionato	+
Hierro(II)	+
Uranio(IV)	+
Cobre(II)	+
Selenio(II)	+
Sulfuros minerales	+
Rango de pH ( <b>óptimo</b> )	1,2-6,0 ( <b>2,5-2,8</b> )
Fuentes de nitrógeno	$\text{NH}_4^+$
Relación con el oxígeno	Aerobia estricta
Temperatura( <b>óptima</b> ), °C	5-40 ( <b>28-35</b> )
Contenido de ADN (G+C),%moles	55,0-57,4

Fuente: (Ballester et al., 2007)

### ***Leptospirillum ferrooxidans***

Es una bacteria Gram negativa, mesófila, acidófila y quimioautótrofa, capaz de oxidar al hierro ferroso. Posee forma cilíndrica -un tanto curvada-; es más larga y con mayor capacidad de movimiento que *T. ferrooxidans*. Además son capaces de formar espirales por unión de varias células. Una característica distintiva de este organismo es su incapacidad de oxidar al azufre para obtener energía.

*L. ferrooxidans* es capaz de solubilizar pirita en cultivos puros y puede catalizar, indirectamente la lixiviación de otros minerales sulfurados que contienen cantidades poco importantes de hierro. Es importante resaltar que esta bacteria demuestra menor resistencia que *T. ferrooxidans* frente a la toxicidad por cationes metálicos (Ballester et al., 2007).

*L. ferrooxidans* puede oxidar solo al ión ferroso, pero puede crecer a temperaturas más elevadas que *T. ferrooxidans* (Suzuki, 2001). El cuadro 1.3 resume las características de este microorganismo.

Cuadro 1.3 Características de *Leptospirillum ferrooxidans*.

<b>Características</b>	<b><i>Leptospirillum ferrooxidans</i></b>
Tamaño ( $\mu\text{m}$ ) y forma de las células	Vibrios: 0,2-0,4x0,9-1,1 Espirales
Pared celular	Gram negativas
Flagelos	+
Rango de pH ( <b>óptimo</b> )	1,5-4,0 ( <b>2,5-3,0</b> )
Temperatura óptima	30
Relación con el oxígeno	Aerobia estricta
Fuente de energía para el crecimiento:	
Hierro (II)	+
Pirita	+
Fuente de nitrógeno	$\text{NH}_4^+$
Contenido de ADN (G+C),%moles	No hay datos

Fuente: (Ballester et al., 2007)

### 1.4.3.1.2 Microorganismos termófilos moderados

En ambientes de lixiviación, se ha detectado la presencia de bacterias acidófilas que al mismo tiempo son termófilas moderadas, capaces de oxidar pirita a 55°C. Estas bacterias también oxidan al hierro (II) y catalizan la lixiviación de metales. Se ha propuesto para ellas el nombre de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Se ha demostrado que algunos de estos organismos tienen un metabolismo mixotrófico, pues su asimilación del carbono puede ocurrir tanto a partir del CO<sub>2</sub> como por asimilación directa del carbono de distintos azúcares (Ballester et al., 2007). El cuadro 1.4 resume las características fundamentales de las especies pertenecientes al género *Sulfobacillus*.

Cuadro 1.4 Características de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

<b>Características</b>	<b><i>S. thermosulfidooxidans</i></b>
Tamaño (µm); forma de las células	0,6-0,8x1,0-3,0; cilíndricas
Pared celular	Gram positiva
Pili	+
Formación de esporas	+
Fuente de energía quimiolitótrofa:	
Sulfuros minerales	+
Azufre elemental	+
Hierro (II)	+
Fuente de energía heterótrofa	Extracto de levadura, glucosa, sucrosa, glutamato
Fuente de nitrógeno	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Rango de pH ( <b>óptimo</b> )	1,1-5,0 ( <b>1,7-2,4</b> )
Rango de temperatura ( <b>óptimo</b> ), °C	20-60 ( <b>50-55</b> )
Relación con el oxígeno	Aerobia estricta
Contenido de ADN (G+C),%moles	47,2

Fuente: (Ballester et al., 2007)

#### 1.4.3.1.3 Microorganismos termófilos extremos

Se ha detectado la presencia de microorganismos termófilos extremos en ambientes ácidos y con alta temperatura. *Sulfolobus brierleyi* tiene la capacidad de oxidar al hierro y al azufre reducidos de una forma similar a como lo hacen los *Thiobacillus*, siendo un termófilo obligado, requiriendo un intervalo de temperaturas de entre 40 y 70°C para su crecimiento; morfológicamente es distinto al *Thiobacillus*, pues carece de una pared celular rígida y además es esférico. En 1972, Breck y cols. describieron un microorganismo desconocido, termófilo y acidófilo, llamado *Sulfolobus acidocaldarius*. Los *Sulfolobus* oxidan al azufre a temperaturas entre 55 y 80°C y a un pH entre 0,9 y 5,8.

Estos termófilos extremos todavía no han sido empleados a escala industrial aunque los estudios de laboratorio en reactores agitados están dando excelentes rendimientos, con cinéticas de lixiviación apreciables en el ataque de sulfuros (Ballester et al., 2007). Las características fundamentales de todos estos microorganismos se reflejan en el cuadro 1.5.

Cuadro 1.5 Características de distintas bacterias termófilas.

<b>Características</b>	<b><i>Sulfolobus acidocaldarius</i></b>	<b><i>Sulfolobus solfataricus</i></b>	<b><i>Acidianus brierleyi</i></b>
Tamaño (µm) y forma de las células	0,8-1,0 Esférica	0,8-2,0 Esférica	1,0-1,5 Esférica
Pared celular	Gram negativa	Gram negativa	Gram negativa
Estructura	Subunidades de glicoproteínas	Subunidades de glicoproteínas	Subunidades de glicoproteínas
Pili	-	-	-
Fuente de energía quimiolitótrofa:			
Sulfuros minerales	-	-	+
Azufre elemental	+	+	+
Hierro (II)	-	+	+
Fuente de energía: heterótrofa	Extracto de levadura, triptona, peptona, glutamina, alamina y otros.	Extracto de levadura, glucosa, xilosa, lactosa, maltosa y otros.	Extracto de levadura, sucrosa, lactosa, triptona extracto de carne y otros.
Rango de pH óptimo	2,0-3,0	3,0-5,0	1,5-2,0
Rango de temperatura ( <b>óptimo</b> ), °C	55-80 ( <b>70</b> )	50-89 ( <b>75-87</b> )	45-75 ( <b>70</b> )
Relación con el oxígeno	Aerobia	Aerobia	Aerobia
Contenido de ADN (G+C),%moles	34,0-39,0	34,0-39,0	34,0-39,0

Fuente: (Ballester et al., 2007)

#### **1.4.3.1.4 Microorganismos heterótrofos**

En los ambientes naturales es posible encontrar, a menudo, distintos microorganismos, también acidófilos pero heterótrofos, que generalmente se encuentran asociados con *Thiobacillus*. El papel de estos microorganismos es incierto cuando actúan en presencia de *Thiobacillus*, pero sin embargo, se ha apuntado su importancia, aunque indirecta, en la destrucción de ciertos compuestos orgánicos perjudiciales para el desarrollo de los autótrofos. No obstante, para poder aprovecharlos en procesos de lixiviación, es necesario un conocimiento más profundo de los mismos (Ballester et al., 2007).

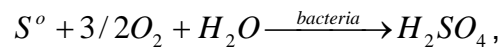
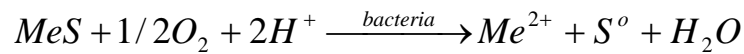
#### **1.4.3.2 Mecanismos de actuación**

Siempre ha existido controversia respecto a los mecanismos biológicos que rigen los procesos de biolixiviación. Indefectiblemente, las bacterias rigen un papel capital en el proceso de oxidación de los sulfuros metálicos.

Muchos investigadores sostienen la idea de que las bacterias sólo participan de una forma indirecta en la oxidación de sulfuros minerales mediante la formación del oxidante, es decir, el  $\text{Fe}^{3+}$ . Otros investigadores sugieren que las bacterias están implicadas en el proceso de una manera mucho más directa a través de distintas enzimas. Dilucidar a favor de cualquiera de estos mecanismos supone la profundización en estudios a nivel molecular y actualmente ninguna de estas teorías es totalmente aceptada (Ballester et al., 2007).

##### **1.4.3.2.1 Mecanismo directo**

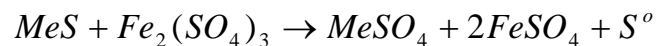
Según este mecanismo, la bacteria ataca al sulfuro metálico de forma directa, mediante su adherencia a la superficie mineral y la posterior oxidación enzimática de éste por transporte de electrones desde la parte reducida del mineral, generalmente un sulfuro, al oxígeno disuelto (Ballester, 2005). Domic (2004) plantea la presencia de dos reacciones aeróbicas secuenciales en este mecanismo:



donde MeS representa un sulfuro metálico.

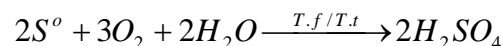
#### 1.4.3.2.2 Mecanismo indirecto

La acción indirecta de solubilización biológica de metales tiene lugar por la interacción del mineral con productos intermediarios o finales del metabolismo de los microorganismos. No hay, por tanto, reacciones enzimáticas y el agente de lixiviación es únicamente producido o regenerado por el organismo. Por ejemplo, los sulfuros metálicos pueden oxidarse químicamente a sulfato por medio del sulfato férrico sin participación alguna de las bacterias:



Estas reacciones tienen lugar en la naturaleza bajo condiciones normales de lixiviación. El sulfato ferroso puede ser reoxidado por *T. ferrooxidans* para que nuevamente el hierro férrico pueda actuar como agente oxidante.

El azufre elemental, que se forma por reacciones similares a la anterior, es oxidado a ácido sulfúrico por la misma *T. ferrooxidans* y más rápidamente todavía por *T. thiooxidans*:



La rápida producción de ácido por *T. thiooxidans* bajará el pH durante la lixiviación y acelerará el proceso, mejorando además las condiciones ambientales de vida para *T. ferrooxidans*. Adicionalmente, los compuestos metálicos solubles en ácido son extraídos como sulfatos (Ballester et al., 2007).

En la figura 1.7 se representan los mecanismos directo e indirecto de biolixiviación.

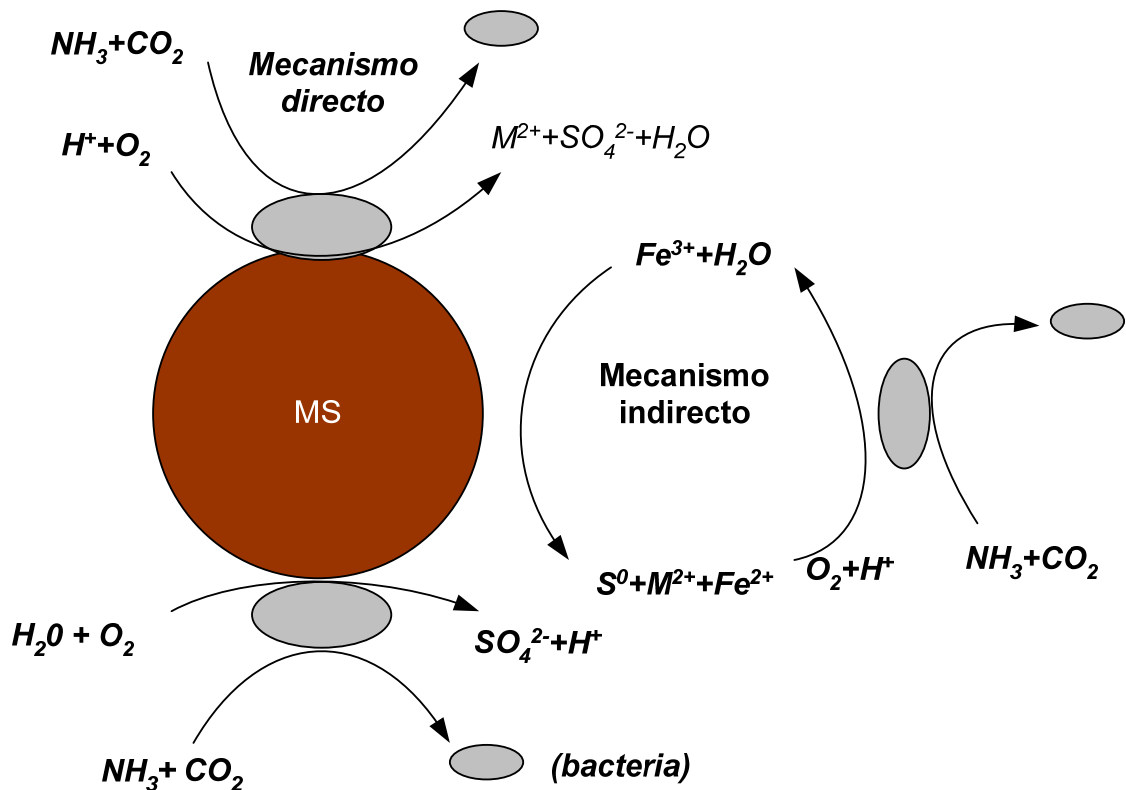


Figura 1.7 Mecanismo directo e indirecto de biolixiviación (Rodríguez, 2000).

#### 1.4.3.3 Propiedades acidofílicas

Los acidófilos extremos, como los microorganismos lixiviantes, crecen a un ambiente con pH bajo (pH 1.0-2.0), mientras el pH interno celular es muy cercano a un valor de pH = 7. Esta diferencia resulta en un gradiente de pH a través de la membrana celular, el cual resulta importante en cuanto a propósitos nutricionales, especialmente cuando se usa un débil agente reductor como el hierro ferroso para actuar como donador de electrones.

Los organismos autótrofos tienen un elevado requerimiento por compuestos como el  $NAD(P)H_2$ , para reducir el  $CO_2$  necesario para la síntesis de azúcares, nucleótidos, aminoácidos y otras moléculas que son la base para



la producción de biomasa celular. Las bacterias quimioautótrofas requieren un elevado gradiente de protones a través de su membrana para generar la fuerza motriz de átomos de hidrógeno para iniciar la síntesis de NAD(P)H<sub>2</sub>.

Este proceso es conocido como transporte reverso de electrones, en soluciones ácidas este proceso es una necesidad nutricional ya que el gradiente de pH transmembrana es requerido para producir los átomos de hidrógeno que son asimilados cuando el CO<sub>2</sub> es reducido a masa celular (Rawlings, 2007). La figura 1.8 demuestra la importancia del gradiente de pH para la subsiguiente reducción del anhídrido carbónico; la concentración alta de protones fuera de la célula sirve como fuerza motora de protones para la síntesis de ATP vía la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> sintasa, esto a la vez facilita el flujo de electrones requerido para la síntesis de NAD(P)H<sub>2</sub>, necesario para la reducción del CO<sub>2</sub> fijado.

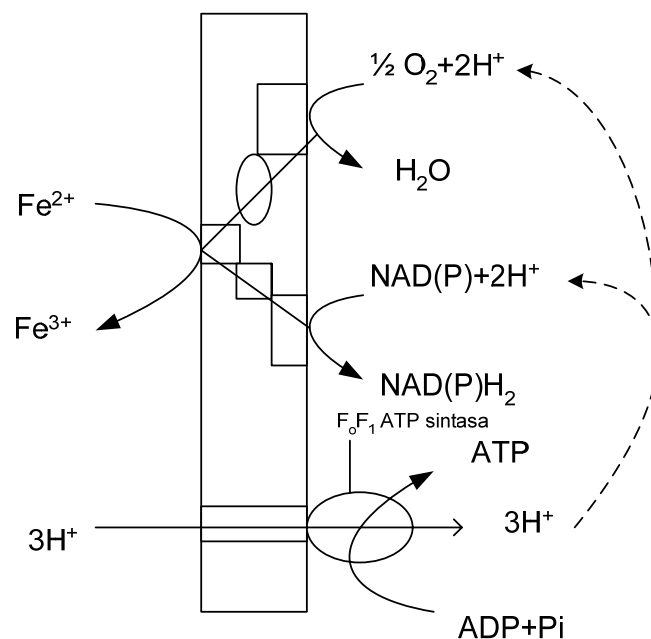


Figura 1.8 Importancia del gradiente de pH en bacterias hierro oxidantes (Rawlings, 2007).

#### **1.4.3.4 Medición de actividad**

Las mediciones de actividad microbiana son de relevancia en ambientes de biolixiviación. Debido a la importancia de las transformaciones redox del hierro y azufre en estos ambientes, las mediciones de los niveles de oxidación y reducción de estos dos elementos son particularmente significativas. La oxidación del hierro es fácilmente desarrollada mediante el monitoreo de cambios en las concentraciones de hierro ferroso, mientras que la oxidación del azufre puede ser determinada mediante medición de los cambios en las concentraciones de sulfato (Johnson, 2007).

#### **1.4.3.5 Cultivo in vitro**

Actualmente, los microorganismos quimioautótrofos hierro oxidantes más conocidos pueden ser cultivados en medios sólidos y líquidos; empero, existe la posibilidad de que los ambientes de biolixiviación contengan una gran variedad de microorganismos pertenecientes a este grupo que no puedan ser cultivados in vitro (Johnson, 2007).

Para el cultivo de organismos quimioautótrofos deben omitirse del medio los compuestos orgánicos y debe usarse CO<sub>2</sub> o bicarbonato como única fuente de carbono. Durante la incubación, los cultivos deben mantenerse bajo condiciones bien aeróbicas o bien anaeróbicas, dependiendo de si el organismo necesite o no oxígeno (Stanier, 2004).

##### **1.4.3.5.1 Medios de cultivo líquido**

Los medios líquidos para el cultivo y enriquecimiento de poblaciones de acidófilos varían en su formulación con el fin de lograr el crecimiento de microorganismos blanco. Para seleccionar por grupos específicos de acidófilos, es importante controlar la temperatura, el pH, y el nivel de oxígeno bajo los cuales los cultivos de enriquecimiento serán incubados. Con el uso adecuado de medios de cultivo de enriquecimiento y de medios sólidos selectivos es posible la selección y aislamiento de la mayoría de microorganismos

relacionados con la oxidación de minerales.

Alternativamente, los cultivos de enriquecimiento pueden ser diluidos varias veces para obtener el microorganismo dominante; la mayor dilución en la que se demuestre crecimiento, es asumida como un cultivo puro del organismo presente en mayor número en el cultivo de enriquecimiento original (Johnson, 2007).

Para obtener un óptimo crecimiento bacteriano, los medios de cultivo deben ser suplementados con amonio y sales de fosfato, calcio, potasio, sodio y magnesio, otros elementos traza son incorporados usualmente como impurezas presentes en los constituyentes del medio. El agua se necesita como medio solvente y además para el transporte de los nutrientes (Domic, 2004).

Las concentraciones necesarias aproximadas de algunos de estos nutrientes vitales se indican en el cuadro 1.6.

Cuadro 1.6 Concentración de algunos elementos críticos para mantener la viabilidad vital de las bacterias quimioautótrofas hierro oxidantes (Domic, 2004).

Sustancia	Concentración (Kg/ton)
Nitrógeno como amonio: $(\text{NH}_4)^+$	2-3
Fósforo como fosfato: $(\text{PO}_4)^{3-}$	0,6-1,0
Sales de potasio	0,8 – 2,0
Sales de magnesio	0,4 – 0,8
Dióxido de carbono como gas disuelto	40-80

Algunos medios de enriquecimiento empleados para el cultivo de microorganismos implicados en procesos de biolixiviación se indican en el cuadro 1.7.

Cuadro 1.7 Composición de algunos medios empleados para el enriquecimiento de microorganismos involucrados en procesos de biolixiviación (Quintero, 2003).

Medio	Composición (g/L)						pH
Shu (Smith y Pateman, 1977)	Glucosa (144.0)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.5)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.87)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0.25)			7,0
Czapek Dox (Raper y Fennell, 1965)	Sacarosa (30.0)	NaNO <sub>3</sub> (5.5)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1.0)	KCl (0.5)	MgSO <sub>4</sub> (0.5)	FeSO <sub>4</sub> (0.01)	7,0
Medio 9K (Silverman y Lundgren, 1959)	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (44.8)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (3.0)	KCl (0.1)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5)	MgSO <sub>4</sub> (0.5)	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0.01)	2,2
Sabauroud (Bencke, 1958)	Glucosa (20.0)	Peptona (1.5)	Ext. Levadura (0.87)	NaCl (0.25)			7,2
Bromfield (Bromfield, 1954)	Sacarosa (100.0)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.5)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1.0)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0.2)	CaCO <sub>3</sub> (5.0)	Ext. Levadura (0.15)	7,0
Medio Nutritivo (Raper y Fennel, 1965)	Peptona (10.0)	Ext. Carne (5.0)	NaCl (5.0)				7,0

#### **1.4.3.5.2 Medios de cultivo sólidos**

El crecimiento de acidófilos hierro oxidantes en medios sólidos fue por muchos años inviable debido a la presencia de materiales tóxicos orgánicos presentes en el medio de cultivo, producto de la hidrólisis ácida del polisacárido presente en el agente gelificante. De igual manera, tanto el agar como la agarosa, ambos agentes gelificantes usados para el cultivo de acidófilos, son inestables a altas temperaturas (sobre los 50°C), por lo que solo han sido utilizados para el cultivo de microorganismos mesófilos y termófilos moderados.

Una técnica para sortear los inconvenientes presentados por la toxicidad y termoestabilidad, es el de hacer crecer a los acidófilos sobre filtros de membrana, así como la inserción de membranas inoculadas de policarbonato en medio líquido de sulfato ferroso (pH = 1.6); las colonias de *T. ferrooxidans* son evidentes después de los cinco días de incubación a 30°C (Johnson, 2007).

#### **1.4.4 Métodos de tratamiento de aguas ácidas**

L. Aguirre (2007) enmarca los principales métodos de tratamiento de efluentes líquidos ácidos de biolixiviación en tratamientos pasivos y tratamientos activos:

##### **a) Tratamientos pasivos:**

Generalmente utilizados en el tratamiento de pequeños volúmenes de aguas ácidas provenientes de la lixiviación natural de minas abandonadas o de escombreras de minerales sulfurados. El tratamiento consiste en hacer fluir los drenajes de mina a través de un humedal o sistemas receptores tales como pantanos, arroyos, ríos o lagos.

Las características tóxicas del vertido disminuyen en forma natural como resultado de la acción de reacciones químicas y biológicas y por dilución con aguas superficiales. Este método tiene como ventaja el reducido costo de

instalaciones y mantenimiento; sin embargo, exige un cuidadoso control para operar bajo las reguladoras ambientales existentes (Instituto Geológico y Minero de España, 2004).

b) Tratamientos activos:

Generalmente utilizados en el tratamiento de grandes volúmenes de efluentes líquidos. Se caracterizan por el uso de reactivos químicos que inhiben la acción bacteriana, por alteración celular de los microorganismos. En otros casos se complementa con reacciones químicas que logran precipitar y separar los aniones y cationes presentes en los vertidos. Los métodos de tratamiento activo se subdividen a su vez en:

- Métodos de inhibición bacteriana

Enfocados exclusivamente en la interrupción de las propiedades oxidantes de los microorganismos, o en otros casos a su destrucción total por la alteración de la pared celular con el uso de reactivos químicos, preferentemente biodegradables y de bajo impacto ambiental. La técnica consiste en aplicar la solución bactericida mediante riego en los lugares donde se generan los pequeños flujos de aguas ácidas, sean en las minas abandonadas o en las escombreras de minerales sulfurados (Instituto Geológico y Minero de España, 2004).

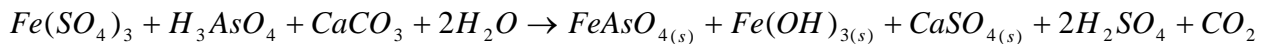
- Tratamientos químicos

En este caso se utilizan reactivos químicos que además de producir la destrucción bacteriana, logran precipitar los aniones y cationes presentes en los efluentes químicos. Éste constituye el método preferido en el tratamiento de grandes volúmenes de vertidos contaminantes provenientes de las plantas industriales de biolixiviación. Dependiendo de las características físicas y químicas de los vertidos contaminantes, se puede utilizar una variedad de reactivos químicos, tales como agentes oxidantes, agentes neutralizantes o agentes de precipitación.

Un caso práctico constituye el proceso BIOX™, que se aplica para vertidos provenientes de plantas de biolixiviación de minerales auríferos refractarios, los cuales se caracterizan por un alto contenido de acidez e iones hierro (III) y arsénico (V). El tratamiento tiene las siguientes etapas:

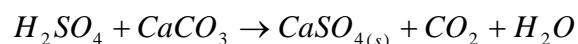
a) Precipitación del arsénico

Con ayuda del carbonato de calcio se logra obtener precipitados tales como arsenato férrico, hidróxido férrico y sulfato de calcio. La reacción requiere intensa agitación y cuidadoso control del pH en un rango de 4 – 5. La reacción producida en esta etapa es:

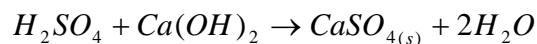


b) Neutralización

Posteriormente, el exceso de ácido sulfúrico se neutraliza con carbonato de calcio o hidróxido de calcio, llegando a precipitar el sulfato de calcio. La reacción requiere una intensa agitación y el mantenimiento de un rango de pH de 7 - 8. Las reacciones producidas en esta etapa son:



o



El proceso BIOX™ tiene buena efectividad, ya que logra eliminar la presencia de la acidez, el arsénico y el resto de iones de metales pesados mediante la formación de precipitados que serán separados por sedimentación y filtración. Estos precipitados de metales pesados se denominan “lodos de características tóxicas peligrosas”, y la única forma de almacenarlos es en celdas de confinamiento de alta seguridad. Finalmente, el agua ya tratada, por sus características físicas y químicas puede ser reciclada al proceso o

descargada a cualquier cuerpo receptor de aguas, sin que cause impactos negativos al ambiente (Aswegen, Niekerk & Olivier, 2007).

#### **1.4.4.1 Métodos de inhibición bacteriana**

La presencia de bacterias oxidantes del hierro controla fuertemente la formación de aguas ácidas, ya que si esos microorganismos se eliminan se consigue reducir la acidificación en más de un 50% (Instituto Geológico y Minero de España, 2004).

Ciertas sustancias son potencialmente tóxicas para las bacterias quimioautótrofas, tales como: tiocianato y cianuro, bactericidas, fungicidas y agentes para el ablandamiento del agua, petróleo, aceites, grasas, lubricantes, concentraciones de cloruros sobre 7g/L y arsénico a altas concentraciones (Aswegen et al., 2007).

Entre las sustancias químicas más efectivas para inhibir a la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*, se encuentran los surfactantes aniónicos y los ácidos orgánicos (Instituto Geológico y Minero de España, 2004).

##### **1.4.4.1.1 Surfactantes aniónicos y su efecto en los microorganismos**

Los surfactantes son sustancias que presentan actividad en la superficie, reduciendo la tensión superficial del líquido en el que está disuelto o bien la tensión superficial de la interfase si hubiera otra fase presente. Para que una sustancia sea surfactante se requiere que contenga dos grupos: uno polar o hidrófilo y otro no polar o hidrófobo. Los surfactantes aniónicos son aquellos que en solución se ionizan, el grupo hidrófobo queda cargado negativamente; se caracterizan por la existencia en su molécula de cationes orgánicos e inorgánicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{NH}_4^+$  y otros) y una parte hidrofílica que contiene los grupos aniónicos ( $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{O}-\text{PO}_3^{2-}$ , entre otros) unido a la fracción orgánica. Son de importancia por su empleo en la formulación de detergentes de uso doméstico e industrial (Departamento de Física y Química Teórica de la UNAM, 2007).



Los surfactantes aniónicos son comúnmente considerados buenos limpiadores, pero inefectivos como bactericidas; sin embargo, se ha comprobado que éstos son marcadamente más inhibitorios a valores de pH bajos (Kleinmann, 1998).

El modo más común de inhibición de los surfactantes aniónicos en los microorganismos se basa en la alteración que producen en las propiedades semipermeables de la membrana citoplasmática del microorganismo. *T. ferrooxidans* posee una pared celular de múltiples capas, la cual le permite al microorganismo mantener internamente un pH neutro, a pesar del ambiente de extrema acidez en la que vive. A bajas concentraciones, al parecer, los surfactantes aniónicos inducen a la filtración de iones  $H^+$  dentro de la célula, lo cual disminuye la oxidación de  $Fe^{2+}$  mediante el decrecimiento en la actividad de las enzimas sensibles al pH.

Altas concentraciones de surfactante mata a las bacterias, presumiblemente causando daño permanente a estas enzimas y al material de la membrana (Kleinmann, 1998).

#### **1.4.4.1.2 Benzoato de sodio y su efecto en los microorganismos**

El benzoato de sodio se disocia inmediatamente en el agua, formando ácido benzóico en ambientes acuáticos (International Programme on Chemical Safety, 2001).

La manera en que los ácidos orgánicos inhiben el crecimiento de ciertos quimioautótrofos depende de la naturaleza del ácido orgánico, así como de la especie de microorganismo. La toxicidad de algunos ácidos orgánicos de bajo peso molecular que inhiben el crecimiento y el metabolismo, depende de la electronegatividad relativa y de la solubilidad lipídica del ácido dentro de la envoltura celular. La acción inhibitoria de los ácidos orgánicos puede deberse tanto a su influencia en el sistema enzimático de oxidación del hierro o a una desorganización en la envoltura o membrana celular, bloqueando sus funciones. Los ácidos orgánicos retardan la oxidación del hierro y desorganizan

la integridad celular (Gurdeep & Miss ,1988).

#### 1.4.5 Benzoato de sodio

##### 1.4.5.1 Información general

Fórmula estructural

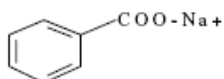


Figura 1.9 Fórmula estructural del benzoato de sodio (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Peso molecular: 144.11

Propiedades fisicoquímicas:

Las propiedades fisicoquímicas del benzoato de sodio se muestran en el cuadro 1.8.

Cuadro 1.8 Propiedades fisicoquímicas del benzoato de sodio (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Apariencia	Punto de fusión	Punto de ebullición a 1013 hPa	Presión de vapor (a 20°C)	Coefficiente de partición octanol/agua	Solubilidad en agua (a 20°C)
Benzoato de Sodio	Sólido blanco	330.6°C	464.9°C	<0.001 hPa	-2.269	556 g/l

Vías metabólicas:

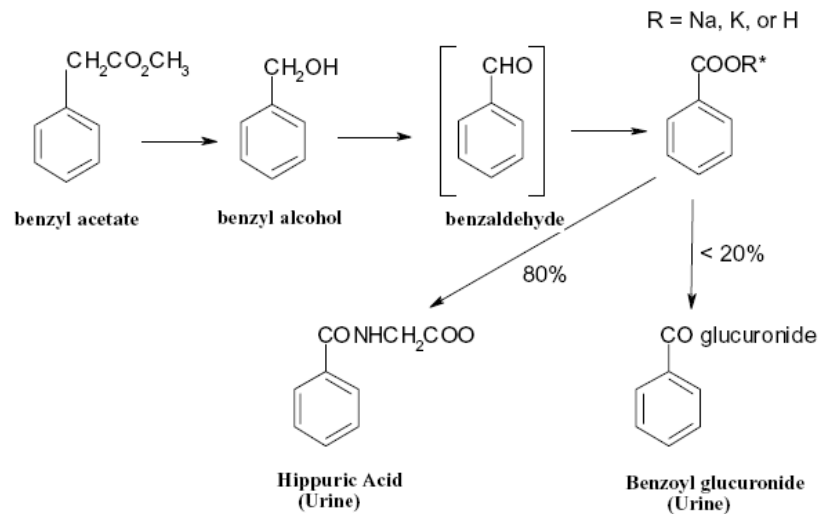


Figura 1.10 Vías metabólicas de benzoatos (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Producción y uso

La capacidad de producción a nivel mundial está estimada en 55.000 a 60.000 toneladas por año. El mayor uso del benzoato de sodio es como agente preservante en alimentos y bebidas (60%). El segundo más importante es en la refrigeración de líquidos (10%). La función principal del benzoato de sodio se la da como preservante (International Programme on Chemical Safety, 2001).

#### 1.4.5.2 Exposición ambiental y destino

El agua (34.8%-50%) y el suelo (48.4%-64.2%) son los destinos principales para el benzoato de sodio. No se espera que se volatilice hacia la atmósfera (< 1.51%), ni que sea adsorbido por el sedimento (< 0.09 %). Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas y modelos de uso indican que el agua es el principal destino para esta sustancia (International Programme on Chemical Safety, 2001). Los porcentajes de distribución para el benzoato de sodio se muestran en el cuadro 1.9.

Cuadro 1.9 Porcentaje de distribución del benzoato de sodio (International Programme on Chemical Safety, 2001).

<b>Compuesto</b>	<b>Aire</b>	<b>Agua</b>	<b>Suelo</b>	<b>Sedimento</b>
Benzoato de sodio	1.45	45.3	54.6	0.0755

Basándose en su estructura y en reglas de química orgánica (unión en moléculas orgánicas, energía de activación, reactividad, transformaciones, adición, sustitución, eliminación), no se espera hidrólisis a rangos de pH de 4-11. La fotodegradación calculada para benzoatos es del 50% después de 1,3 a 3 días (International Programme on Chemical Safety, 2001).

#### **1.4.5.3 Biodegradación y bioacumulación**

El benzoato de sodio es fácilmente biodegradable (más del 90% después de 28 días) tanto aeróbica como anaeróbicamente. De los resultados de numerosos experimentos de remoción, se conoce que la principal vía para el benzoato de sodio es la mineralización abiótica. El coeficiente de partición octanol/agua indica un bajo potencial de bioacumulación, esto se debe principalmente a la rápida biotransformación y/o excreción del compuesto en la orina de los mamíferos (International Programme on Chemical Safety, 2001).

#### **1.4.5.4 Toxicidad**

##### **Toxicidad oral aguda**

El benzoato de sodio demuestra una muy baja toxicidad oral aguda (International Programme on Chemical Safety, 2001), tal como se muestra en el cuadro 1.10.

Cuadro 1.10 Toxicidad oral aguda del benzoato de sodio (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Especie	Protocolo	Resultado	Referencia
Benzoato de sodio	Rata	Directive 84/449/EEC	LD50 =3140 mg/kg	Loeser, 1977-A; Deuel et al., 1954
	Rata	Otro	LD50 =4070 mg/kg	Smyth & Carpenter, 1948

### Irritación de la piel

No se considera al benzoato de sodio como un irritante de la piel (International Programme on Chemical Safety, 2001), el cuadro 1.11 muestra las pruebas de irritación de la piel con benzoato de sodio que demuestran lo mencionado anteriormente.

Cuadro 1.11 Pruebas de irritación de la piel con benzoato de sodio (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Especie	Protocolo	Resultado	Referencia
Benzoato de sodio	Conejo	OECD Guide-line 404	No hay irritación	RCC NOTOX -study no. 014658
	Conejo	Directive 84/449/EEC	No hay irritación	Loeser, E., 1977-B

### Irritación ocular

El benzoato de sodio es un leve irritante ocular (International Programme on Chemical Safety, 2001), tal y como lo determinan las pruebas de irritación ocular con benzoato de sodio del cuadro 1.12.

Cuadro 1.12 Pruebas de irritación ocular con benzoato de sodio (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Especies	Protocolo	Resultado	Referencia
Benzoato de Sodio	Conejo	Directive 84/449/EEC	No hay irritación	Loeser, E., 1977-B
	Conejo	OECD Guide-line 405	Leve irritación	RCC NOTOX -study no. 014669, 1988

### **Toxicidad de dosis repetidas**

El benzoato de sodio no presenta efectos adversos hasta valores de 1000mg/Kg/día. A dosis mayores se incrementa la mortalidad, se reduce la ganancia del peso y se observan efectos en el hígado y el riñón (International Programme on Chemical Safety, 2001).

### **Toxicidad genética**

Estudios del benzoato de sodio utilizando el test de Ames no demuestran evidencia de mutagenicidad (International Programme on Chemical Safety, 2001).

### **Carcinogenicidad**

El benzoato de sodio no demuestra efectos carcinogénicos (International Programme on Chemical Safety, 2001).

### **Toxicidad en la reproducción**

No existe evidencia de que el benzoato de sodio pueda originar efectos en la reproducción (International Programme on Chemical Safety, 2001).

## Toxicidad en el desarrollo

El benzoato de sodio no exhibe toxicidad en el desarrollo, valores mayores a 500 mg/Kg/día podrían presentar efectos en el desarrollo (International Programme on Chemical Safety, 2001).

## Riesgos para el ambiente

### Efectos acuáticos

#### Toxicidad aguda para peces

El cuadro 1.13 muestra la toxicidad aguda para peces producida por el benzoato de sodio.

Cuadro 1.13 Benzoato de sodio y toxicidad aguda para peces (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Especie	Protocolo	Resultado	Referencia
Benzoato de sodio	<i>Pimephales promelas</i>	EPA OPP 72-1	LC50(96h)=484 mg/l (pH 7.4, flow - through, measured concentrations)	Geiger et al., 1985
	<i>Pimephales Promelas</i>		LC50 (96 h) > 100 mg/l	Ewell et al 1986

#### Toxicidad aguda para invertebrados acuáticos

El cuadro 1.14 muestra la toxicidad aguda para invertebrados acuáticos producida por el benzoato de sodio.

Cuadro 1.14 Benzoato de sodio y toxicidad aguda para invertebrados acuáticos (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Especie	Protocolo	Resultado	Referencia
Benzoato de sodio	<i>Daphnia magna</i>	Otro	EC50(48 h) => 100 mg/l	Ewell et al., 1986

### Toxicidad aguda para plantas acuáticas (algas)

El cuadro 1.15 muestra la toxicidad aguda para plantas acuáticas producida por el benzoato de sodio.

Cuadro 1.15 Benzoato de sodio y toxicidad aguda para plantas acuáticas (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Especie	Protocolo	Resultado	Referencia
Benzoato de sodio	<i>Green algae</i>	ECOSAR	EC50 (96 h) = 478 mg/l	

### Toxicidad aguda para microorganismos (bacterias)

El cuadro 1.16 muestra la toxicidad aguda para microorganismos producida por el benzoato de sodio.

Cuadro 1.16 Benzoato de Sodio y toxicidad aguda para bacterias (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Compuesto	Especies	Protocolo	Resultado	Referencia
Benzoato de sodio	<i>Achromobacter</i>	Otro: static	EC50 (24 h) = > 3000 mg/l	Nikkilae, 1955
	<i>liquefaciens</i> <i>Micrococcus</i> <i>flavus</i>	Otro: static	EC50 (24 h)= >500 mg/l	Nikkilae, 1955



La toxicidad aguda del benzoato de sodio para los niveles tróficos se observa a niveles mayores a 100 mg/l. Bajo condiciones ambientes relevantes, el benzoato de sodio presenta muy baja toxicidad (International Programme on Chemical Safety, 2001).

### **Efectos terrestres**

El benzoato de sodio presenta baja toxicidad sobre ambientes terrestres.

Tomando en cuenta la rápida biodegradabilidad, el bajo potencial de bioacumulación, la baja a moderada toxicidad sobre la mayoría de especies acuáticas y el rápido metabolismo del benzoato de sodio, se considera que éste presenta un mínimo riesgo para los ambientes acuáticos (International Programme on Chemical Safety, 2001).

Mientras que, tomando en cuenta el rápido metabolismo y excreción, la no bioacumulación, la baja toxicidad después de agudas y repetidas exposiciones, la no toxicidad reproductiva, la no genotoxicidad, y la no carcinogenicidad, su bajo nivel de irritación y sus usos controlados, el benzoato de sodio presenta un riesgo mínimo para los humanos (International Programme on Chemical Safety, 2001).

## 1.5 Sistema de hipótesis

El benzoato de sodio es un compuesto orgánico que afecta la estructura bacteriana y, por tanto, la actividad y reproducción de los microorganismos; la aplicación de dosis de benzoato de sodio en muestras de agua residual de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A – en las que proliferan las bacterias hierro oxidantes– conllevaría al cese de las facultades de oxidación microbiana del hierro ferroso.

Por las argumentaciones precedentes se plantea la siguiente hipótesis de investigación: *todos los tratamientos que utilizan benzoato de sodio producen la disminución en la oxidación de  $Fe^{2+}$  en las muestras de agua residual -sometidas a las condiciones experimentales- de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.*

## CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Participantes

El presente trabajo fue ejecutado por el tesista Alberto Alejandro Aguirre Bravo; la fase de muestreo fue desarrollada enteramente en las instalaciones de la planta de biolixiviación con la que cuenta la Empresa Minera Orenas S.A, en la ciudad de Guayaquil. De forma similar, la fase relacionada con las pruebas de inhibición de la actividad bacteriana fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Central del Ecuador, en la ciudad de Quito.

### 2.2 Zona de estudio

La etapa de muestreo se la realizó en la planta de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A, ubicada dentro del parque industrial Pascuales en la ciudad de Guayaquil; las coordenadas geográficas del emplazamiento son: Latitud: 2° 03'54.78" S, Longitud: 79° 57'07.87" O , Altura: 15,24 metros sobre el nivel del mar.

La fase de pruebas de inhibición de la actividad bacteriana fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Central del Ecuador, en la ciudad de Quito, con coordenadas geográficas: Latitud: 0° 11'52.62" S, Longitud: 78° 30' 16.98" O, Altura: 2844 metros sobre el nivel del mar.

### 2.3 Período de tiempo de investigación

El estudio tuvo una duración total de 8 meses, que incluyó investigación bibliográfica, pruebas preliminares, ensayos experimentales y análisis de resultados. El trabajo se inició en el mes de Abril del 2007 y culminó

en el mes de Noviembre del mismo año.

## **2.4 Diseño**

En la investigación de la inhibición de la actividad bacteriana se empleó un diseño experimental DBCA (Diseño de bloques completamente al azar), donde se trabajó con cuatro muestras de agua residual provenientes de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A. A cada muestra se le aplicó 14 tratamientos de inhibición, por cada tratamiento se realizaron 3 repeticiones, y por cada repetición se tomaron 3 observaciones periódicas –cada 3 días durante 6 semanas– de tres variables:  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y pH.

## **2.5 Procedimientos**

### **2.5.1 Material biológico**

El material biológico para el presente estudio constituyó las bacterias hierro oxidantes presentes en las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.

### **2.5.2 Muestreo**

La metodología de muestreo utilizada se basó en la referida por A. Aguirre (2007) para el muestreo de aguas con presencia de microorganismos hierro oxidantes.

A partir del día 24 de Julio de 2007 se colectó una muestra líquida del sitio de descarga de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A dos veces por semana –martes y jueves– durante cuatro semanas consecutivas.

Para la recolección de las muestras se utilizó envases plásticos limpios de 500 ml de capacidad (ver Anexo 6), procurando proporcionar un espacio considerable de aire dentro del recipiente para evitar la pérdida de los

microorganismos; inmediatamente se procedió a tapar los recipientes con sus respectivos empaques y se los almacenó a la sombra y a temperatura ambiente (24°C).

### **2.5.3 Tratamiento y transporte de las muestras colectadas**

Una vez colectadas las dos muestras semanales, éstas se mezclaron con agitación constante –manual– durante 5 minutos dentro de un recipiente plástico de 2 galones de capacidad, luego de lo cual se colocó el respectivo empaque al mismo para mantenerlo cerrado e inmediatamente fue transportado por vía terrestre al Laboratorio de Biotecnología de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Central del Ecuador en Quito.

### **2.5.4 Almacenamiento de muestras en laboratorio**

El recipiente plástico que contenía la mezcla de las dos muestras semanales fue mantenido en el laboratorio a temperatura ambiente (14°C) –ya que estos microorganismos pueden permanecer largos períodos de tiempo a temperatura ambiente sin perder su viabilidad, mientras que su conservación en frío provoca la pérdida de sus capacidades de crecimiento y de biolixiviación (Gómez, 1994) – para continuar con las siguientes etapas de la investigación (ver Anexo 7).

Se realizaron determinaciones de  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y pH de cada una de las muestras que llegaron al laboratorio.

En total se llevaron al laboratorio cuatro muestras de agua residual, resultado del muestreo en la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.

### **2.5.5 Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana**

En esta fase se trabajó con tres inhibidores de la actividad bacteriana, el benzoato de sodio, el texapon –surfactante aniónico de uso común como detergente en la industria ecuatoriana– y el método de tratamiento de aguas ácidas BIOX™ que se basa en el empleo de carbonato de calcio e hidróxido de calcio para precipitar cationes y aniones del agua residual de plantas de biolixiviación. Pese a que el proceso BIOX™ no es considerado un método de inhibición de la actividad bacteriana –ya que los reactivos que utiliza no atacan directamente a los microorganismos, sino que son los efectos que los mismos producen en el medio los que propician la inestabilidad celular–, en esta investigación se lo consideró como tal.

En todo el estudio se aplicaron 5 tratamientos con benzoato de sodio, 5 tratamientos con texapon, 3 tratamientos con el método BIOX™ y un tratamiento control que no contenía dosis alguna de inhibidor o compuesto ajeno a la composición prístina del agua residual colectada.

Todos los ensayos con benzoato de sodio y texapon se llevaron a cabo en frascos plásticos de 100 ml de capacidad, no siendo este el caso de los ensayos con el método BIOX™, en los que se emplearon envases plásticos de 500 ml de capacidad. La razón para la utilización del benzoato de sodio se fundamenta en que este compuesto es un inhibidor bacteriano que actúa en medio ácido y es biodegradable, lo cual facilita el tratamiento a gran escala de las aguas ácidas de minería y al mismo tiempo resulta un producto económico y de fácil adquisición en el mercado ecuatoriano. Tanto el texapon como el método BIOX™ se utilizaron como tratamientos convencionales de tratamiento de aguas ácidas y fundamentalmente para comparar sus efectos en relación con los producidos por el benzoato de sodio sobre la actividad de las bacterias hierro oxidantes presentes en las aguas residuales de la torre de biolixiviación.

### 2.5.5.1 Ensayos de inhibición con benzoato de sodio

Con cada muestra que llegó al laboratorio se procedió de la siguiente forma:

Se adicionó 30 ml de la muestra a 18 envases plásticos de 100 ml usando pipetas volumétricas de 10 ml. Posteriormente, se suplementó a los 30 ml de agua residual dentro de los envases, con diferentes dosis de benzoato de sodio, pesadas previamente en una balanza analítica Mettler Toledo Classic. La tabla 2.1 presenta los tratamientos de benzoato de sodio y las respectivas dosis que se utilizaron.

Tabla 2.1 Tratamientos con benzoato de sodio v dosis correspondientes.

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de benzoato de sodio (gramos) aplicados en 30 ml de agua residual</b>
Tratamiento 1 (Control)	0
Tratamiento 2	0,01
Tratamiento 3	0,02
Tratamiento 4	0,03
Tratamiento 5	0,04
Tratamiento 6	0,05

Una vez suplementados con las dosis específicas de benzoato de sodio, todos los envases fueron sometidos a agitación de 100 rpm –utilizando un agitador orbital Excella E-25 & E-25R– y mantenidos a temperatura de 25,8°C durante seis semanas (ver Anexo 8).

La velocidad de agitación seleccionada se encuentra dentro de los rangos normales de agitación que son utilizados en procesos industriales de biolixiviación que emplean bacterias hierro oxidantes, por tal razón se justifica su empleo, así como por el asegurar mayor superficie de contacto entre el

agente inhibidor y los microorganismos. La temperatura de incubación empleada corresponde a la temperatura media anual del ambiente registrada a la salida de torre de biolixiviación por el personal técnico de la planta de la Empresa Minera Orenas S.A en la ciudad de Guayaquil.

De la muestra líquida presente en cada envase se realizaron determinaciones periódicas –cada 3 días, durante las seis semanas de experimentación– de la concentración de hierro ferroso, hierro férrico y el valor de pH.

El tiempo de determinación de dichas variables –cada tres días– fue establecido en base al conocimiento que las bacterias hierro oxidantes tienen un período de duplicación del orden de 20 a 70 horas (Domic, 2004), por lo tanto el límite de tiempo fijado para las determinaciones analíticas concuerda perfectamente con el tiempo en el que las bacterias sometidas a los ensayos podrían demostrar crecimiento significativo.

La literatura consultada cita algunos estudios sobre inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio –concluyendo su efecto bactericida por sobre los 20 ppm (Gurdeep & Miss, 1988)– tomando como organismo de estudio a *Thiobacillus ferrooxidans*, en crecimiento sobre medios de cultivo sintéticos; no obstante, y a diferencia de dichos estudios, en la presente investigación se trabajó con un número variado de microorganismos hierro oxidantes y con un medio de cultivo –agua residual de la torre de biolixiviación– que contenía partículas minerales sulfuradas, elementos idóneos para el crecimiento de las bacterias hierro oxidantes, tanto por brindar fuente de energía como cierto grado de protección ante agentes inhibitorios. Todos estos antecedentes coaccionaron a optar por el empleo de dosis altamente concentradas de benzoato de sodio.



### **2.5.5.2 Ensayos de inhibición con texapon**

Con cada muestra que llegó al laboratorio se procedió de la siguiente forma:

Se adicionó 30 ml de la muestra a 15 envases plásticos de 100 ml usando pipetas volumétricas de 10 ml. Posteriormente, se suplementó a los 30 ml de agua residual dentro de los envases, con diferentes dosis de texapon, pesadas previamente en una balanza analítica Mettler Toledo Classic. El texapon es una sustancia viscosa de lenta disolución en medio ácido, por esta razón se emplearon varillas de vidrio como complemento para el proceso de pesado.

Las varillas de vidrio, cubiertas con la dosis de texapon, se sumergieron en cada envase que contenía los 30 ml de agua residual; las varillas dentro de los envases fueron sometidas a agitación de 100 rpm durante 30 minutos para lograr la disolución completa del compuesto en el agua residual.

Una vez disuelto el texapon en todos los envases, éstos fueron sometidos a agitación de 100 rpm, utilizando un agitador orbital Excella E-25 & E-25R durante seis semanas y mantenidos a temperatura de 25,8°C (ver Anexo 8).

De la muestra líquida presente en cada envase se realizaron determinaciones periódicas (cada 3 días, durante las seis semanas de experimentación) de la concentración de hierro ferroso, hierro férrico y el valor de pH.

Se utilizan los mismos fundamentos citados en el apartado anterior para justificar el empleo de la velocidad, temperatura, tiempo de toma de muestras y análisis químicos utilizados. La tabla 2.2 presenta los tratamientos de texapon y las respectivas dosis que se utilizaron.

Tabla 2.2 Tratamientos con texapon y dosis correspondientes.

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis de texapon (gramos) aplicados en 30 ml de agua residual</b>
Tratamiento 7	0,01
Tratamiento 8	0,02
Tratamiento 9	0,03
Tratamiento 10	0,04
Tratamiento 11	0,05

Al no existir investigaciones científicas que esclarezcan cuales son las dosis ideales de texapon que inhiben la actividad de bacterias hierro oxidantes, se optó por utilizar las mismas concentraciones empleadas con el benzoato de sodio.

### **2.5.5.3 Ensayos de neutralización BIOX™**

Los ensayos de neutralización BIOX™ se subdividieron en: tratamiento BIOX™ convencional, tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio y tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad.

El tratamiento BIOX™ convencional representa al tratamiento BIOX™ utilizado con frecuencia en plantas de biolixiviación para la neutralización de las aguas ácidas. El tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio fue empleado para comparar sus resultados con los de los otros ensayos BIOX™ y con los que emplearon benzoato de sodio y texapon. De forma similar, el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad fue empleado para comparar sus resultados con los de los otros ensayos BIOX™ y con los que emplearon benzoato de sodio y texapon. A continuación se presenta información detallada de cada tratamiento BIOX™.

### **2.5.5.3.1 Tratamiento BIOX™ convencional**

Con cada muestra que llegó al laboratorio se procedió de la siguiente forma:

Se adicionó 30 ml de la muestra de agua residual a 3 envases plásticos de 500 ml usando pipetas volumétricas de 10 ml. Paralelamente, se utilizaron 3 vasos de precipitados de 250 ml; en cada vaso se mezcló 1,5 gramos de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) con 200 ml de agua potable, luego de lo cual se agregó la mezcla de cada vaso a cada uno de los envases que contenían los 30 ml de muestra de agua residual y se procedió a cerrar los mismos. Se sometió los envases a agitación de 100 rpm durante 30 minutos, tras lo cual se los abrió para permitir la salida del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) producido en la reacción y se los suplementó con 0,5 gramos de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ).

Se sometió nuevamente los envases a agitación de 100 rpm durante 30 minutos y finalmente se los dejó en reposo con el objeto de sedimentar los sólidos suspendidos. El pH de las muestras líquidas, luego del tratamiento de neutralización, oscilaba en un valor = 6.

De la fase líquida presente en cada envase, se realizaron determinaciones periódicas –cada 3 días, durante las seis semanas de experimentación– de la concentración de hierro ferroso, hierro férrico y el valor de pH.

### **2.5.5.3.2 Tratamiento BIOX™ suplementado con Benzoato de Sodio**

Con cada muestra que llegó al laboratorio se procedió de la siguiente forma:

Se adicionó 30 ml de la muestra de agua residual a 3 envases plásticos de 500 ml usando pipetas volumétricas de 10 ml. Paralelamente, se utilizaron 3 vasos de precipitados de 250 ml, en cada vaso se mezcló 1,5 gramos de carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) con 200 ml de agua potable, luego de lo cual se

agregó la mezcla de cada vaso a cada uno de los envases que contenían los 30 ml de muestra de agua residual y se cerró los mismos. Se sometió los envases a agitación de 100 rpm durante 30 minutos, tras lo cual se los abrió para permitir la salida del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) producido en la reacción y se los suplementó con 0,5 gramos de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) y con 0,05 gramos de benzoato de sodio. Se sometió nuevamente los envases a agitación de 100 rpm durante 30 minutos y finalmente se los dejó en reposo con el objeto de sedimentar los sólidos suspendidos. El pH de las muestras líquidas, luego del tratamiento de neutralización, oscilaba en un valor = 6.

De la fase líquida presente en cada envase, se realizaron determinaciones periódicas –cada 3 días, durante las seis semanas de experimentación– de la concentración de hierro ferroso, hierro férrico y el valor de pH.

#### **2.5.5.3.3 Tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad**

Con cada muestra que llegó al laboratorio se procedió de la siguiente forma:

Se adicionó 30 ml de la muestra de agua residual a 3 envases plásticos de 500 ml usando pipetas volumétricas de 10 ml. Paralelamente, se utilizaron 3 vasos de precipitados de 250 ml, en cada vaso se mezcló 1,5 gramos de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) con 200 ml de agua potable, luego de lo cual se agregó la mezcla de cada vaso a cada uno de los envases que contenían los 30 ml de muestra de agua residual y se cerró los mismos. Se sometió los envases a agitación de 100 rpm durante 30 minutos, tras lo cual se los abrió para permitir la salida del dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) producido en la reacción y se los suplementó con 1,5 gramos de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Se sometió nuevamente los envases a agitación de 100 rpm durante 30 minutos y finalmente se los dejó en reposo con el objeto de sedimentar los sólidos suspendidos. El pH de las muestras líquidas, luego del tratamiento de neutralización, oscilaba en un valor = 12.

De la fase líquida presente en cada envase, se realizaron determinaciones periódicas –cada 3 días, durante las seis semanas de experimentación– de la concentración de hierro ferroso, hierro férrico y el valor de pH.

La tabla 2.3 resume todos los tratamientos BIOX™ utilizados en la investigación.

Tabla 2.3 Tratamientos que utilizaron la técnica BIOX™ y sus dosis correspondientes.

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis (gramos) de compuestos utilizados</b>
Tratamiento 12 (BIOX™ convencional)	1,5 g de CaCO <sub>3</sub> + 0,5 g de Ca(OH) <sub>2</sub> + 200 ml de agua potable
Tratamiento 13 (BIOX™ + suplemento de benzoato de sodio)	1,5 g de CaCO <sub>3</sub> + 0,5 g de Ca(OH) <sub>2</sub> + 0,05 g de benzoato de sodio + 200 ml de agua potable
Tratamiento 14 (BIOX™ con elevada alcalinidad)	1,5 g de CaCO <sub>3</sub> + 1,5 g de Ca(OH) <sub>2</sub> + 200 ml de agua potable

### 2.5.6 Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana

El objetivo de esta fase fue la de comprobar que las bacterias hierro oxidantes presentes en las muestras que fueron sometidas a las diferentes dosis o cantidades de inhibidor –tanto benzoato de sodio, texapon y los métodos BIOX™ –, hubieran perdido su capacidad para oxidar Fe<sup>2+</sup>.

Transcurridas las seis semanas de experimentación de los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana, se tomaron volúmenes conocidos de cada una de las muestras contenidas en los envases plásticos, y se las utilizó para inocular medios de cultivo 9K, contenidos en tubos de ensayo (ver Anexo 9). La concentración de inóculo utilizada fue del 1%(volumen/volumen). Este procedimiento se lo realizó por duplicado; también se utilizó controles por

duplicado que utilizaron como inóculo solamente agua destilada estéril (controles blanco) y otros controles que utilizaron como inóculo solamente medio 9K (controles positivo).

La confirmación del crecimiento de las bacterias se realizó visualizando el cambio de coloración del medio de cultivo, de verde claro a rojo intenso, característica indicativa de la oxidación bacteriana del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ .

#### **2.5.6.1 Medio de cultivo**

El medio 9K es continuamente empleado dentro de la planta de la Empresa Minera Orenas S.A para el crecimiento de las bacterias hierro oxidantes que participan en los procesos de biolixiviación (ver Anexo 10) y fue modificado a partir del medio 9K original ideado por Silverman & Lundgren (1958); este medio también fue empleado por el personal técnico de la planta para el aislamiento inicial –a partir de aguas de drenaje ácido de minas en Ponce Enríquez– de los microorganismos hierro oxidantes que intervienen en los procesos de lixiviación dentro de la torre de biolixiviación. La tabla 2.4 detalla la composición del medio 9K que se empleó en los ensayos.

Tabla 2.4 Composición del medio 9K empleado en la investigación.

Compuesto	Fórmula química	Medio	
		Solución A	Solución B
<b>Sulfato de amonio</b>	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0 gramos	-----
<b>Sulfato de magnesio heptahidratado</b>	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 gramos	-----
<b>Fosfato diácido de potasio</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 gramos	-----
<b>Cloruro de potasio</b>	KCl	0.1 gramos	-----
<b>Nitrato de calcio</b>	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.01 gramos	-----
<b>Ácido sulfúrico 10N</b>	$\text{H}_2\text{SO}_4$ (10N)	10 ml	-----
<b>Sulfato ferroso heptahidratado</b>	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-----	44,22 gramos
<b>Agua destilada</b>		690 ml	300 ml

### 2.5.6.2 Condiciones de cultivo

Todos los tubos de ensayo fueron incubados a 37°C por 15 días en incubador estático Memmert (ver Anexo 9). El valor de temperatura utilizado fue seleccionado en base a que fue a ese valor al que las bacterias hierro oxidantes de la torre de biolixiviación fueron aisladas originalmente por el personal técnico de la Empresa Minera Orenas S.A; pruebas preliminares realizadas por el autor y por el personal técnico de la planta confirman el crecimiento de las bacterias hierro oxidantes de la torre de biolixiviación a ese valor de temperatura.

En consecuencia, las condiciones de cultivo empleadas fueron adecuadas para que cualquier microorganismo hierro oxidante de la torre de biolixiviación demuestre sus capacidades hierro oxidantes.

### **2.5.7 Factores estudiados**

Los factores tomados en cuenta para el presente estudio fueron los siguientes: hierro ferroso, hierro férrico, pH y cambios de coloración de los medios de cultivo. Tanto  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y pH se determinaron cada tres días durante seis semanas en todos los envases de experimentación.

Cada día que correspondía a la determinación de estas variables, todos los envases plásticos se pesaban en una balanza analítica Mettler Toledo Classic, la masa de agua que se había evaporado desde la última determinación, fue suplida con agua destilada estéril, luego todos los envases fueron sometidos a agitación de 100 rpm –en agitador orbital Excella E-25 & E-25R– durante 15 minutos, para posteriormente medir el pH de los mismos y luego tomar asépticamente 0,1 ml de las muestras para el respectivo análisis de  $\text{Fe}^{2+}$  y 0,1 ml para su similar de  $\text{Fe}^{3+}$ .

En cuanto a los análisis de coloración de los medios de cultivo, estos se realizaron exclusivamente sobre los medios de cultivo empleados en los ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana.

#### **2.5.7.1 Hierro ferroso**

Las determinaciones de hierro ferroso se realizaron utilizando el mismo procedimiento utilizado por el personal técnico de la planta de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A –basados en el manual de métodos complexométricos de valoración titriplex de E. Merck– para el control de los procesos; la técnica para la determinación de  $\text{Fe}^{2+}$  se basa en la titulación de la muestra con permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ), a continuación se detalla los pasos seguidos para determinar la concentración (ppm) de hierro ferroso en las muestras de experimentación:



1. Tomar 0,1 ml de la muestra.
2. Adicionar 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%.
3. Mezclar.
4. Titular con KMnO<sub>4</sub> 0.01 N hasta que la muestra adquiriera un color rosado.
5. Anotar los mililitros de permanganato de potasio consumidos.
6. Realizar el cálculo respectivo.

**Cálculos:**

$$\text{Concentración } Fe^{2+} \text{ (ppm)} = \frac{\text{Consumo}(ml_{KMnO_4}) \times 1116 \times 50}{10}$$

**2.5.7.2 Hierro férrico**

Las determinaciones de hierro férrico se realizaron utilizando el mismo procedimiento utilizado por el personal técnico de la planta de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A –basados en el manual de métodos complexométricos de valoración titriplex de E. Merck–para el control de los procesos; la técnica para la determinación de Fe<sup>3+</sup> se basa en la titulación de la muestra con EDTA disódico, a continuación se detalla los pasos seguidos para determinar la concentración (ppm) de hierro férrico en las muestras de experimentación:

1. Tomar 0,1 ml de la muestra.
2. Adicionar 1 ml de agua destilada.
3. Mezclar.
4. Asegurar que el pH de la muestra se encuentre dentro de un rango 2 - 3, en caso de no estarlo ajustarlo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N.
5. Adicionar 0,01 ml de solución de ácido 5 sulfosalicílico al 5%.
6. Titular con EDTA disódico 0.1 M hasta que la muestra adquiera una coloración amarilla.
7. Anotar los mililitros de EDTA disódico consumidos.
8. Realizar el cálculo respectivo.

**Cálculos:**  $Concentración\ Fe^{3+}\ (ppm) = Consumo(ml_{EDTA}) \times 50 \times 1117$

### 2.5.7.3 pH

Las determinaciones del valor de pH de las muestras de agua residual se llevaron a cabo con un potenciómetro portátil HANNA instruments – previamente calibrado –, el cual se sumergía dentro de la muestra en el respectivo recipiente antes de extraer los 0,2 ml de las muestras necesarias para las determinaciones de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>. Una vez determinado el valor de pH de una muestra y antes de proceder a la siguiente toma, se limpiaba el potenciómetro con abundante agua bidestilada.

#### **2.5.7.4 Cambios de coloración de los medios de cultivo**

En los ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana se observó algunos cambios de coloración de los medios de cultivo, información que se almacenó para su posterior discusión y análisis.

### **2.6. Análisis de datos**

Los datos obtenidos se tabularon según los tratamientos y repeticiones propuestos, efectuándose un análisis de la varianza (ADEVA) para una distribución de los tratamientos completamente al azar mediante el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System) (SAS, 1990). Se utilizó la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad para la separación de los promedios y determinación de la diferencia estadística entre tratamientos.

## CAPÍTULO III: RESULTADOS

Para un mejor entendimiento de los resultados aquí descritos, la tabla 3.1 resume todos los tratamientos aplicados en el transcurso de la investigación.

Tabla 3.1 Tratamientos aplicados en el transcurso de la investigación.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
1 (Control)	30 ml de muestra (no se aplicó inhibidor)
2	30 ml de muestra + 0.01 g Benzoato de sodio
3	30 ml de muestra + 0.02 g Benzoato de sodio
4	30 ml de muestra + 0.03 g Benzoato de sodio
5	30 ml de muestra + 0.04 g Benzoato de sodio
6	30 ml de muestra + 0.05 g Benzoato de sodio
7	30 ml de muestra + 0.01 g Texapon
8	30 ml de muestra + 0.02 g Texapon
9	30 ml de muestra + 0.03 g Texapon
10	30 ml de muestra + 0.04 g Texapon
11	30 ml de muestra + 0.05 g Texapon
12 (BIOX™ convencional)	30 ml de muestra + 1.5 g CaCO <sub>3</sub> + 0.5 g Ca(OH) <sub>2</sub> + 200 ml de agua potable
13(BIOX™ + Benzoato de sodio)	30 ml de muestra + 1.5 g CaCO <sub>3</sub> + 0.5 g Ca(OH) <sub>2</sub> + 0.05 g Benzoato de sodio + 200 ml de agua potable
14(BIOX™ con elevada alcalinidad)	30 ml de muestra + 1.5 g CaCO <sub>3</sub> + 1.5 g Ca(OH) <sub>2</sub> + 200 ml de agua potable

### 3.1 Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana

Con los datos obtenidos de las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y del pH –tras la aplicación de los 14 tratamientos– durante las seis semanas de experimentación, se realizó el respectivo análisis de la varianza (ADEVA) para cada una de las muestras que intervinieron en la experiencia, los resultados se muestran en la tabla 3.2.

El análisis de la varianza realizado demuestra diferencias significativas entre los tratamientos aplicados sobre cada muestra, esto pone de manifiesto que no es posible considerar que todos los tratamientos aplicados sobre cada muestra presenten similar comportamiento en cuanto a los valores de pH,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  durante la fase experimental. Por estas razones se procedió a someter los datos de cada muestra a la prueba de Tukey al 5% para la determinación de los rangos de significancia.

La prueba de Tukey permite comparar las medias o promedios de los tratamientos durante las 6 semanas de experimentación, agrupando a los tratamientos en rangos de significancia, es decir, en grupos de tratamientos cuyas medias son muy similares y por tanto se puede considerar que todos los tratamientos dentro de un rango o grupo presentan equivalente comportamiento para pH,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ .

Tabla 3.2 Análisis de la varianza (ADEVA) para cada una de las muestras que intervinieron en la experiencia.

**Variable: Fe2+**

F de V.	GL	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
		CM	F.calc	CM	F.calc	CM	F.calc	CM	F.calc
<b>Total</b>	1889	---	----	----	----	---	---	---	---
<b>Tratamientos</b>	13	1574126528	2393.93**	1569904798	2373.49 **	1573063555	2383.10**	572645387	2379.81**
<b>Repeticiones</b>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Error</b>	1874	657550	----	661433	----	660092	----	660828	----

**Variable: Fe3+**

F de V.	GL	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
		CM	F.calc	CM	F.calc	CM	F.calc	CM	F.calc
<b>Total</b>	1889	---	----	----	----	----	----	----	----
<b>Tratamientos</b>	13	7700949026	10281.5**	7700949026	10281.5**	7700949026	10281.5**	7700949026	10281.5**
<b>Repeticiones</b>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Error</b>	1874	749012.87353	---	749012.87353	----	749012.87353	---	749012.87353	---

Variable: pH

F de V.	GL	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
		CM	F.calc	CM	F.calc	CM	F.calc	CM	F.calc
<b>Total</b>	1889	---	----	---	---	---	---	---	----
<b>Tratamientos</b>	13	1078.39793	63622.9**	1077.21587	64281.7**	1073.98593	58335.0**	1069.37024	71398.0**
<b>Repeticiones</b>	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Error</b>	1874	0.01695	----	0.01676	----	0.01841	----	0.01498	----

**F de V** = Fuente de variación

**GL** = grados de libertad

**CM** = Cuadrado medio

**F.calc** = F calculada

### **3.1.1 Hierro ferroso**

#### **3.1.1.1 Muestra 1**

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.3, se identifica como los mejores tratamientos los que utilizan la metodología BIOX™, los mismos que se agrupan dentro de un mismo rango de significancia (f). Los tratamientos que utilizan dosis de benzoato de sodio con un valor de 0.03 a 0.05 gramos también están englobados dentro de un mismo rango de significancia (a) y son considerados idóneos para frenar la oxidación del hierro ferroso.

Los tratamientos que utilizan texapon y los restantes de benzoato de sodio parecen inhibir la oxidación bacteriana del  $\text{Fe}^{2+}$ ; sin embargo, no tan eficientemente como los que utilizan benzoato de sodio con un valor de 0.03 gramos a 0.05 gramos.

Se debe destacar que el tratamiento 1 (control) se encuentra sólo formando un rango de significancia (e) y es evidente que no detiene la oxidación bacteriana del ión ferroso.



Tabla 3.3 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 1 y en donde se determinó la concentración de Fe<sup>2+</sup>.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
5	0.04 g Benzoato de Sodio	8512.67	a
6	0.05 g Benzoato de Sodio	8382.87	a
4	0.03 g Benzoato de Sodio	8219.93	a
3	0.02 g Benzoato de Sodio	7644.00	b
8	0.02 g Texapon	6884.72	c
7	0.01 g Texapon	6829.67	c d
10	0.04 g Texapon	6604.93	c d
11	0.05 g Texapon	6603.27	c d
2	0.01 g Benzoato de Sodio	6588.00	c d
9	0.03 g Texapon	6511.87	d
1	Control	595.20	e
12	BIOX™ convencional	0.00	f
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	0.00	f
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	0.00	f

### 3.1.1.2 Muestra 2

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.4, se identifica como los mejores tratamientos los que utilizan la metodología BIOX™, los mismos que se agrupan dentro de un mismo rango de significancia (g). Los tratamientos que utilizan dosis de benzoato de sodio con un valor de 0.03 a 0.05 gramos también están englobados dentro de un mismo rango de significancia (a) y son considerados idóneos para frenar la oxidación del hierro ferroso.

Los tratamientos que utilizan texapon y los restantes de benzoato de sodio parecen inhibir la oxidación bacteriana del  $\text{Fe}^{2+}$ ; sin embargo, no tan eficientemente como los que utilizan benzoato de sodio con un valor de 0.03 gramos a 0.05 gramos.

Se debe destacar que el tratamiento 1 (control) se encuentra sólo formando un rango de significancia (f) y es evidente que no detiene la oxidación bacteriana del hierro ferroso.

Tabla 3.4 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 2 y en donde se determinó la concentración de  $Fe^{2+}$ .

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
5	0.04 g Benzoato de sodio	8513.80	a
6	0.05 g Benzoato de sodio	8362.73	a
4	0.03 g Benzoato de sodio	8220.73	a
3	0.02 g Benzoato de sodio	7624.13	b
8	0.02 g Texapon	6886.13	c
7	0.01 g Texapon	6847.00	c d
2	0.01 g Benzoato de sodio	6586.20	c d e
11	0.05 g Texapon	6565.80	c d e
10	0.04 g Texapon	6549.13	d e
9	0.03 g Texapon	6511.07	e
1	Control	595.20	f
12	BIOX™ convencional	0.00	g
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	0.00	g
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	0.00	g

### 3.1.1.3 Muestra 3

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.5, se identifica como los mejores tratamientos los que utilizan la metodología BIOX™, los mismos que se agrupan dentro de un mismo rango de significancia (f). Los tratamientos que utilizan dosis de benzoato de sodio con un valor de 0.03 gramos a 0.05 gramos también están englobados dentro de un mismo rango de significancia (a) y son considerados idóneos para frenar la oxidación del hierro ferroso.

Los tratamientos que utilizan texapon y los restantes de benzoato de sodio parecen inhibir la oxidación bacteriana del  $\text{Fe}^{2+}$ ; sin embargo, no tan eficientemente como los que utilizan benzoato de sodio con un valor de 0.03 gramos a 0.05 gramos.

Se debe destacar que el tratamiento 1 (control) se encuentra sólo formando un rango de significancia (e) y es evidente que no detiene la oxidación bacteriana del hierro ferroso.

Tabla 3.5 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 3 y en donde se determinó la concentración de Fe<sup>2+</sup>.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
5	0.04 g Benzoato de sodio	8512.80	a
6	0.05 g Benzoato de sodio	8381.20	a
4	0.03 g Benzoato de sodio	8220.60	a
3	0.02 g Benzoato de sodio	7643.07	b
8	0.02 g Texapon	6922.73	c
7	0.01 g Texapon	6827.20	c d
2	0.01 g Benzoato de sodio	6586.60	d
10	0.04 g Texapon	6567.47	d
11	0.05 g Texapon	6565.40	d
9	0.03 g Texapon	6510.13	d
1	Control	595.20	e
12	BIOX <sup>TM</sup> convencional	0.00	f
13	BIOX <sup>TM</sup> + Benzoato de sodio	0.00	f
14	BIOX <sup>TM</sup> con elevada alcalinidad	0.00	f

#### 3.1.1.4 Muestra 4

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.6, se identifica como los mejores tratamientos los que utilizan la metodología BIOX™, los mismos que se agrupan dentro de un mismo rango de significancia (f). Los tratamientos que utilizan dosis de benzoato de sodio con un valor de 0.03 gramos a 0.05 gramos también están englobados dentro de un mismo rango de significancia (a) y son considerados idóneos para frenar la oxidación del hierro ferroso.

Los tratamientos que utilizan texapon y los restantes de benzoato de sodio parecen inhibir la oxidación bacteriana del  $\text{Fe}^{2+}$ ; sin embargo, no tan eficientemente como los que utilizan benzoato de sodio con un valor de 0.03 gramos a 0.05 gramos.

Se debe destacar que el tratamiento 1 (control) se encuentra sólo formando un rango de significancia (e) y es evidente que no detiene la oxidación bacteriana del hierro ferroso.

Tabla 3.6 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 4 y en donde se determinó la concentración de Fe<sup>2+</sup>.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
5	0.04 g Benzoato de sodio	8513.40	a
6	0.05 g Benzoato de sodio	8383.40	a
4	0.03 g Benzoato de sodio	8220.87	a
3	0.02 g Benzoato de sodio	7643.67	b
8	0.02 g Texapon	6902.13	c
7	0.01 g Texapon	6829.40	c d
10	0.04 g Texapon	6587.13	c d
2	0.01 g Benzoato de sodio	6567.73	d
11	0.05 g Texapon	6564.40	d
9	0.03 g Texapon	6510.13	d
1	Control	595.20	e
12	BIOX™ convencional	0.00	f
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	0.00	f
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	0.00	f

Las figuras 3.1 y 3.2 muestran las concentraciones de hierro ferroso (ppm) durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio, texapon y los métodos BIOX™ en la muestra 1, se obtienen curvas similares para las muestras 2, 3 y 4.

### Fe<sup>2+</sup> durante inhibición de actividad bacteriana con Benzoato de sodio en la muestra 1

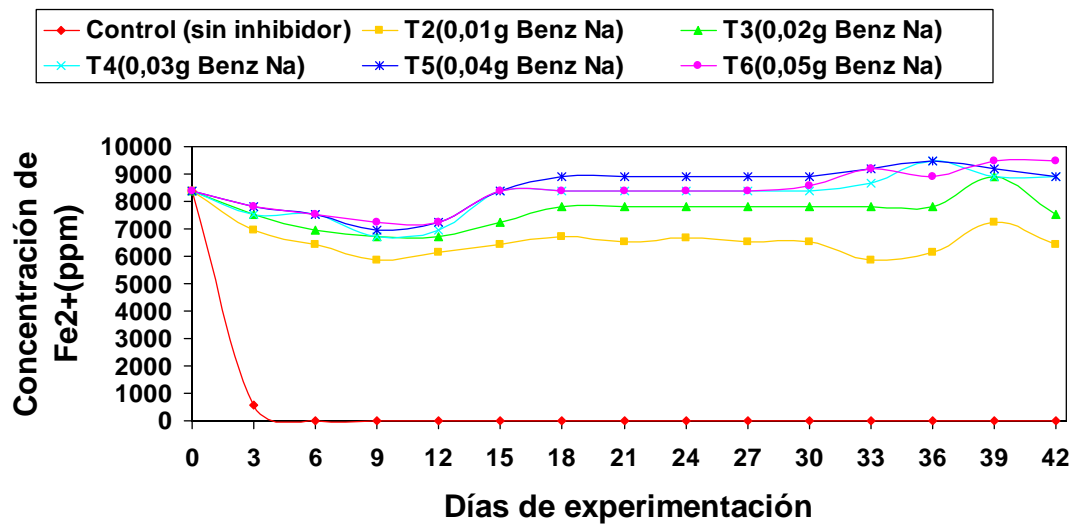


Figura 3.1 Concentraciones de hierro ferroso (ppm) durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio en la muestra 1.



## Fe<sup>2+</sup> durante inhibición de actividad bacteriana con Texapon y métodos BIOX en la muestra 1

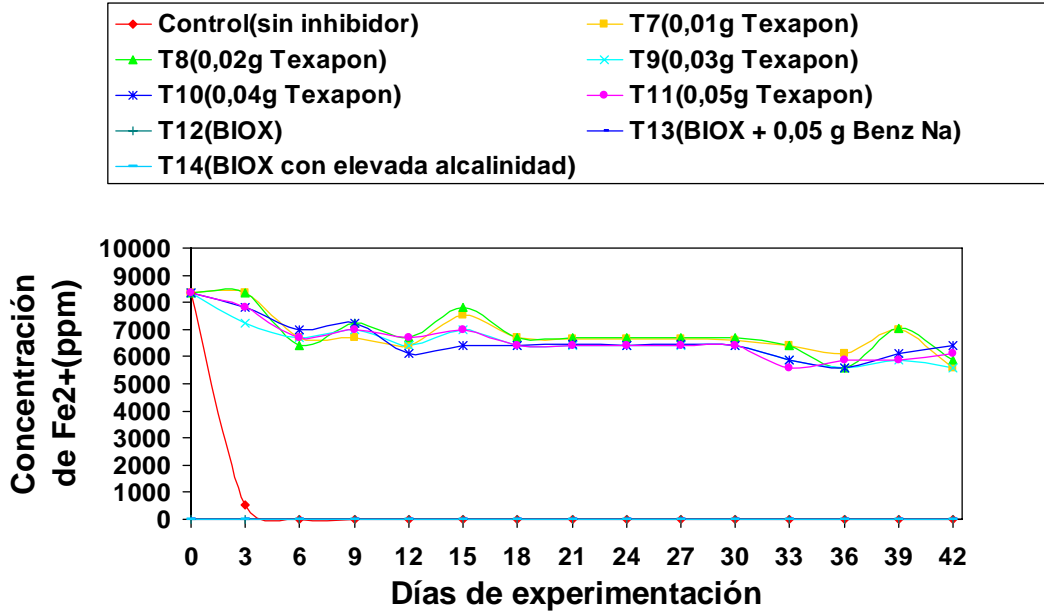


Figura 3.2 Concentraciones de hierro ferroso (ppm) durante la inhibición de la actividad bacteriana con texapon y métodos BIOX<sup>TM</sup> en la muestra 1

### 3.1.2 Hierro férrico

#### 3.1.2.1 Muestra 1

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.7, se observa que todos los tratamientos BIOX<sup>TM</sup>, así como el control –ambos pertenecientes a diferentes rangos de significancia (d y a respectivamente) – son los que demuestran una diferencia evidente en la concentración de Fe<sup>3+</sup> si se los compara con los tratamientos restantes.

Tabla 3.7 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 1 y en donde se determinó la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$ .

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
1	Control	21967.7	a
2	0.01 g Benzoato de sodio	17127.3	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	17127.3	b
8	0.02 g Texapon	17127.3	b
5	0.04 g Benzoato de sodio	17127.3	b
10	0.04 g Texapon	17127.3	b
11	0.05 g Texapon	17127.3	b
4	0.03 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
6	0.05 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
9	0.03 g Texapon	16755.0	c
7	0.01 g Texapon	16755.0	c
12	BIOX™ convencional	0.0	d
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	0.0	d
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	0.0	d

### **3.1.2.2 Muestra 2**

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.8, se observa que todos los tratamientos BIOX™, así como el control –ambos pertenecientes a diferentes rangos de significancia (d y a respectivamente) – son los que demuestran una diferencia evidente en la concentración de Fe<sup>3+</sup> si se los compara con los tratamientos restantes.

Tabla 3.8 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 2 y en donde se determinó la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$ .

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
1	Control	21967.7	a
2	0.01 g Benzoato de sodio	17127.3	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	17127.3	b
8	0.02 g Texapon	17127.3	b
5	0.04 g Benzoato de sodio	17127.3	b
10	0.04 g Texapon	17127.3	b
11	0.05 g Texapon	17127.3	b
4	0.03 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
6	0.05 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
9	0.03 g Texapon	16755.0	c
7	0.01 g Texapon	16755.0	c
12	BIOX™ convencional	0.0	d
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	0.0	d
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	0.0	d

### **3.1.2.3 Muestra 3**

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.9, se observa que todos los tratamientos BIOX™, así como el control –ambos pertenecientes a diferentes rangos de significancia (d y a respectivamente) – son los que demuestran una diferencia evidente en la concentración de Fe<sup>3+</sup> si se los compara con los tratamientos restantes.

Tabla 3.9 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 3 y en donde se determinó la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$ .

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
1	Control	21967.7	a
2	0.01 g Benzoato de sodio	17127.3	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	17127.3	b
8	0.02 g Texapon	17127.3	b
5	0.04 g Benzoato de sodio	17127.3	b
10	0.04 g Texapon	17127.3	b
11	0.05 g Texapon	17127.3	b
4	0.03 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
6	0.05 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
9	0.03 g Texapon	16755.0	c
7	0.01 g Texapon	16755.0	c
12	BIOX™ convencional	0.0	d
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	0.0	d
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	0.0	d

#### **3.1.2.4 Muestra 4**

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.10, se observa que todos los tratamientos BIOX<sup>TM</sup>, así como el control –ambos pertenecientes a diferentes rangos de significancia (d y a respectivamente) – son los que demuestran una diferencia evidente en la concentración de Fe<sup>3+</sup> si los comparamos con los tratamientos restantes.

Tabla 3.10 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 4 y en donde se determinó la concentración de Fe<sup>3+</sup>.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
1	Control	21967.7	a
2	0.01 g Benzoato de sodio	17127.3	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	17127.3	b
8	0.02 g Texapon	17127.3	b
5	0.04 g Benzoato de sodio	17127.3	b
10	0.04 g Texapon	17127.3	b
11	0.05 g Texapon	17127.3	b
4	0.03 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
6	0.05 g Benzoato de sodio	16941.2	b c
9	0.03 g Texapon	16755.0	c
7	0.01 g Texapon	16755.0	c
12	BIOX <sup>TM</sup> convencional	0.0	d
13	BIOX <sup>TM</sup> + Benzoato de sodio	0.0	d
14	BIOX <sup>TM</sup> con elevada alcalinidad	0.0	d



Las figuras 3.3 y 3.4 muestran las concentraciones de hierro férrico (ppm) durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio, texapon y los métodos BIOX™ en la muestra 1, se obtienen curvas similares para las muestras 2, 3 y 4.

### Fe<sup>3+</sup> durante inhibición de actividad bacteriana con Benzoato de sodio en la muestra 1

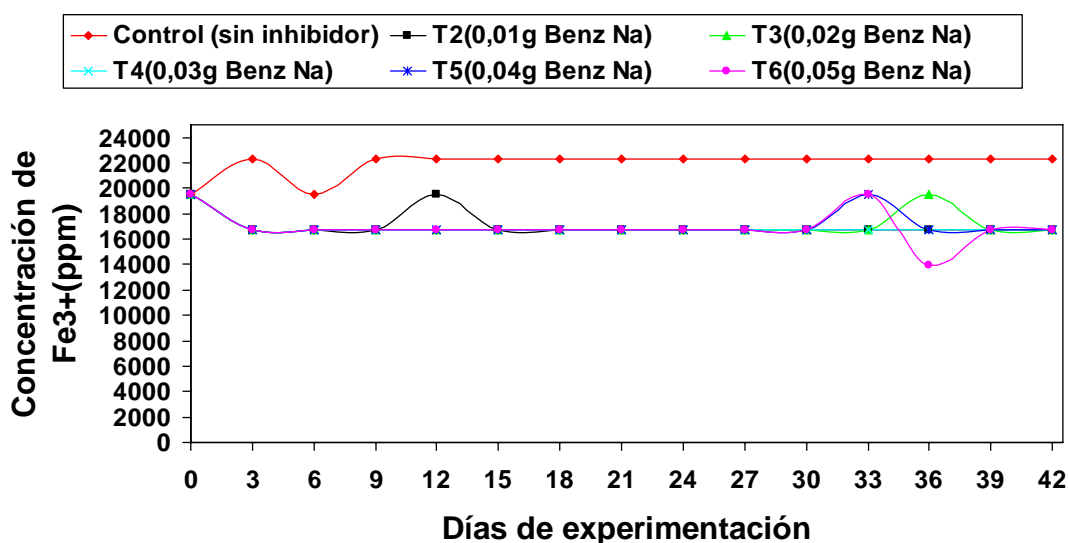


Figura 3.3 Concentraciones de hierro férrico durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio en la muestra 1.

## Fe<sup>3+</sup> durante inhibición de actividad bacteriana con Texapon y métodos BIOX en la muestra 1

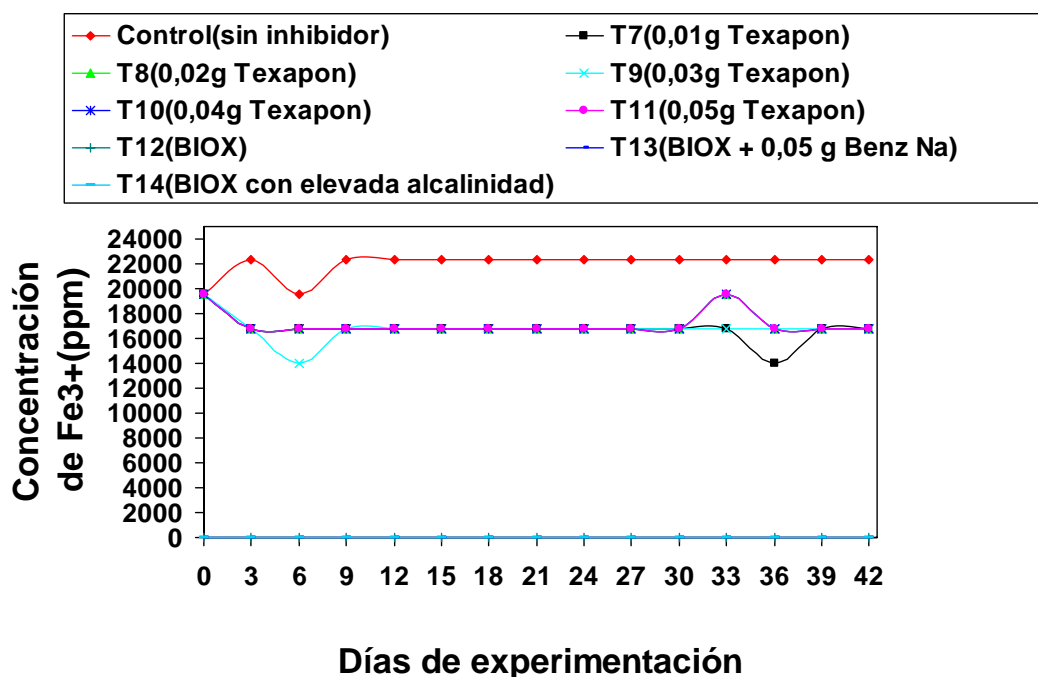


Figura 3.4 Concentraciones de hierro férrico durante la inhibición de la actividad bacteriana con Texapon y métodos BIOX<sup>TM</sup> en la muestra 1.

### 3.1.3 pH

#### 3.1.3.1 Muestra 1

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.11, se aprecia que el tratamiento BIOX<sup>TM</sup> con elevada alcalinidad forma un rango de significancia individual (a) por mantener un valor de pH mucho más elevado que el resto de tratamientos. Los tratamientos BIOX<sup>TM</sup> convencional y BIOX<sup>TM</sup> suplementado con benzoato de sodio se mantienen dentro de un mismo rango de significancia (b) y de igual manera conservan un valor de pH diferente al de los otros tratamientos.

El tratamiento que utiliza 0.02 g de benzoato de sodio pertenece a un único rango de significancia (c) y sus valores de pH son los mayores de entre todos los tratamientos que utilizan tanto benzoato de sodio como texapon.

Mientras, los tratamientos de 0,03 g, 0,04 g y 0,05 g de texapon pertenecen a un único rango de significancia (e) y sus valores de pH son los menores de entre todos los tratamientos utilizados.

Tabla 3.11 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 1 y en donde se determinó el valor de pH.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	11.18667	a
12	BIOX™ convencional	6.02667	b
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	6.01333	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	1.76000	c
4	0.03 g Benzoato de sodio	1.72667	c d
5	0.04 g Benzoato de sodio	1.72667	c d
1	Control	1.72000	c d
2	0.01 g Benzoato de sodio	1.72000	c d
8	0.02 g Texapon	1.69333	d e
7	0.01 g Texapon	1.69333	d e
6	0.05 g Benzoato de sodio	1.68667	d e
9	0.03 g Texapon	1.66667	e
10	0.04 g Texapon	1.66000	e
11	0.05 g Texapon	1.65333	e

### 3.1.3.2 Muestra 2

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.12, se aprecia que el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad forma un rango individual de significancia (a) por mantener un valor de pH mucho más elevado que el resto de tratamientos. Los tratamientos BIOX™ convencional y BIOX™ suplementado con benzoato de sodio se mantienen dentro de un mismo rango de significancia (b) y de igual manera conservan un valor de pH diferente al de los otros tratamientos.

El tratamiento que utiliza 0.02 g de benzoato de sodio pertenece a un único rango de significancia (c) y sus valores de pH son los mayores de entre todos los tratamientos que utilizan tanto benzoato de sodio como texapon. Mientras, los tratamientos de 0,03 g, 0,04 g y 0,05 g de texapon pertenecen a un único rango de significancia (e) y sus valores de pH son los menores de entre todos los tratamientos utilizados.

Tabla 3.12 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 2 y en donde se determinó el valor de pH.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	11.19333	a
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	6.00000	b
12	BIOX™ convencional	6.00000	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	1.76000	c
1	Control	1.72667	c d
4	0.03 g Benzoato de sodio	1.72667	c d
5	0.04 g Benzoato de sodio	1.72667	c d
2	0.01 g Benzoato de sodio	1.72000	c d
8	0.02 g Texapon	1.69333	d e
7	0.01 g Texapon	1.69333	d e
6	0.05 g Benzoato de sodio	1.68000	d e
11	0.05 g Texapon	1.66000	e
9	0.03 g Texapon	1.66000	e
10	0.04 g Texapon	1.65333	e

### 3.1.3.3 Muestra 3

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.13, se aprecia que el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad forma un rango individual de significancia (a) por mantener un valor de pH mucho más elevado que el resto de tratamientos. Los tratamientos BIOX™ convencional y BIOX™ suplementado con benzoato de sodio se mantienen dentro de un mismo rango de significancia (b) y de igual manera conservan un valor de pH diferente al de los otros tratamientos. El tratamiento que utiliza 0.02 g de benzoato de sodio pertenece a un único rango de significancia (c) y sus valores de pH son los mayores de entre todos los tratamientos que utilizan tanto benzoato de sodio como texapon. El tratamiento que utiliza 0,03 g de texapon pertenece a un único rango de significancia (f) y sus valores de pH son los menores de entre todos los tratamientos utilizados.

Tabla 3.13 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 3 y en donde se determinó el valor de pH.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	11.13467	a
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	6.08000	b
12	BIOX™ convencional	6.02667	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	1.76000	c
4	0.03 g Benzoato de sodio	1.72667	c d
5	0.04 g Benzoato de sodio	1.72667	c d
1	Control	1.72000	c d
2	0.01 g Benzoato de sodio	1.71333	c d e
7	0.01 g Texapon	1.70000	d e f
8	0.02 g Texapon	1.69333	d e f
6	0.05 g Benzoato de sodio	1.68667	d e f
11	0.05 g Texapon	1.66000	e f
10	0.04 g Texapon	1.66000	e f
9	0.03 g Texapon	1.65333	f



#### **3.1.3.4 Muestra 4**

Con los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 3.14, se aprecia que el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad forma un rango individual de significancia (a) por mantener un valor de pH mucho más elevado que el resto de tratamientos. Los tratamientos BIOX™ convencional y BIOX™ suplementado con benzoato de sodio se mantienen dentro de un mismo rango de significancia (b) y de igual manera conservan un valor de pH diferente al de los otros tratamientos.

El tratamiento que utiliza 0.02 g de benzoato de sodio pertenece a un único rango de significancia (c) y sus valores de pH son los mayores de entre todos los tratamientos que utilizan tanto benzoato de sodio como texapon. Los tratamientos que utilizan 0,03 g y 0,04 g de texapon pertenecen a un único rango de significancia (f) y sus valores de pH son los menores de entre todos los tratamientos utilizados.

Tabla 3.14 Rangos de significancia con la prueba de Tukey para los tratamientos aplicados sobre la muestra 4 y en donde se determinó el valor de pH.

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO	MEDIA $\bar{x}$	RANGOS DE SIGNIFICANCIA
14	BIOX™ con elevada alcalinidad	11.13333	a
12	BIOX™ convencional	6.02667	b
13	BIOX™ + Benzoato de sodio	6.01333	b
3	0.02 g Benzoato de sodio	1.77333	c
1	Control	1.72667	c d
4	0.03 g Benzoato de sodio	1.72667	c d
5	0.04 g Benzoato de sodio	1.72000	d
2	0.01 g Benzoato de sodio	1.71333	d e
8	0.02 g Texapon	1.69333	d e f
7	0.01 g Texapon	1.69333	d e f
6	0.05 g Benzoato de sodio	1.68000	d e f
11	0.05 g Texapon	1.66667	e f
9	0.03 g Texapon	1.66000	f
10	0.04 g Texapon	1.65333	f

Las figuras 3.5, 3.6 y 3.7 muestran las variaciones del pH durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio, texapon y los métodos BIOX™ en la muestra 1, se obtienen curvas similares para las muestras 2, 3 y 4.

## pH durante inhibición de actividad bacteriana con Benzoato de sodio en la muestra 1

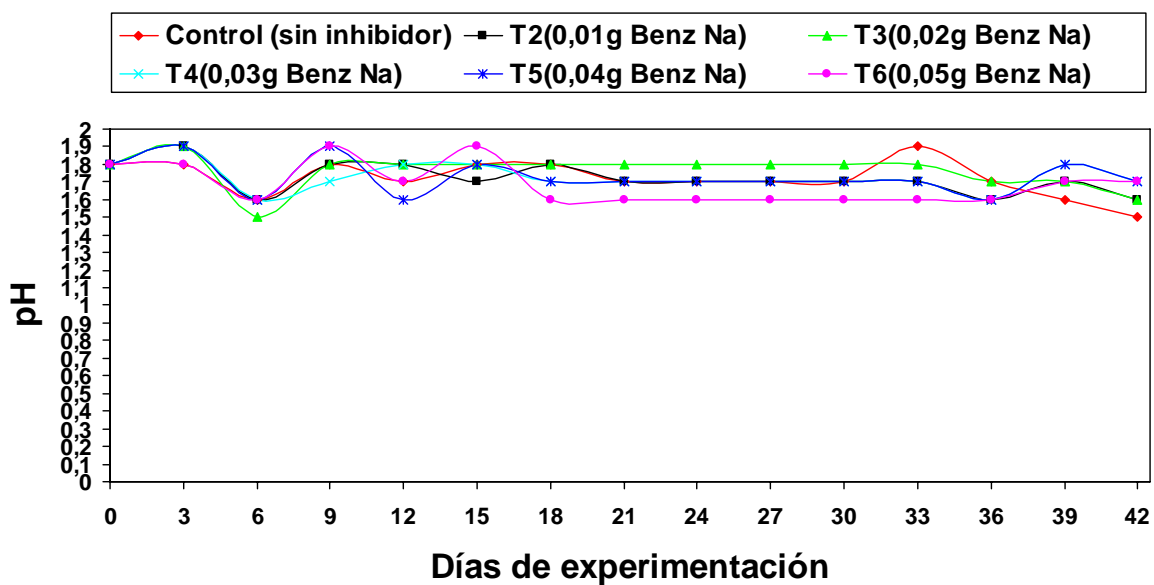


Figura 3.5 Valores de pH durante la inhibición de la actividad bacteriana con benzoato de sodio en la muestra 1.

## pH durante inhibición de actividad bacteriana con métodos BIOX en la muestra 1

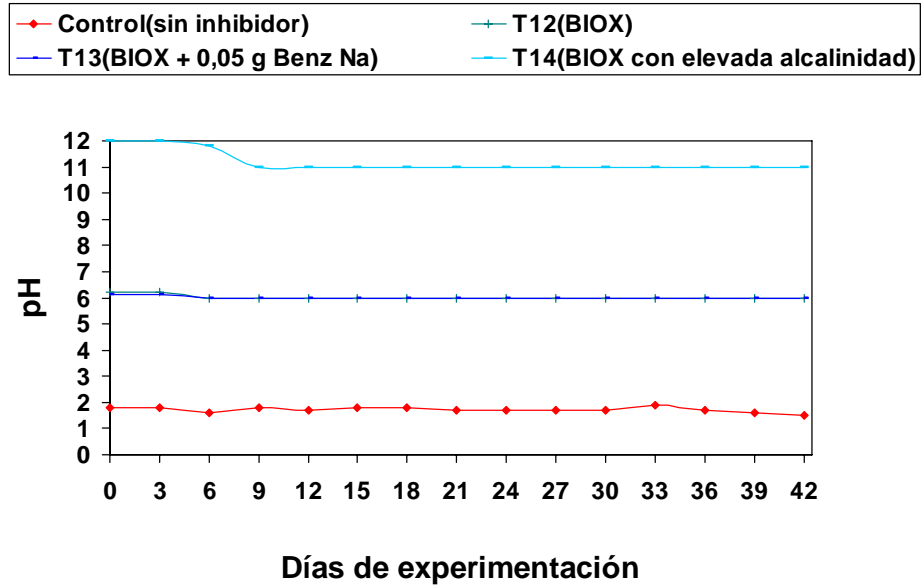


Figura 3.6 Valores de pH durante la inhibición de la actividad bacteriana con métodos BIOX™ en la muestra 1.

## pH durante la inhibición de actividad bacteriana con Texapon en la muestra 1

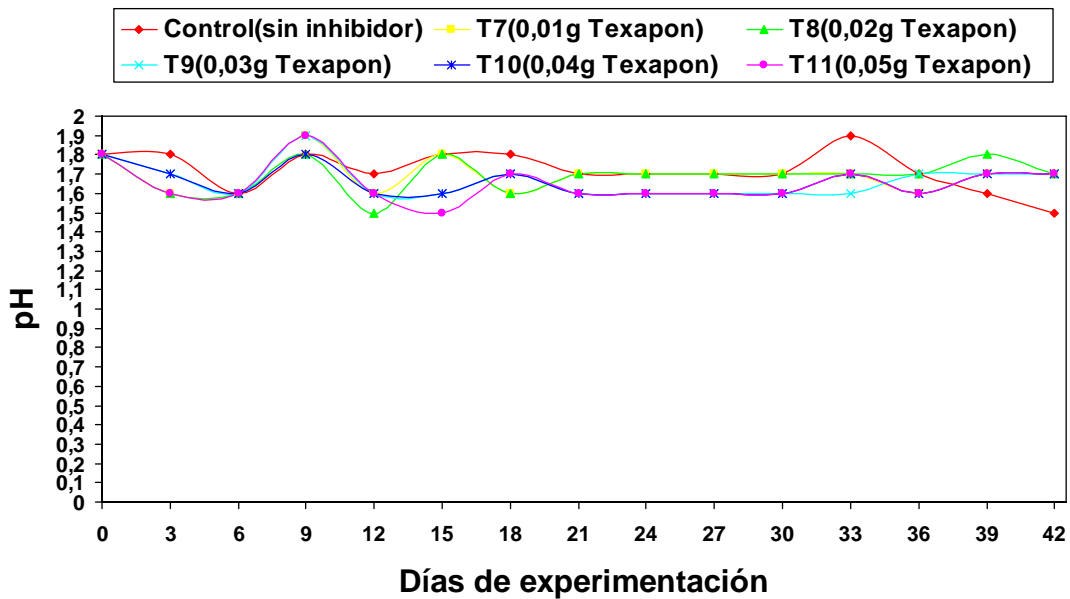


Figura 3.7 Valores de pH durante la inhibición de la actividad bacteriana con texapon en la muestra 1

### 3.2 Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana

Una vez culminados los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana, se dio paso a la ejecución de los ensayos de comprobación de la inhibición de dicha actividad mediante el cultivo de medios 9K inoculados con todas las muestras a las que se aplicó los tratamientos o ensayos de inhibición.

Tras una incubación de 15 días a 37°C, todos los tubos de ensayo que contenían el medio 9K y que fueron inoculados con las muestras provenientes de los tratamientos control –es decir que no contenían inhibidor– presentaron un cambio de coloración, de verde claro a rojo intenso, tal y como se observa en la figura 3.8; este fenómeno, que en realidad es un indicativo de la oxidación del hierro ferroso, da a entender que la actividad hierro oxidante de las bacterias presentes en los controles, se mantiene intacta.



Figura 3.8 Tubo de ensayo correspondiente al tratamiento control.

Todos los tubos de ensayo que contenían el medio 9K y que fueron inoculados con las muestras provenientes de los demás tratamientos – benzoato de sodio, texapon y métodos BIOX<sup>TM</sup>– no presentaron cambio de coloración (ver figuras 3.9 y 3.10), por lo tanto todos los inhibidores que fueron utilizados durante la investigación detienen la actividad hierro oxidante en las muestras de agua residual de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.



Figura 3.9 Tubos de ensayo control (izquierda) y con inhibidor (derecha).



Figura 3.10 Tubos de ensayo control (derecha) y los correspondientes a todos los tratamientos inhibitorios aplicados sobre la muestra 2 (izquierda y atrás).

Los medios contenidos en los tubos de ensayo blanco –que contenían como inóculo solo agua destilada estéril– y en los tubos de ensayo control positivo –que contenían como inóculo medio 9K– no presentaron cambio de coloración tras el período de incubación (ver figura 3.11), por tanto éste comportamiento particular no hace otra cosa que afirmar la ínfima y casi nula participación de la oxidación química en la oxidación de los medios 9K que

fueron inoculados con los tratamientos control y pone en relevancia la participación capital de las bacterias hierro oxidantes en el desarrollo del proceso.



Figura 3.11 Tubos de ensayo control (derecha), blanco (segundo desde la izquierda) y control positivo (primero desde la izquierda).

## CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

### 4.1 Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana

#### 4.1.1 Ensayos de inhibición con benzoato de sodio

Gurdeep & Miss (1988), investigando el efecto de algunos compuestos orgánicos en la inhibición de la oxidación de hierro ferroso por parte de *Thiobacillus ferrooxidans* determinaron que el benzoato de sodio demuestra una eficacia de inhibición mayor al 70% -luego de los 21 días de incubación de los cultivos- con dosis que oscilan entre 10 ppm y 25 ppm del compuesto orgánico, adicionalmente éste actúa como agente bacteriostático a concentraciones menores a 20 ppm y podría presentar efectos bactericidas a concentraciones mayores. Onysko et al., (1984) confirman la inhibición de la oxidación de hierro ferroso en células de *Thiobacillus ferrooxidans* utilizando dosis de ácido benzóico entre 5 mg/litro y 10 mg/litro.

Con estos antecedentes se esperaba que con los tratamientos de benzoato de sodio aplicados se alcanzara la inhibición completa de la actividad de las bacterias hierro oxidantes presentes en las aguas residuales de la torre de biolixiviación. En síntesis de todas las experiencias, todos los tratamientos de benzoato de sodio empleados inhiben la actividad de las bacterias hierro oxidantes, disminuyendo así la oxidación biológica del  $\text{Fe}^{2+}$  en comparación con el tratamiento control, en donde la oxidación biológica provocó que la concentración de hierro ferroso se ubicara en valores cercanos a cero durante la primera semana de experimentación y continuara así todo el tiempo restante que duró el experimento. Aún con el conocimiento de que todos los tratamientos de benzoato de sodio empleados inhiben la actividad bacteriana, descuellan tres tratamientos a ser tomados en cuenta para su aplicación en la inhibición de la actividad bacteriana en las aguas ácidas de la torre de biolixiviación, cuyos valores de  $\text{Fe}^{2+}$  se mantuvieron cercanos al del valor de  $\text{Fe}^{2+}$  inicial de las muestras durante la mayor parte del tiempo de experimentación, estos tratamientos fueron: T4 (0,03 gramos de Benzoato de sodio), T5 (0,04 gramos de Benzoato de sodio) y T6 (0,05 gramos de Benzoato



de sodio).

Las cuatro muestras sometidas a los ensayos de inhibición con los tratamientos de benzoato de sodio (ver Anexo 11) demostraron similar comportamiento en cuanto a sus valores de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y pH a lo largo de las seis semanas de experimentación, por lo que a continuación se analiza de manera global estas variables:

#### **4.1.1.1 Hierro ferroso**

Comparando los valores de las medias –de los tratamientos de benzoato de sodio y el tratamiento control –obtenidas en las tablas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6, se determina que los tratamientos de benzoato de sodio que producen una efectiva inhibición de la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  son los tratamientos 4, 5 y 6, que corresponden a 0,03 gramos; 0,04 gramos y 0,05 gramos de benzoato de sodio respectivamente. Esta afirmación es ostensible cuando se analiza la representación de los tratamientos de benzoato de sodio en la figura 3.1, donde se observa que las curvas que mantienen concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  similares a los valores iniciales de hierro ferroso en el día 0, corresponden a los tratamientos 4, 5 y 6.

Se debe mencionar que en todos estos tratamientos se presenta un ligero aumento de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  durante toda la experimentación; este comportamiento puede entenderse tomando como referencia y base el mecanismo directo de las bacterias hierro oxidantes propuesto por Domic (2004), en el que los microorganismos se adhieren al material mineral suspendido en la muestra y lo oxidan continuamente, incrementando la concentración de los metales en solución, entre ellos el  $\text{Fe}^{2+}$ .

Paralelamente y destacando que todas las muestras presentaban concentraciones de hierro férrico sumamente altas al inicio de la experimentación, es factible que éste compuesto actúe como aceptor de electrones oxidando a las partículas minerales en suspensión, liberando y cooperando para el incremento del hierro ferroso. Ballester et al., (2007)

describen este proceso como la oxidación indirecta que realizan estos microorganismos y no se debe omitir que parte del hierro férrico presente en las muestras proviene de la oxidación biológica del hierro ferroso.

#### **4.1.1.2 Hierro férrico**

Las medias de las tablas 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10 demuestran que las concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  en todos los tratamientos de benzoato de sodio son similares y la figura 3.3 señala que las curvas de todos los tratamientos que utilizan benzoato de sodio se mantienen, durante la mayor parte del tiempo de experimentación, por debajo del valor inicial del valor de  $\text{Fe}^{3+}$  en el día 0.

Este comportamiento singular se manifiesta por la demanda constante de  $\text{Fe}^{3+}$  necesario para oxidar el mineral en suspensión y a la vez por la variedad de reacciones en las que el hierro férrico interviene para formar precipitados metálicos (Aswegen et al., 2007).

#### **4.1.1.3 pH**

Según las tablas 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14, todos los tratamientos que utilizan benzoato de sodio generan cambios similares en el valor del pH de las muestras. La figura 3.5 demuestra que las curvas de los tratamientos con benzoato de sodio tienden a subir y bajar en diferentes intervalos durante el tiempo de experimentación; sin embargo, estos cambios no son drásticos y oscilan en valores de pH cercanos al valor de pH inicial de las muestras en el día 0, es decir 1,8. Estos ligeros cambios de pH pueden estar gobernados por un sinnúmero de reacciones químicas y biológicas dentro de las muestras, pero fundamentalmente por la presencia de amortiguadores a base de fosfato –  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ – y carbonatos que forman parte del material que ingresa dentro de la torre de biolixiviación. La presencia de los amortiguadores a base de fosfato coopera en la resistencia a cambios radicales en la concentración de ión hidrógeno cuando se produce ácido o álcali en el medio, mientras que la presencia de carbonato impide el acumulamiento de iones hidrógeno y por tanto de ácidos libres en el medio (Stanier, 2004).

#### 4.1.2 Ensayos de inhibición con texapon

No existen investigaciones en relación al efecto del surfactante aniónico Texapon sobre la inhibición de la actividad de bacterias hierro oxidantes; empero, existen cuantiosas referencias bibliográficas acerca del uso de otros compuestos tensoactivos, por ejemplo el Sodio Lauril Sulfato (SLS). Ballester et al., (2007) aseveran que el suministrar SLS en forma de solución diluida, con unas concentraciones del orden de 25 ppm sobre la superficie de las escombreras representa uno de los métodos más económicos y eficaces conocidos hasta el momento para inhibir la actividad bacteriana.

Gurdeep & Miss (1988), investigando el efecto de algunos compuestos orgánicos en la inhibición de la oxidación de hierro ferroso por parte de *Thiobacillus ferrooxidans* determinaron que el SLS demuestra una eficacia de inhibición mayor al 70% -luego de los 21 días de incubación de los cultivos- con dosis que oscilan entre 10 ppm y 25 ppm del compuesto orgánico, adicionalmente éste actúa como agente bacteriostático a concentraciones menores a 20 ppm y podría presentar efectos bactericidas a concentraciones mayores. Onysko et al., (1984) confirman la inhibición en la oxidación de hierro ferroso en células de *Thiobacillus ferrooxidans* utilizando dosis de SLS que oscilan entre 5 mg/litro y 10 mg/litro.

En realidad todos estos antecedentes no convidaban a afirmar de forma categórica que los tratamientos con texapon fueran a resultar eficaces para inhibir la actividad bacteriana, por lo que los resultados encontrados en el presente estudio corresponden un hallazgo importante. En definitiva, y tras la culminación de la experimentación, se determinó que todos los tratamientos con texapon empleados inhiben la actividad de las bacterias hierro oxidantes, disminuyendo así la oxidación biológica del  $Fe^{2+}$  en comparación con el tratamiento control, en donde la oxidación biológica provocó que la concentración de hierro ferroso se ubicará en valores cercanos a cero durante la primera semana de experimentación y continuara así todo el tiempo restante que duró el experimento. No obstante, los tratamientos con texapon no logran superar en efectividad de inhibición a los tratamientos 4, 5 y 6 –que

corresponden a 0,03 gramos; 0,04 gramos y 0,05 gramos de benzoato de sodio respectivamente—.

Las cuatro muestras sometidas a los ensayos de inhibición con los tratamientos de texapon (ver Anexo 11) demostraron similar comportamiento en cuanto a sus valores de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y pH a lo largo de las seis semanas de experimentación, por lo que a continuación se analiza de manera global estas variables:

#### **4.1.2.1 Hierro ferroso**

Comparando los valores de las medias —de los tratamientos de Texapon y el tratamiento control —obtenidas en las tablas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6, se determina que ninguno de los tratamientos aplicados de Texapon fueron idóneos para frenar en su totalidad la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , al menos no tan efectivos como lo fueron los tratamientos 4, 5 y 6 de Benzoato de sodio. La figura 3.2 respalda esta apreciación, mostrando que todas las curvas de los tratamientos de Texapon tienden a valores de  $\text{Fe}^{2+}$  menores que los que presentaron en el día 0. Es evidente la existencia de actividad bacteriana; empero, el surfactante aniónico interviene evitando la oxidación completa del hierro ferroso. Es sabido que los surfactantes aniónicos reducen, básicamente, la tensión superficial de la disolución de lixiviación y, al mismo tiempo, el coeficiente de transferencia de materia de oxígeno; además, pueden adsorberse en la interfase sólido-líquido y afectar a las enzimas oxidantes del hierro y del azufre y reaccionar o romper las capas externas protectoras de las bacterias, modificando e impidiendo ciertos procesos nutritivos o de crecimiento (Ballester et al., 2007). Son estas propiedades del Texapon, las que impiden la oxidación completa de  $\text{Fe}^{2+}$ .

#### 4.1.2.2 Hierro férrico

La figura 3.4 hace notorio el comportamiento de las curvas correspondientes a los tratamientos de Texapon, cuyos valores de  $\text{Fe}^{3+}$  se mantienen, durante toda la experimentación, por debajo del valor de  $\text{Fe}^{3+}$  en el día 0. Ya que todos los tratamientos de Texapon provocaron cierto grado de oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , un pensamiento coherente apostaría por predecir que al darse este fenómeno, la concentración de  $\text{Fe}^{3+}$  incrementaría, debido fundamentalmente a que la oxidación biológica del hierro ferroso conlleva a la formación del hierro férrico; no obstante, en este caso las concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  disminuyen. En primera instancia las bacterias oxidaron a  $\text{Fe}^{3+}$  una cantidad considerable de  $\text{Fe}^{2+}$ , poco a poco el efecto del surfactante fue bloqueando la actividad celular y en base a los resultados la alta cantidad de hierro férrico interviene en varias reacciones con la subsiguiente formación de precipitados metálicos, de esta manera las concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  disminuyen mientras las de  $\text{Fe}^{2+}$  permanecen estables.

#### 4.1.2.3 pH

Según las tablas 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14, todos los tratamientos que utilizan Texapon generan cambios similares en el valor del pH de las muestras. La figura 3.7 demuestra que las curvas de los tratamientos con Texapon tienden a subir y bajar en diferentes intervalos durante el tiempo de experimentación; sin embargo, estos cambios no son drásticos y oscilan en valores de pH cercanos al valor de pH inicial de las muestras en el día 0, es decir 1,8. Se utilizan los mismos argumentos utilizados en el análisis y discusión de los valores de pH obtenidos al aplicar los tratamientos de benzoato de sodio, para justificar la tendencia de estos datos.

#### 4.1.3 Ensayos de neutralización BIOX™

Todos los ensayos de neutralización BIOX™ demostraron ser efectivos para suprimir la presencia de hierro férrico y ferroso en solución; sin embargo, el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio es el más recomendable para utilizarse en el tratamiento de las aguas ácidas de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A, en razón de que ofrece similar comportamiento al tratamiento BIOX™ convencional y paralelamente garantiza que los precipitados del proceso puedan generar ácido benzoico si son redisueltos en agua ácida, este concepto será discutido más adelante.

Indiscutiblemente, los ensayos de neutralización BIOX™ de aguas ácidas son métodos muy completos tanto para detener la actividad de las bacterias hierro oxidantes como para neutralizar las aguas ácidas provenientes de procesos industriales mineros. En suma, el método elimina los iones hidrógeno libres en solución– elevando el pH y provocando la ruptura del gradiente de pH que de acuerdo a Rawlings (2007) es requerido por las bacterias hierro oxidantes para la síntesis de NADPH<sub>2</sub> y la posterior reducción del CO<sub>2</sub> – y precipita al hierro ferroso y férrico, resultando en una insuficiencia de donadores de electrones o fuente de energía para los microorganismos hierro oxidantes. Por todo esto, los métodos BIOX™ pueden considerarse una alternativa viable para el tratamiento de las aguas ácidas de la torre de biolixiviación, quizás demostrando ser más eficaces para inhibir la actividad microbiana que el benzoato de sodio y el texapon.

La limitación más relevante de estos métodos radica en el manejo o disposición de los precipitados generados en el proceso, todo lo cual debe estar regido por estrictas normas ambientales, conllevando naturalmente ingentes gastos de dinero en adecuación y equipo necesario para tal propósito (Gurdeep & Miss, 1988).

#### **4.1.3.1 Tratamiento BIOX™ convencional**

Las cuatro muestras sometidas al tratamiento BIOX™ convencional demostraron similar comportamiento en cuanto a sus valores de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y pH a lo largo de las seis semanas de experimentación, por lo que a continuación se analiza de manera global estas variables:

##### **4.1.3.1.1 Hierro ferroso**

Como se observa en las tablas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6, todos los valores de las medias para el tratamiento BIOX™ convencional tienden a un valor de  $\text{Fe}^{2+} = 0$ . De la misma manera, la figura 3.2 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ convencional se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de  $\text{Fe}^{2+} = 0$ . Antes de proceder al análisis, es necesario enfatizar que el tratamiento BIOX™ convencional es un método que genera resultados inmediatos, produciendo la completa desaparición del  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en solución, generando precipitados de hierro (ver Anexo 12 y Anexo 13). Aswegen et al., (2007) afirman que el tratamiento BIOX™ convencional produce el consumo inmediato del hierro férrico y ferroso en solución; por lo tanto los resultados obtenidos en la experimentación concuerdan perfectamente con las argumentaciones brindadas por la literatura consultada.

##### **4.1.3.1.2 Hierro férrico**

Como se observa en las tablas 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ convencional, tienden a un valor de  $\text{Fe}^{3+} = 0$ . De la misma manera, la figura 3.4 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ convencional se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de  $\text{Fe}^{3+} = 0$ . Utilizando los mismos argumentos citados en el epígrafe anterior, los datos de  $\text{Fe}^{3+}$  obtenidos en el transcurso de la experimentación concuerdan perfectamente con las argumentaciones brindadas por la literatura consultada.

#### **4.1.3.1.3 pH**

Como se observa en las tablas 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ convencional, tienden a un valor de pH= 6. De la misma manera, la figura 3.6 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ convencional se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de pH =6. Aswegen et al., (2007) demuestran que al final del tratamiento BIOX™, todo el ácido es neutralizado, por tanto al no existir iones hidrógeno libres en el agua tratada, su valor de pH se mantendrá estable, comportamiento que emulan los datos de pH obtenidos en la investigación con este tipo de tratamiento.

#### **4.1.3.2 Tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio**

Las cuatro muestras sometidas al tratamiento BIOX™ suplementado con 0,05 g de benzoato de sodio demostraron similar comportamiento en cuanto a sus valores de  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y pH a lo largo de las seis semanas de experimentación, por lo que a continuación se analiza de manera global estas variables:

##### **4.1.3.2.1 Hierro ferroso**

Como se observa en las tablas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio, tienden a un valor de  $Fe^{2+}$ = 0. De la misma manera, la figura 3.2 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de  $Fe^{2+}$  =0. Se debe señalar que no existen investigaciones relacionadas a la combinación de los métodos de neutralización BIOX™ y la aplicación de benzoato de sodio, en la presente investigación se lo realizó debido a las conjeturas que Gurdeep & Miss (1988) plantean en relación a que al momento que el benzoato de sodio entra en contacto con aguas ácidas durante la neutralización de las mismas, se forma benzoato férrico, precipitado orgánico que al ser redissuelto en agua ácida libera ácido benzoico, el cual es un agente



inhibitorio para las bacterias; por ello los precipitados generados por el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio (ver Anexo 14) tendrían la ventaja de liberar ácido benzoico, aportando a la inhibición de la actividad bacteriana. Finalmente, los resultados obtenidos determinan que el comportamiento de  $Fe^{2+}$  durante todo el tiempo de experimentación es similar al que se presenta si solo se aplicase el tratamiento BIOX™ convencional.

#### **4.1.3.2.2 Hierro férrico**

Como se observa en las tablas 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio, tienden a un valor de  $Fe^{3+} = 0$ . De la misma manera, la figura 3.4 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de  $Fe^{3+} = 0$ , comprobándose de esta manera que el comportamiento de  $Fe^{3+}$  durante todo el tiempo de experimentación es similar al que se presenta si solo se aplicase el tratamiento BIOX™ convencional.

#### **4.1.3.2.3 pH**

Como se observa en las tablas 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio, tienden a un valor de  $pH = 6$ . De la misma manera, la figura 3.6 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de  $pH = 6$ . Inicialmente se pensó que la adición de benzoato de sodio al medio provocaría un descenso paulatino del pH ya que este compuesto se transforma en ácido benzoico una vez que ha entrado en contacto con medio acuoso (International Programme on Chemical Safety, 2001); no obstante, el valor de pH del medio se mantuvo constante durante todo el tiempo de experimentación y muy similar al que se presenta si solo se aplicase el tratamiento BIOX™ convencional.

#### **4.1.3.3 Tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad**

Las cuatro muestras sometidas al tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad demostraron similar comportamiento en cuanto a sus valores de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y pH a lo largo de las seis semanas de experimentación, por lo que a continuación se analiza de manera global estas variables:

##### **4.1.3.3.1 Hierro ferroso**

Como se observa en las tablas 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad, tienden a un valor de  $\text{Fe}^{2+} = 0$ . De la misma manera, la figura 3.2 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de  $\text{Fe}^{2+} = 0$  debido a la precipitación completa del hierro (ver Anexo 15). Se debe señalar que este tratamiento es una modificación del tratamiento BIOX™ convencional y se implementó para detectar diferencias con el tratamiento convencional, pero los resultados confirman que al menos en el caso del comportamiento de  $\text{Fe}^{2+}$  ambos tratamientos resultan similares.

##### **4.1.3.3.2 Hierro férrico**

Como se observa en las tablas 3.7, 3.8, 3.9 y 3.10, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad, tienden a un valor de  $\text{Fe}^{3+} = 0$ . De la misma manera, la figura 3.4 demuestra que la curva para el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad se encuentra durante todo el tiempo de experimentación en un valor de  $\text{Fe}^{3+} = 0$ . Por lo tanto, se concluye que el comportamiento de  $\text{Fe}^{3+}$  durante todo el tiempo de experimentación es similar al que se presenta si solo se aplicase el tratamiento BIOX™ convencional.

#### **4.1.3.3.3 pH**

Como se observa en las tablas 3.11, 3.12, 3.13 y 3.14, todos los valores de las medias, para el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad, tienden a un valor de pH= 11. La figura 3.6 muestra que la curva para el tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad se encuentra inicialmente en un valor de pH =12 y luego disminuye a un valor de pH=11, al cual se mantiene constante durante el tiempo restante de experimentación. Evidentemente, el comportamiento del pH en este método es diferente al presentado en los demás tratamientos BIOX™ empleados.

#### **4.2 Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana**

Los resultados de esta fase dan a entender que todos los tratamientos en los que se aplicó inhibidor –Benzoato de sodio, Texapon o métodos BIOX™– detienen exitosamente la oxidación del hierro ferroso, cabe realizar algunas aclaraciones al respecto. La metodología usada en esta fase se basó en la misma aplicada para el enriquecimiento y crecimiento óptimo de los microorganismos hierro oxidantes de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A. El medio de cultivo 9K empleado durante esta fase representa un medio líquido selectivo óptimo para el aislamiento de bacterias hierro oxidantes. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que los medios de enriquecimiento líquidos tienden a seleccionar los microorganismos de más elevada tasa de crecimiento entre todos los miembros de la población que se ha introducido y que son capaces de crecer bajo las condiciones suministradas (Stanier, 2004).

Ahora, resulta evidente que todos los inhibidores empleados en la investigación afectaron la tasa de crecimiento de los microorganismos hierro oxidantes de las muestras, no se puede confirmar o rechazar la destrucción total de las células, pero aun así coadyuvaban indirectamente a disminuir la tasa de oxidación del hierro ferroso, lo cual a su vez explica el porque no se presentaron cambios de coloración en los medios de cultivo 9K que fueron

inoculados con muestras de los tratamientos de inhibición.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

1. Todos los tratamientos de benzoato de sodio ensayados inhiben –a temperatura de 25,8°C y agitación de 100 rpm– la actividad de las bacterias hierro oxidantes presentes en las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.
2. Los tratamientos 4, 5 y 6 –correspondientes a 0,03 gramos; 0,04 gramos y 0,05 gramos de benzoato de sodio respectivamente– son los más eficaces para inhibir –a temperatura de 25,8°C y agitación de 100 rpm– la actividad de las bacterias hierro oxidantes presentes en las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.
3. La hipótesis planteada es aceptada, debido a que todos los tratamientos de benzoato de sodio aplicados se ven implicados en la disminución de la oxidación del hierro ferroso presente en las muestras de agua residual de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.
4. Todos los tratamientos de texapon aplicados inhiben –a temperatura de 25,8°C y agitación de 100 rpm– la actividad bacteriana dentro de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.  
Resulta substancial mencionar que ninguno de estos tratamientos fue tan efectivo en relación a la inhibición de las bacterias hierro oxidantes como lo fueron los tratamientos 4, 5 y 6 con benzoato de sodio.
5. Todos los ensayos de neutralización con los tratamientos BIOX™ convencional, BIOX™ suplementado con benzoato de sodio y BIOX™ con elevada alcalinidad, resultan ideales para eliminar instantáneamente el hierro ferroso y férrico en solución y neutralizar los ácidos presentes dentro de las muestras de agua residual.
6. Dentro de todos los ensayos de neutralización, el tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio resulta el más favorable para el tratamiento de las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A por proporcionar un pH aceptable de las aguas después del tratamiento y, adicionalmente, por asegurar una producción continua de ácido benzóico en la fase sólida.

7. Los ensayos de comprobación de la efectividad de las pruebas de inhibición empleadas establecen que todos los tratamientos de inhibición -Benzoato, Texapon- y de neutralización de aguas ácidas-métodos BIOX<sup>TM</sup>- empleados en la investigación cesan la actividad de las bacterias hierro oxidantes presentes en las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A tras seis semanas de interacción del agente inhibitorio y/o de neutralización con las muestras de agua residual.
  
8. Es recomendable el uso del benzoato de sodio como agente inhibidor de la actividad de las bacterias hierro oxidantes tanto para el tratamiento de las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A como para el tratamiento y control de los drenajes ácidos de mina en el Ecuador, tomando en consideración la fácil biodegradabilidad de dicho compuesto orgánico y la mínima afectación que presenta para el ambiente.
  
9. Los inhibidores utilizados son productos químicos amigables con el ambiente, así el benzoato de sodio es utilizado generalmente en la industria alimenticia; el texapon se lo utiliza en la industria de productos de limpieza personal, fabricación de pastas de dientes y shampoo; mientras, el carbonato de calcio y el óxido de calcio son utilizados en el proceso de potabilización del agua.
  
10. Los resultados de la presente investigación son de aplicación universal, es decir, tanto para el tratamiento de aguas ácidas del proceso de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A, así como también en el tratamiento de cualquier agua ácida proveniente de otra región del país o del exterior.

## CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

- Si bien los tratamientos seguidos en el transcurso de esta investigación pueden ser de uso general para el tratamiento de aguas ácidas residuales producto de la lixiviación bacteriana, desde un inicio de la investigación se trató de enfocarlos a la inhibición de la actividad bacteriana hierro oxidante en las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A; por esta razón es aconsejable abordar otros estudios similares dirigidos estrictamente a la prevención y manejo de este tipo de efluentes líquidos que pululan en la áreas de explotación minera del Ecuador.
- Es imperativo el inicio de estudios de biodegradabilidad del benzoato de sodio con las dosis consideradas –por el presente estudio– las más efectivas para inhibir la actividad de las bacterias hierro oxidantes presentes en el agua residual de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.
- Una vez instalada la planta de biolixiviación en el sector minero de Ponce Enríquez, será necesaria una investigación similar a la presente en aquél lugar, que confirme o rechace la existencia de diferencias en cuanto a la efectividad de los tratamientos usados en la presente investigación para inhibir la actividad bacteriana; todo esto permitirá incursionar en la implementación de técnicas de tratamiento in-situ de las aguas residuales de la Empresa Minera Orenas S.A.
- Profundizar en el estudio de tratamientos conjuntos de las aguas residuales de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A, que utilicen tanto técnicas de neutralización de las aguas, por ejemplo el tratamiento BIOX<sup>TM</sup> conjuntamente con la aplicación de las dosis de Benzoato de sodio recomendadas en la presente investigación.

- Iniciar investigaciones referentes al aprovechamiento de las capacidades de algunos microorganismos, tales como la bacteria *Desulphovibrio desulfuricans*, para reducir en un medio anaerobio los sulfatos que transportan los efluentes mineros ácidos produciendo precipitados sulfurosos de los metales disueltos.



## CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

Arrascue, M. (2002). Biolixiviación a nivel industrial. X Encuentro Científico Internacional ECI 2003. Extraído el 8 de Agosto, 2007, de <http://www.cienciaperu.org/eci2003v/res/mly.pdf>.

Aguirre, A. (2007). Aislamiento de microorganismos hierro y azufre oxidantes de la mina “El Cobre” en Santiago de Cuba. Instituto Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.

Aguirre, L. (2007). Tratamiento de efluentes líquidos de biolixiviación. Congreso de Producción Limpia de Arequipa. Arequipa, Perú.

Aswegen, P., Niekerk, J., & Olivier, W. (2007). The BIOX™ process for the treatment of refractory gold concentrates. D.E Rawlings & B.D Johnson (Eds.), Biomining (pp.1-32) New York: Springer.

Ballester, A. (2005). Mecanismos de la biolixiviación. Fernando Acevedo y Juan Carlos Gentina (Eds.), Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras (pp. 9-24). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.

Ballester, A., Verdeja, L., y Sancho, J. (2007). Metalurgia extractiva. Madrid: Síntesis.

Departamento de Física y Química Teórica. (2007). Surfactantes y su aplicación industrial. UNAM. Extraído el 8 de Agosto, 2007, de <http://depa.pquim.unam.mx/fqangeles/fisicoquimica/series/ATASerieUII.PDF>

Domic, E. (2004). Hidrometalurgia: fundamentos, procesos y aplicaciones. Madrid: Dosat.

European Commission of Energy. (2003). Alternative options for passive treatment systems of acid coal mine drainage.

Gómez, E. (1994). Aislamiento y caracterización de microorganismos de aguas de minas: aplicación a la lixiviación de sulfuros complejos polimetálicos. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid.

Gurdeep, S., & Miss, M. (1988). Inhibition of bacterial activity in acid mine drainage. *International Journal of Mine Water*. **7**: 13-26.

International Programme on Chemical Safety. (2001). Benzoates. Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations.

Instituto Geológico y Minero de España. (2004) Manual de restauración de terrenos y evaluación de impactos ambientales en minería. Madrid: Estudios y proyectos mineros S.A.

Johnson, D., & Hallberg, K. (2007). Techniques for Detecting and Identifying Acidophilic Mineral-Oxidizing Microorganisms. D.E Rawlings & B.D Johnson (Eds.), Biomining (pp.237-257) New York: Springer.

Kleinmann, R. (1998). Bactericidal control of acidic drainage. Capt 15. Coal Mine Drainage Prediction and Pollution Prevention in Pennsylvania. The Pennsylvania Department of Environmental Protection.

López, P. (2002). Tratamientos pasivos de drenajes ácidos de mina: estado actual y perspectivas de futuro. Boletín Geológico y Minero, **113 (1)**: 3-21.

Lorber, K. (1997). Contaminated Sites and the Mining Industry. Institute for sustainable waste management and technology.

Merck, E. (1986). Métodos complexométricos de valoración con titriplex. Valencia: Rústica.

Mishra, D. (2004). Bacterial Leaching of Metals from Sulfide minerals and Industrial Wastes. Applied and Environmental Microbiology. **74**: 1019-1024.

Muñoz, J. (2005). Estudio realizado a dos muestras líquidas recogidas en la mina "El Cobre" en Santiago de Cuba. Universidad Complutense. Madrid.

Onysko, S., Kleinmann, R., & Erickson, P. (1984). Ferrous Iron Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: Inhibition with Benzoic Acid, Sorbic Acid, and Sodium Lauryl Sulfate. Applied and Environmental Microbiology. **48**: 229-231.

Quintero, D. (2003). Biolixiviación de aluminio y hierro presente en bauxita gibbsítica usando cepas heterótrofas indígenas. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Venezuela.

Rawlings, D. (1997). Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes.

Rawlings, D. (2007). Relevance of Cell Physiology and Genetic Adaptability of Biomining Microorganisms to Industrial Processes. D.E Rawlings & B.D Johnson (Eds.), Biomining (pp.177-195) New York: Springer.

Rodríguez, Y. (2000). Contribución al estudio del mecanismo de biolixiviación de distintos sulfuros metálicos con bacterias mesófilas y termófilas. Trabajo de grado. Universidad Complutense. Madrid

Sánchez, L. (1999). Drenaje de minas a cielo abierto. II Curso Internacional de Aspectos Geológicos de Protección Ambiental. Capítulo 16. Sao Paulo.

SAS Institute. (1990). The SAS system for Windows. Version 8.2. SAS Inst., Cary, NC.

Silverman, M., & Lundgren, D. (1958). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium ferrobacillus ferrooxidans: an improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*. **77**: 642-647.

Soriano, J. (2004). Aprovechamiento de drenajes ácidos de minas: aplicación a la agricultura. Instituto Geológico y Minero de España. Madrid.

Stanier, R. (2004). Microbiología. Capítulo II. Barcelona: Reverte.

Suzuki, I. (2001). Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnology Advances*. **19**: 119:132.

# ANEXOS

## Anexo 1

Materiales involucrados en el proceso de biolixiviación dentro de la Empresa  
Minera Orenas S.A



Concentrados de flotación.



Material pétreo acondicionado antes de entrar a la torre de biolixiviación.

## Anexo 2

### Planta de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A



Torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.

### Anexo 3

#### Torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A



Vista de la parte superior de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A.



## Anexo 4

Minerales auríferos involucrados en el proceso de biolixiviación en la Empresa  
Minera Orenas S.A



Mineral aurífero refractario proveniente de mina.



Mineral aurífero refractario después del proceso de biolixiviación.

## Anexo 5

Descargas líquidas de la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A



Agua residual de la torre de biolixiviación.

## Anexo 6

### Muestreo en la torre de biolixiviación



Toma de muestra del sitio de descarga de la torre de biolixiviación.

## Anexo 7

### Ensayos de inhibición de la actividad bacteriana



Muestra de agua residual en el laboratorio.



Preparación de muestras antes de ser suplementadas con benzoato de sodio y/o texapon.

## Anexo 8

### Muestras durante los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana



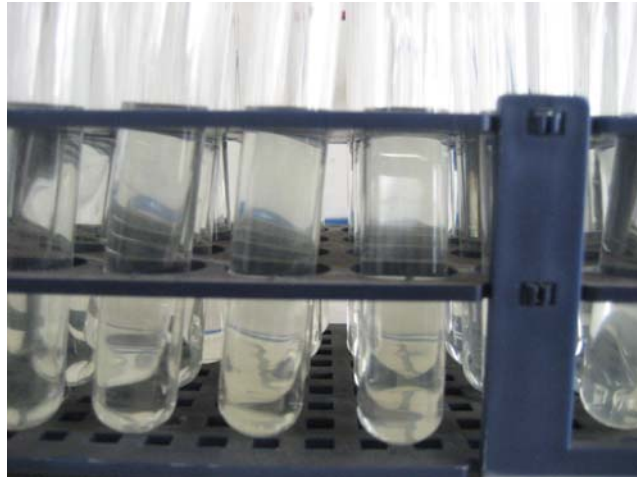
Disposición de muestras dentro del agitador orbital.



Muestras de agua residual dentro de agitador orbital durante los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana.

## Anexo 9

### Ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana



Tubos de ensayo con medio 9K tras inoculación con muestras provenientes de la fase de inhibición de la actividad bacteriana.



Tubos de ensayo en incubador estático durante los ensayos de comprobación de la inhibición de la actividad bacteriana.

## Anexo 10

### Adición de nutrimentos en la torre de biolixiviación de la Empresa Minera Orenas S.A



Adición de medio 9K a la torre de biolixiviación.

## Anexo 11

### Resultados de los ensayos de inhibición de la actividad bacteriana



Muestras de agua residual luego de ser sometidas a tratamientos con benzoato de sodio.



Muestras de agua residual luego de ser sometidas a tratamientos con texapon.



## Anexo 12

### Tratamiento BIOX™ convencional



Agua residual tratada mediante tratamiento BIOX™ convencional, se evidencia la presencia de una fase sólida (precipitados) en la parte inferior del envase.

## Anexo 13

### Fase sólida del tratamiento BIOX™ convencional



Precipitados provenientes del tratamiento BIOX™ convencional de las muestras de agua residual de la torre de biolixiviación.

## Anexo 14

Tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio



Agua residual tratada mediante tratamiento BIOX™ suplementado con benzoato de sodio, se evidencia la presencia de una fase sólida (precipitados) en la parte inferior del envase.

## Anexo 15

### Tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad



Agua residual tratada mediante tratamiento BIOX™ con elevada alcalinidad, se evidencia la presencia de una fase sólida (precipitados) en la parte inferior del envase.







