

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



* 5 3 0 9 5 5 3 4 0 7 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
MICROORGANISMOS DE AGUAS DE MINAS:
APLICACIÓN A LA LIXIVIACIÓN DE
SULFUROS COMPLEJOS POLIMETÁLICOS**

Memoria que, para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas, presenta EDUARDO GÓMEZ RODRÍGUEZ

DIRECTORES:

**Dr. ANTONIO BALLESTER PÉREZ
Dra. IRMA MARÍN PALMA**

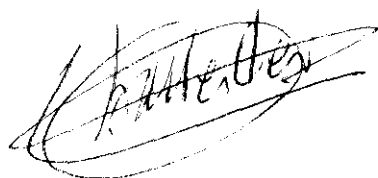
Madrid, 1994

Antonio Ballester Pérez, catedrático del Dto. de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de C.C. Químicas de la Universidad Complutense de Madrid e Irma Marín Palma, profesora ayudante L.R.U. del Dto. de Biología Molecular de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid.

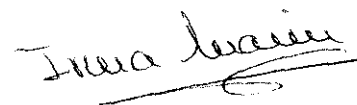
CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE AGUAS DE MINA: APLICACIÓN A LA LIXIVIACIÓN DE SULFUROS COMPLEJOS POLIMETÁLICOS" ha sido realizado en los laboratorios del Dto. de Ciencia de Materiales y del Centro de Biología Molecular por Eduardo Gómez Rodríguez y constituye su Memoria de Tesis Doctoral.

Madrid, Febrero de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Ballester', enclosed within a large, loopy circular scribble.

Fdo. Antonio Ballester Pérez

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Irma Marín', with a horizontal line underneath.

Fdo. Irma Marín Palma

"Pero no hay nada tan dulce como habitar los excelsos templos que la doctrina de los sabios ha edificado, y desde allí poder contemplar a los hombres y ver cómo se extravían por doquier y buscan errantes el camino de la vida."

(Lucrecio 2, 7)

A mi abuelo, y a mis hermanos,
Ana, Javi, Chuni y Cris

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Dto. de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.C.M y del Centro de Biología Molecular (C.S.I.C.-U.A.M.). Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las personas que lo han hecho posible:

A mis padres, que siempre me han animado y ayudado de todas las formas posibles para que pudiera llegar hasta aquí.

A mis directores, los Dres. Antonio Ballester e Irma Marín y al Dr. Ricardo Amils, por iniciarme en el apasionante mundo de la investigación y muy especialmente por su apoyo continuo a lo largo de todo el trabajo.

A las Dras. María Luisa Blazquez y Felisa González, por sus consejos y ayuda durante la realización de la Tesis.

A mis compañeras/os de trabajo en los laboratorios del C.B.M. y del Dto. de Ciencia de Materiales por su ayuda y amistad.

A Uge, por sus consejos filológico-lingüísticos y a Javi, por salirse del "Buscaminas" siempre que he necesitado trabajar. A los dos, los buenos momentos que hemos pasado en casa en estos años.

A todos los amigos, que de una forma u otra me han ayudado a terminar el trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. FAJA PIRÍTICA IBÉRICA	2
1.2. MINAS DE RÍO TINTO	2
1.3. BIOLIXIVIACIÓN	4
1.3.1. Métodos de biolixiviación	5
1.3.2. Ventajas y desventajas de la biolixiviación	6
1.3.3. Perspectivas futuras	8
1.3.4. Microorganismos implicados en los procesos de biolixiviación	9
<i>Microorganismos termófilos</i>	12
1.3.5. Metabolismo de los microorganismos biolixiviadores	13
1.3.6. Mecanismos de acción bacteriana	16
<i>Lixiviación directa</i>	17
<i>Lixiviación indirecta</i>	19
1.3.7. Factores que afectan a la actividad microbiana	20
2. OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS	27
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO	28
3.2.1. Microorganismos utilizados	28
3.2.2. Medios de cultivo líquidos	29
3.2.3. Medios de cultivo sólidos	31
3.3. MATERIAS PRIMAS MINERALES	33
3.4. ESTERILIZACIÓN	34
3.5. ENRIQUECIMIENTO DE LOS CULTIVOS	35
3.6. AISLAMIENTO	35
3.7. MICROSCOPIA ÓPTICA	36
3.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	37
3.8.1. Microscopía electrónica de transmisión	37
3.8.2. Microscopía electrónica de barrido	37

3.9. TOXICIDAD DE CATIONES METÁLICOS	38
3.10. INHIBICIÓN POR ANTIBIÓTICOS	38
3.11. EFECTO DE LAS SALES DEL MEDIO 9K	39
3.12. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN BASES	39
3.13. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA	39
3.14. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS	39
3.15. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE DNA INTACTO	41
3.15.1. Digestión del DNA en agarosa	41
3.15.2. Condiciones de carrera	42
3.16. ENSAYOS DE BIOLIXIVIACIÓN	43
3.16.1. Adaptación de los cultivos	43
3.16.2. Condiciones de experimentación	44
3.17. DETERMINACIÓN DE METALES EN LAS SOLUCIONES	45
3.18. DIFRACCIÓN DE RAYOS X	46
3.19. ENSAYOS DE ADHESIÓN DE CÉLULAS AL MINERAL	46
3.20. ESTUDIO DE PROBETAS	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	50
4.1.1. Muestras de partida	50
4.1.2. Enriquecimiento de las muestras	51
4.1.3. Aislamiento de bacterias	53
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS	55
4.2.1. Caracterización morfológica	55
4.2.2. Caracterización fisiológica	57
<i>Agitación del cultivo</i>	57
<i>Fuentes de energía</i>	58
<i>Medio óptimo</i>	59
<i>pH inicial</i>	59
<i>Temperatura óptima</i>	60
<i>Inhibición del crecimiento por antibióticos</i>	61
<i>Toxicidad de cationes metálicos</i>	63

<i>Utilización de sulfuros minerales puros</i>	65
<i>Utilización de sulfuros minerales naturales</i>	66
<i>Efecto de los constituyentes del medio nutriente 9K sobre el crecimiento bacteriano</i>	68
<i>Almacenamiento y mantenimiento de los cultivo puros</i>	69
4.2.3. Pruebas bioquímicas	70
<i>Lípidos de membrana</i>	70
<i>Contenido en bases</i>	71
4.3. ESTUDIO GENÉTICO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS	72
4.4. INMUNOLOGÍA	76
4.5. ADHESIÓN DE CÉLULAS A LAS PARTÍCULAS DE MINERAL	81
4.6. ENSAYOS DE BIOLIXIVIACIÓN	89
4.6.1. Cinética de la biolixiviación en presencia de TMRT	89
<i>Elección de la densidad de pulpa de trabajo</i>	89
<i>Influencia del tipo de concentrado mineral</i>	90
<i>Influencia de la adaptación de los cultivos</i>	94
4.6.2. Estudio de la especificidad de TMRT por los sulfuros de cobre	100
<i>Ensayos con blenda pura</i>	100
<i>Ensayos con probetas masivas de calcopirita</i>	103
4.6.3. Ensayos de evolución de poblaciones a 50°C	107
4.6.4. Cinética de la biolixiviación en presencia de TERT	129
<i>Elección de la densidad de pulpa de trabajo</i>	129
<i>Ensayos cinéticos con TERT</i>	131
4.6.5. Evolución de poblaciones a 68.5°C	138
4.6.6. Biolixiviación a diferentes temperaturas	145
5. CONCLUSIONES	149
6. BIBLIOGRAFÍA	154

INTRODUCCIÓN

1.1. FAJA PIRÍTICA IBÉRICA

La faja pirítica ibérica se encuentra situada al SO de la Península y constituye el geosinclinal Devónico-Carbonífero en el Macizo Hercínico Ibérico. Ocupa una franja de aproximadamente 230 km de largo por 40-60 km de ancho, prolongándose desde la provincia de Sevilla hasta la costa Oeste de Portugal y formando una de las más importantes provincias metalogénicas mundiales con unas reservas del orden de 750 millones de toneladas de sulfuros.

Geográficamente, está situada entre las estribaciones meridionales de Sierra Morena y la depresión terciaria del Guadalquivir. Constituye una unidad geomorfológica bien diferenciada, pues, a excepción de algunas sierras en la parte norte, puede considerarse como una penillanura inclinada hacia el sur y en actual proceso de rejuvenecimiento. Geológicamente, los sedimentos más antiguos datan del Devónico. La zona sufre variaciones a través de los distintos ciclos geológicos hasta llegar al Cuaternario, cuando se produce el *encajonamiento fluvial de la región, donde adquiere su fisonomía actual.*

El área posee un amplio y rico historial, con diversos altibajos en su minería y épocas de escasa o nula actividad, hasta llegar a mediados del siglo pasado cuando la demanda de cobre y azufre por la industria europea provoca un gran resurgimiento y se ponen en explotación la mayoría de las minas hoy conocidas. Actualmente, están en actividad los grupos de Riotinto, Tharsis, La Zarza, Concepción, Herrerías, Lomero-Poyatos, La Joya, San Telmo, Aznalcollar y Sotiel, en España, y Aljustrel y Lousal, en Portugal.

1.2. MINAS DE RÍO TINTO

Las minas de Río Tinto están situadas en la provincia de Huelva, a 75 Km de la capital de la provincia, en el extremo oeste de Sierra Morena. Están localizadas dentro del anticlinal de Río Tinto, perteneciente a la franja pirítica del Sur de la península Ibérica.

La mina de Río Tinto es la mina en activo más antigua del mundo. Una prueba de ello es el hallazgo, entre las antiguas escombreras, de herramientas de piedra demostrando

la existencia de una minería y una metalurgia que comenzó a principios de la Edad de Bronce, en el tercer milenio a.C. Los trabajos se han desarrollado a lo largo de tres etapas cronológicamente bien diferenciadas.

En la primera de ellas, durante la Época Tartésica, se desarrolla la minería del oro y de la plata, seguida posteriormente por una época de gran esplendor, durante la dominación romana, en la que además de los metales preciosos se crea una importante minería de cobre y de hierro.

La segunda etapa importante es el período comprendido entre 1873 y 1953, en la que las minas están bajo dirección inglesa. En esta etapa, se ponen de nuevo a punto antiguas explotaciones romanas y se abren otras nuevas. Se realizaron diversos estudios sobre la génesis de los yacimientos que sirvieron para la explotación posterior de los mismos. Durante esta época, se explotan principalmente las masas piríticas para la obtención de azufre.

La última etapa, se inicia con la nacionalización de las minas y continúa hasta nuestros días. Se realizan numerosos estudios geológico-mineros con los que se comprueba que la zona sigue siendo un centro minero con importantes reservas potenciales de oro, plata, cobre, plomo y cinc.

Las mineralizaciones de Río Tinto, al igual que las restantes de la zona, se sitúan dentro de una corrida de materiales paleozoicos, extendiéndose en sentido Este-Oeste desde el Norte de Sevilla hasta el Atlántico, dando lugar a una provincia metalogenética donde la frecuencia de mineralizaciones es de las más altas del mundo.

Las mineralizaciones de esta zona pueden ser de dos tipos: masas de sulfuros en las que predomina la pirita acompañada de pequeñas cantidades de Cu, Pb, Zn, As, Au, Ag, etc., y chimeneas de filones de pirita con calcopirita encajadas en rocas volcánicas ("stockwork").

Asociados a las mineralizaciones hay procesos de alteración de las rocas encajantes (cloritización, sericitación, silicificación). El conjunto de mineralizaciones y rocas encajantes

está afectado por la orogenia hercínica, así como por procesos de alteración superficial. Esto ha dado lugar a que, además de las dos mineralizaciones anteriormente mencionadas, exista una más consecuencia de los cambios que actúan sobre las anteriores y cuyo principal resultado es una anómala concentración de oro y plata. Esta mineralización, denominada Gossan, sólo se encuentra en la superficie de las minas y de ella se extraen los metales preciosos.

1.3. BIOLIXIVIACIÓN

La biolixiviación es una operación de la hidrometalurgia, también denominada vía húmeda, para la extracción de determinados metales. Estos procedimientos se basan en el ataque químico del mineral a tratar. El fin de este tratamiento es disponer de una solución enriquecida en los metales de interés para conseguir la recuperación de los mismos tras un adecuado proceso de precipitación.

La hidrometalurgia alcanzó, en tiempos antiguos, unos niveles de utilización muy altos, aunque con un total desconocimiento de los fundamentos físicos, químicos y biológicos de los procesos. Los primeros documentos históricos hablan de su aplicación en la extracción de cobre en Chipre, en torno al año 166 a.C. y en las minas de cobre en España, entre los años 23-79 a.C.. También existen datos acerca de su utilización en la extracción de cobre en China y en Hungría durante la Edad Media. A partir del s.XVII, su uso se extendió por diferentes países de Europa, principalmente aplicada a la extracción de cobre. A lo largo de todo este período de tiempo, el papel de los microorganismos en el proceso era todavía desconocido.

En los últimos años del siglo XIX fue cuando se descubrió la autotrofia de algunos microorganismos y la interrelación existente entre la biosfera y la litosfera. A principios del siglo XX, Nathansohn aisló la primera cepa del microorganismo *Thiobacillus sp.* (Nathansohn, 1902) demostrando su capacidad para oxidar compuestos de azufre. En los años 40, como consecuencia de diversos estudios sobre el deterioro ambiental producido por los efluentes de las minas, fue cuando se relacionó a la microflora presente en las aguas de drenaje con los procesos de lixiviación bacteriana. Así, se llegó a 1947, año en el que se

aisló *Thiobacillus ferrooxidans*. El descubrimiento de este nuevo microorganismo abrió un enorme campo de posibilidades en torno a su utilización como catalizador en la solubilización de diversos sulfuros metálicos. Así, nació una nueva rama de la tecnología metalúrgica denominada biohidrometalurgia y dentro de esta la biolixiviación, la cual podría definirse como "una operación de disolución de metales, a partir generalmente de minerales sulfurados o de sus concentrados, catalizada, directa o indirectamente, por microorganismos".

Durante los últimos 30 años, se han desarrollado multitud de trabajos experimentales, dentro de distintas ramas de la ciencia (microbiología, química, metalurgia, geología, etc.), que han permitido comprobar que, además del *T. ferrooxidans*, existen muchos otros microorganismos implicados en los procesos de biolixiviación. Por otra parte, estos microorganismos no sólo son aplicables en la biolixiviación de minerales, sino que son potencialmente útiles en el tratamiento de aguas residuales o en la biodesulfuración de carbones.

1.3.1. Métodos de biolixiviación

La biolixiviación es una de las principales actividades biotecnológicas utilizadas hoy en día. Como ejemplo, se puede estimar en 1 billón de dólares el valor del cobre recuperado, desde que se tiene noticia de ello, por procedimientos biológicos en todo el mundo (Holmes y Debus, 1991), con un porcentaje entre el 10 y el 30% de la producción total del metal. Diversos estudios valoran en 5 billones de dólares el valor de los metales que se habrán recuperado con microorganismos hasta el año 2000 (Brierley C.L., 1984). La biolixiviación puede participar en los siguientes tipos de lixiviación:

a.- **Lixiviación "in situ"**: Se aplica a minerales con muy baja ley. Consiste en "regar" las paredes de la mina con la solución lixiviante. El mineral a tratar debe haber sido previamente fisurado o fracturado, mediante explosivos, o bien ha de ser un material poroso. Este tipo de biolixiviación se utiliza en minas en las que las reservas convencionales del mineral ya han sido agotadas.

b.- **Lixiviación en escombreras.** Las escombreras son montones de mineral de grandes dimensiones en los que se acumulan minerales muy pobres (en el caso del cobre, con leyes entre 0,1-0,5%). Se utilizan terrenos adecuados en los que la solución lixivante con la que regamos el mineral pueda ser recogida, normalmente, por la parte inferior del montón, para posteriores tratamientos, generalmente electrolíticos, en los que se recupera el metal. La solución lixivante es recirculada para atacar más mineral. El gran problema de este sistema es el tiempo de ataque: normalmente varios años.

c.- **Lixiviación en montones:** En este caso, el mineral que queremos tratar no es tan pobre como en el caso anterior. El tamaño de las partículas de mineral es mucho más uniforme y la lixiviación del metal es más rápida. El material que será lixiviado se amontona sobre una superficie impermeabilizada y especialmente preparada para ello.

d.- **Lixiviación dinámica:** Se lleva a cabo gracias a un movimiento continuo de la pulpa (mineral más solución). Se realiza en grandes reactores agitados mecánica o neumáticamente. Ofrecen la posibilidad de un rendimiento de biolixiviación más elevado con la ventaja de tener las condiciones del proceso controladas. Se han realizado diversos intentos de aplicación de esta técnica a concentrados de sulfuros metálicos, aunque sólo se aplica, a escala industrial, para el tratamiento de las menas refractarias de oro y plata. Los costes económicos de estos procesos son mucho mayores que en cualquiera de los casos anteriores. Normalmente, los procesos de lixiviación dinámica se emplean para el tratamiento de minerales mucho más valiosos que en el resto de los casos.

1.3.2. Ventajas y desventajas de la biolixiviación

Los procesos de biolixiviación ofrecen, con respecto a los tratamientos pirometalúrgicos, una serie de ventajas demostradas tanto a escala de laboratorio como a escala industrial (Decker, 1986; Ballester y col., 1988; Bordonaba y López, 1988):

1.- Bajo requerimiento de energía, limitado al bombeo de las soluciones. Las temperaturas máximas pueden reducirse desde los 1500°C a menos de 100°C.

2.- Ausencia de contaminación por emisiones de SO_2 .

3.- Posibilidad de tratamiento de menas pobres, subproductos y residuos que no podrían ser aprovechados por métodos clásicos.

4.- Bajos costes de operación y de capital inmovilizado lo que permite rentabilizar incluso pequeñas instalaciones. Por ejemplo, los costes en relación a una planta de extracción de cobre pueden ser aproximadamente la mitad que en una planta pirometalúrgica.

5.- Selectividad del ataque bacteriano. Esto provoca, como consecuencia, una fácil separación de los subproductos del proceso, como es el caso del hierro que aparece en gran cantidad en las materias primas naturales y que en los procesos de biolixiviación precipita como jarositas, de estructura cristalina, que se separan fácilmente por filtración.

6.- Bajo consumo de reactivos, especialmente ácidos, ya que los mismos microorganismos se encargan de acidificar el medio.

Frente a estas ventajas, la biolixiviación presenta una serie de desventajas que deberán ser superadas para que el proceso sea económicamente competitivo con los métodos clásicos:

1.- Cinética muy lenta. Este es posiblemente el principal inconveniente, ya que este tipo de procesos, dependiendo de las condiciones, generalmente, tienen una duración que va desde varios días a varios meses e incluso varios años.

2.- Producción de soluciones diluidas, lo que requiere una etapa de concentración previa a la de recuperación metálica.

3.- Dificultad de implantación a partir de los procesos actuales en funcionamiento.

4.- Las aguas ácidas que se generan en los procesos deben ser tratadas antes de su vertido a la naturaleza.

5.- Escaso conocimiento de los mecanismos implicados en los procesos de biolixiviación, especialmente en los diversos aspectos relacionados con la microbiología del proceso.

Este último punto queda frecuentemente al margen, pero tiene una gran importancia debido a que una mejor comprensión de los aspectos microbiológicos de los procesos de biolixiviación ayudaría a mejorar aspectos tales como la cinética de los mismos o la conveniencia de utilizar los microorganismos más adecuados según el tipo de mineral que se quiera atacar.

1.3.3. Perspectivas futuras

La biolixiviación de sulfuros minerales tiene grandes ventajas desde un punto de vista económico y medioambiental. No obstante, a pesar de esto, la aplicación de estas técnicas no ha progresado a nivel industrial, desde hace años, excepto en la recuperación de cobre y uranio por lixiviación en montones. Las razones hay que buscarlas en el inestable mercado de los metales, con precios muy bajos y al interés de las compañías mineras en rentabilizar rápidamente las inversiones.

Sin embargo, hay ciertos procesos en los que sí se están consiguiendo grandes progresos. Son, principalmente, la recuperación por biolixiviación de metales y metaloides como Ga, Ge, Mn, As, Se, Sb Bi, V, etc... (Torma, 1989; Mitov y col., 1990) a partir de minerales que no pueden ser tratados por métodos convencionales, la recuperación de metales preciosos (especialmente oro) por biooxidación de minerales refractarios (Hutchins y col., 1988; Lawrence y Bruynesteyn, 1983; Lindström y col., 1992), la recuperación de metales de aguas residuales industriales (Jeffers y col., 1991) o la desulfuración de carbones (Klein y col., 1989).

Dentro de las tendencias actuales en el campo de la biolixiviación, para conseguir mejores rendimientos y una optimización del proceso que le permita ser competitivo frente a los métodos tradicionales, habría que destacar:

- 1.- El uso de mezclas de microorganismos.
- 2.- Sistemas de trabajo con organismos termófilos que incrementen la cinética del proceso.
- 3.- Búsqueda de nuevos microorganismos con capacidades especiales como la especificidad hacia determinados metales.
- 4.- Modificación genética de microorganismos.
- 5.- Desarrollo de la ingeniería de reactores para aumentar la cinética.
- 6.- Desarrollo de la investigación básica para poder comprender los distintos mecanismos y fundamentos de las reacciones que tienen lugar en los sistemas de biolixiviación.

1.3.4. Microorganismos implicados en los procesos de biolixiviación

Los sistemas biohidrometalúrgicos son ecosistemas microbianos y las primeras investigaciones en este campo se basaron en el aislamiento e identificación de cultivos puros y su posterior caracterización fisiológica. Desde el descubrimiento en 1947 de *T. ferrooxidans*, como la principal bacteria implicada en los procesos de biolixiviación, se han publicado numerosos trabajos sobre las características de este microorganismo y sus diferentes formas de comportamiento en fenómenos de biolixiviación. Sin embargo, pese a su indudable importancia, *T. ferrooxidans* no es el único microorganismo presente en los ecosistemas biolixivantes, que podrían definirse como aquellos en los que tienen lugar los procesos de oxidación de minerales y azufre. Dentro de estos, los habitats más conocidos son los montones de lixiviación creados por el hombre para operaciones de recuperación de metales o como depósitos de residuos minerales. Los estudios realizados sobre estos ambientes permitieron el aislamiento y caracterización de nuevas especies bacterianas con capacidad biolixivante. Así, en 1953 (Leathen y col., 1953 y 1954) se descubre un nuevo microorganismo, *Ferrobacillus ferrooxidans*, del que se aislan nuevas especies, como *F.*

sulfooxidans en los años siguientes (Kinsel, 1960). Estas dos últimas especies se englobaron dentro de *T. ferrooxidans* en los años 70 (Kelly y Tuovinen, 1972). Unos años antes, en 1963, Ehrlich encontró levaduras, amebas y otros tipos de bacterias en las aguas de drenaje de una mina, además de bacterias del género *Thiobacillus*. Hasta estos años, se pensaba que sólo dos microorganismos tenían un papel relevante dentro de los procesos de biolixiviación: *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*. A partir de entonces, con el descubrimiento de distintas bacterias, como *Leptospirillum ferrooxidans* (Markosyan, 1972), junto con distintos microorganismos termófilos moderados (Brierley y Le Roux, 1978; Le Roux y col., 1977; Golacheva y KaravaiKo, 1978) y termófilos extremos, como las bacterias del género *Sulfolobus* (Brock y col., 1972), cambiaron las ideas sobre los ecosistemas biolixiviantes. En cualquier caso, el proceso de biolixiviación está producido por la interacción de los minerales con una población mixta de microorganismos en la que, además de microorganismos autótrofos, intervienen otros microorganismos heterótrofos, así como algas, hongos y protozoos, con amplios rangos de tolerancia a diferentes temperaturas y condiciones de acidez.

En otros estudios posteriores (Harrison, 1978), se examinó la sucesión de poblaciones microbianas en un depósito de carbón. El desarrollo de estas poblaciones comenzaba con bacterias heterotróficas que eran seguidas por bacterias oxidantes del azufre y, finalmente, por las bacterias del género *Thiobacillus*. El sistema clímax estaba compuesto por una gran diversidad de microflora, incluidos mohos, algas, protozoos, artrópodos y un musgo.

Se han realizado otros muchos estudios sobre la diversidad de microorganismos relacionados con el proceso de biolixiviación (Brierley, 1978; Kelly y col., 1979; Hutchins y col., 1986; Kelly, 1987; Norris, 1988; Groudeva y col., 1990; Siloniz y col., 1991), cuyos resultados han demostrado que *T. ferrooxidans* no era el único organismo implicado en procesos de este tipo, si bien es uno de los más importantes y significativos. Incluso, algunos trabajos (Harrison, 1984, 1986) consideran que bajo el nombre de *T. ferrooxidans* podrían existir distintas especies bacterianas debido a la diversidad genética entre las distintas cepas aisladas por diversos autores. Entre todos estos microorganismos se establecen relaciones que afectan al conjunto del ecosistema (figura 1). En muchas ocasiones, estas relaciones son de simbiosis, de tal forma que el proceso general se ve favorecido por la coexistencia de varias

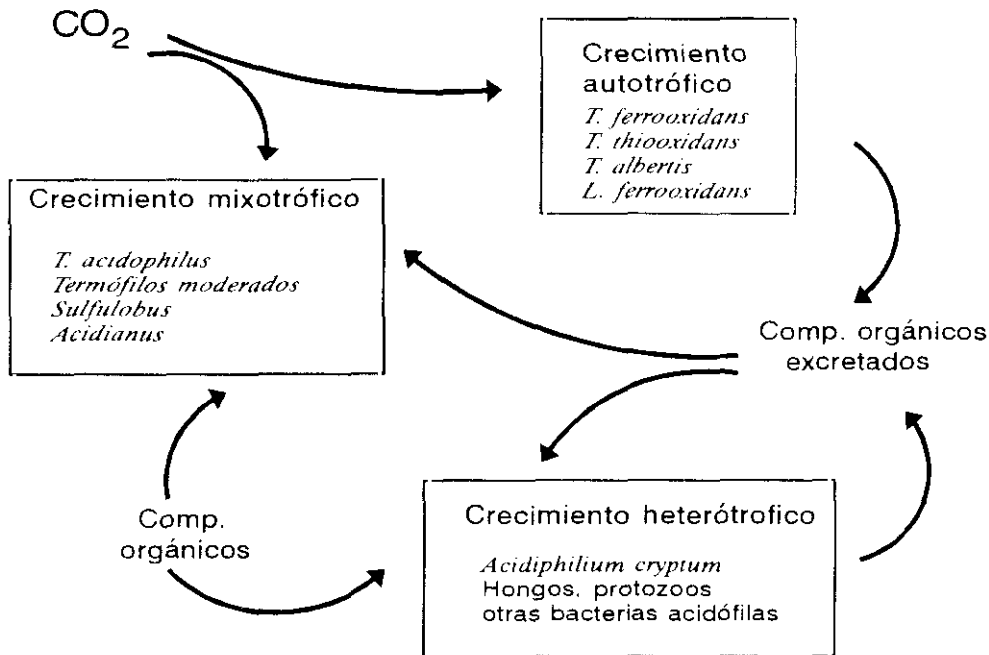


Figura 1: Interrelaciones en el flujo de carbono en ecosistemas de biolixiviación

especies de microorganismos. Este es el caso de bacterias heterótrofas como las del género *Acidiphilium* o *T. acidophilus*, que pueden utilizar como fuente de energía sustancias orgánicas que perjudican a *T. ferrooxidans*. Otros tipos de bacterias heterótrofas pueden favorecer la biolixiviación de minerales de uranio, aunque de forma indirecta (Tuovinen y col., 1982). Pero no todos los microorganismos presentes en el ecosistema favorecen el proceso de biolixiviación. Groudev y col., en 1978, demostraron el efecto desfavorable de algunos microorganismos heterótrofos (*Amoeba* y *Caulobacter*, principalmente) en operaciones industriales de lixiviación de cobre en montones, debido al consumo de oxígeno, a la precipitación de productos sólidos sobre la superficie del mineral y a los productos secretados con efectos inhibitorios sobre los *thiobacilli*.

Recientemente, se han hecho estudios sobre el potencial de algunos microorganismos heterótrofos (tanto hongos como bacterias) en procesos de biolixiviación (Erhlich, 1991). Estos presentan la ventaja, sobre los autótrofos, de una cinética más rápida, pero tienen una

serie de inconvenientes que implican un alto coste del proceso (aportación de nutrientes y sistemas en reactores con poblaciones puras y muy controladas).

En relación a los hongos, existen ciertos géneros capaces de formar ácido cítrico y oxálico, a partir de azúcares como la glucosa, que posteriormente pueden reaccionar con los óxidos metálicos disolviendo los metales que forman parte del mineral. A escala de laboratorio, ya se han realizado ensayos de lixiviación de cobre, con bastante éxito, con hongos de la especie *Aspergillus niger* (Kiel y Schwartz, 1980) y ensayos de lixiviación del hierro de la arena de cuarzo con hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Erhlich, 1988).

También se ha sugerido la posibilidad de que en las zonas más profundas de los montones en los que tiene lugar la biolixiviación, donde las concentraciones de oxígeno son prácticamente nulas, actúen microorganismos anaerobios como *Desulfovibrio desulfuricans* (Bhurat y col., 1973). Por último, se han realizado diversos trabajos que indican que *T. ferrooxidans* puede crecer en condiciones anaeróbicas sobre sulfuros (Das y col., 1992), con lo que su papel en el interior de los montones cobraría más importancia, pero hay muy pocos estudios realizados con respecto a esta posibilidad.

Microorganismos termófilos

Dentro de los microorganismos que actúan en procesos de biolixiviación es imprescindible hacer una mención especial de los microorganismos termófilos. Cada día cobra más fuerza la idea de su utilización como solución a los problemas que actualmente presentan los sistemas de biolixiviación, ya que el aumento de la temperatura conlleva una aceleración de la cinética química del proceso.

En general, el grupo de microorganismos termófilos presenta como problema, para su posible aplicación, la gran sensibilidad de su membrana frente a fenómenos de atrición. Esto obliga a trabajar, en procesos de lixiviación dinámica (reactores), con densidades de pulpa menores que las utilizadas en ensayos con microorganismos mesófilos.

El uso de estas bacterias no debería, sin embargo, estar restringida a condiciones de laboratorio o a reactores controlados, puesto que diversos autores comprobaron la existencia en el interior de los montones de lixiviación de temperaturas con valores que oscilan entre los 50 y los 80°C (Brierley y Murr, 1973; Murr y Brierley, 1978; Groudev y col. 1978). Así, se han aislado en estos montones diversos microorganismos termófilos (LeRoux y col., 1977; Brierley y Lockwood, 1977) con reconocida capacidad lixivante. Dentro de estos, posiblemente, las bacterias del género *Sulfolobus* sean las más estudiadas, aunque recientemente se han descubierto otras especies como *Metallosphaera sedula* (Huber y col., 1989) con propiedades que las hacen potencialmente aplicables a estos procesos.

En cuanto a los microorganismos termófilos moderados, son los más desconocidos del proceso. Muchos de los microorganismos aislados con esta característica (Norris y col., 1986) están todavía sin clasificar taxonómicamente y presentan una gran diversidad, tanto genotípica y fenotípica como morfológica, entre ellos. Los más estudiados son los del género *Sulfobacillus* (Karavaiko y col., 1987).

En la tabla I se recogen las principales características de los microorganismos más importantes en los procesos de biolixiviación.

1.3.5. Metabolismo de los microorganismos biolixiviadores

Se ha estudiado principalmente en *Thiobacillus ferrooxidans* aunque, por tratarse de bacterias quimiolitótrofas que utilizan la oxidación de Fe^{2+} y de compuestos de azufre, el metabolismo es muy similar en la mayoría de los casos.

Como el resto de las eubacterias autótrofas, el mecanismo de fijación de carbono se realiza a través del ciclo de Calvin en una reacción catalizada por la ribulosa difosfato carboxilasa, con un gasto energético de 3 moléculas de ATP y 2 de NADPH por mol de CO_2 fijado. En las bacterias termófilas no se conoce bien este mecanismo, pero si se sabe que las arqueobacterias (todos los termófilos extremos conocidos pertenecen a este reino) no utilizan el ciclo de Calvin. También existe en los *thiobacilli* un mecanismo para la fijación de nitrógeno (Mackintosh, 1978).

MICROORGANISMO	CARACTERÍSTICAS	REQUERIMIENTO DE CARBONO	REQUERIMIENTO DE OXÍGENO	RANGO DE pH (ÓPTIMO)	RANGO DE T° (ÓPTIMO)
<i>T. ferrooxidans</i>	Oxida: Fe ²⁺ , S ⁰ , U ⁴⁺ , Cu ⁺ , Se ²⁺ , S ⁻ , tiosulfato, tetrionato	Q.O.	Aerobio	1,2-6,0 (2,5-2,8)	5-40 (28-35)
<i>T. thiooxidans</i>	Oxida: S ⁰ , tiosulfato, tetrionato	Q.O.	Aerobio	0,5-6,0 (2,0-3,5)	10-40 (28-30)
<i>T. acidophilus</i>	Oxida: S ⁰ , comp. orgánicos	Q.F.	Aerobio	1,5-6,0 (3,0)	25-30
<i>L. ferrooxidans</i>	Oxida: Fe ²⁺ , pirita	Q.O.	Aerobio	1,5-4,5 (2,5-3,0)	20-40 (30)
<i>S. thermosulfidooxidans</i>	Oxida: Fe ²⁺ , S ⁰ , S ⁻	Q.F.	Aerobio	1,9-3,0 (1,9-2,4)	20-60 (50)
<i>S. metallicus</i>	Oxida: S ⁰ , Fe ²⁺	Q.F.	Aerobio	1,0-4,5 (2,5-2,8)	50-75 (65-70)
<i>S. acidocaldarius</i>	Oxida: S ⁰ , Fe ²⁺	Q.F.	Aerobio	2,0-7,0 (2,0-3,0)	55-85 (70-75)
<i>A. brierleyi</i>	Oxida: S ⁰ , extracto de levadura	Q.F.	Aerobio	1,0-6,0 (1,5-2,0)	45-75 (70)

Tabla I: Microorganismos implicados en los procesos de biolixiviación.
 Q.O.: quimiolitótrofo obligado, Q.F.: Quimiolitótrofo facultativo.

La obtención de la energía necesaria para la fijación del CO₂ y del nitrógeno la obtienen de la oxidación de hierro reducido o de la oxidación de compuestos de azufre reducidos.

El mecanismo de oxidación de hierro (Ingledeew, 1982) tiene lugar en el espacio periplasmático de la célula. El Fe²⁺, en un proceso catalizado por la enzima rusticianina (citocromo *c* reductasa), es oxidado a Fe³⁺. Los electrones resultantes de la oxidación son transferidos desde esta enzima a la cadena de transporte electrónico hasta llegar a una citocromo oxidasa terminal situada en la membrana citoplasmática. El aceptor final de los electrones, al tratarse de microorganismos aerobios, es el oxígeno, que se combina con los protones para dar H₂O.

El transporte de protones se debe al fuerte gradiente de pH existente entre el exterior de la célula (pH < 2.5) y el interior de la misma (pH cercano a la neutralidad). Este transporte de protones tiene lugar a través de canales en la membrana citoplasmática asociados a ATPasas. El resultado final del proceso es la obtención de ATP y NADPH que serán utilizados en la fijación del CO₂, N₂ y otros procesos anabólicos. El gradiente de protones, esencial en estos microorganismos, hace que sean particularmente sensibles hacia compuestos como ácidos orgánicos débiles que difunden de manera relativamente fácil a través de la membrana citoplasmática y al llegar al citoplasma se disocian y disminuyen el pH interno (Alexander y col., 1987). Pequeñas concentraciones (10⁻⁴ M) de estos ácidos orgánicos pueden inhibir totalmente el crecimiento de los *thiobacilli* (Rao y Berger, 1970).

Durante muchos años, la investigación sobre los *thiobacilli* acidófilos y especialmente en *T. ferrooxidans*, había estado basada en el sistema de oxidación del hierro. Sin embargo, actualmente, se considera que la solubilización de sulfuros minerales es mas efectiva si los microorganismos poseen al mismo tiempo sistemas de oxidación de hierro y de azufre. El sistema de oxidación de compuestos de azufre es muy importante puesto que los sulfuros son los principales componentes de los minerales susceptibles de ser procesados por biolixiviación, por ejemplo, la pirita, en cuya oxidación demostró Arkesteyn la existencia de este sistema. En la oxidación de este mineral parece que parte de los electrones obtenidos

entran en la cadena respiratoria en un sitio diferente a los electrones originados por la oxidación del ión ferroso.

Se han realizado muchos ensayos para caracterizar las enzimas implicadas en esta vía de obtención de energía en diferentes microorganismos biolixiviantes (Meulenberg y col., 1992^a; Sugio y col., 1992; Beffa y col., 1991; Suzuki y col., 1992), así como la cinética del proceso (Meulenberg y col., 1992^b), pero todavía no hay una explicación general de la bioquímica del mismo.

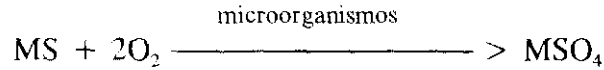
Tanto los estudios realizados con inhibidores de la oxidación de distintos compuestos de azufre como el pH óptimo para la oxidación de los mismos (Hazeu y col., 1988), sugieren que ésta se produce en distintos lugares de la célula en función del compuesto. Así, el tritronato, tiosulfato y tetratronato se oxidan en el espacio periplásmico, mientras que el azufre elemental y los sulfuros se oxidan en el citoplasma. Los sulfitos, dependiendo del microorganismo, se oxidan en un lugar u otro (p.ej., periplasma en *T. ferrooxidans* y citoplasma en *T. acidophilus*) (Kuenen y col., 1993).

En la figura 2 se puede ver un esquema del proceso de la oxidación de los diferentes compuestos de azufre con las enzimas conocidas que participan en el proceso.

El ambiente ácido y los posibles sustratos presentes en el mismo sugieren un mecanismo de obtención de energía similar para la mayoría de los microorganismos lixiviantes, si bien los diferentes componentes del proceso no son todavía bien conocidos y podría haber diferencias en alguno de ellos (Barr y col., 1990; Hart y col., 1991).

1.3.6. Mecanismos de acción bacteriana

La disolución de los elementos metálicos contenidos en los minerales puede deberse a procesos químicos o biológicos. El segundo caso se trataría de un proceso de biolixiviación. Cuando el mineral que se quiere tratar es un sulfuro metálico (MS), la disolución del mismo se puede esquematizar con la siguiente reacción:



El papel de los microorganismos es catalizar la reacción de disolución del sulfuro metálico, ya sea de forma directa o indirecta, aunque actualmente se acepta que ambos mecanismos influyen de manera simultánea en la solubilización de los minerales (figura 3). Estos procesos suponen complejas interacciones entre los microorganismos, los substratos y el medio.

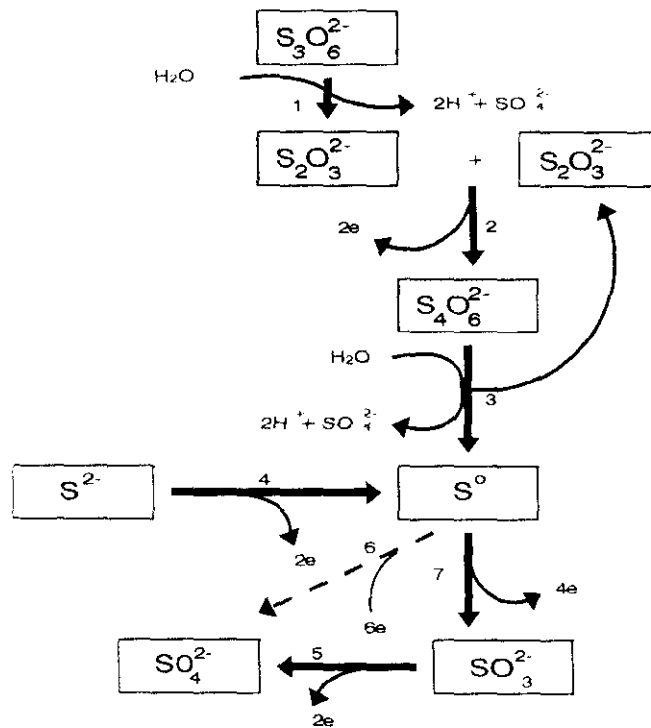


Figura 2: Oxidación de compuestos de azufre en *T. ferrooxidans*.
 1: Titrionato hidrolasa, 2: Tiosulfato deshidrogenasa, 3: Tetrationato hidrolasa,
 5: enzima sulfito oxidante, 4,6,7: sin caracterizar.

Lixiviación directa

En este caso, se produce, probablemente, un contacto físico entre el mineral y el microorganismo lixivante. Las bacterias tienen que fijarse a la superficie del mineral donde se produce el ataque de los sulfuros metálicos. En el caso de la pirita, la transformación del

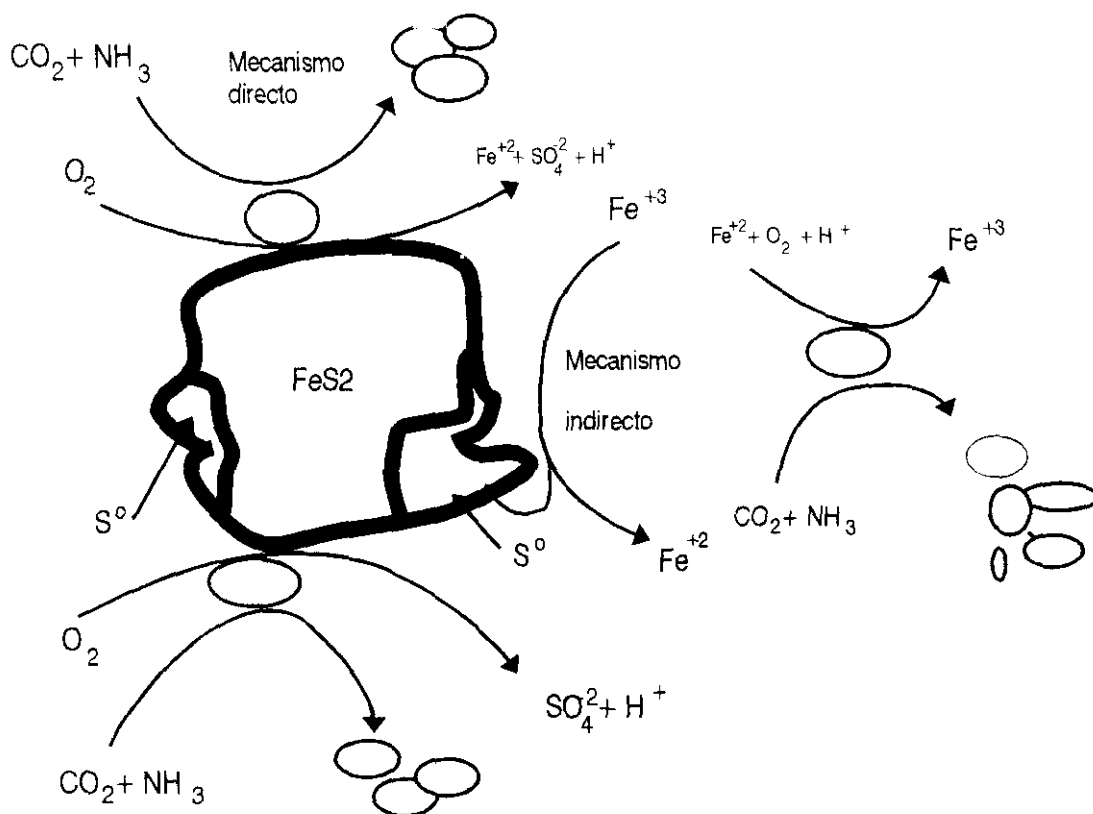
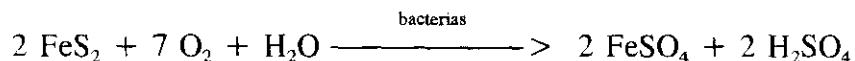
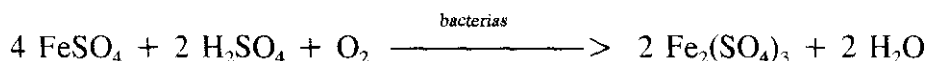


Figura 3: Diagrama esquemático de la lixiviación directa e indirecta. Los óvalos representan a las bacterias

sulfuro en sulfato ocurre a través de una oxidación enzimática según la reacción global:



El sulfato ferroso es oxidado, en una etapa posterior, por las bacterias, a sulfato férrico según la siguiente reacción:



La teoría de la lixiviación directa ha sido corroborada por diversos estudios experimentales. En este sentido, Berry y Murr (1978) encontraron alguna evidencia de que los *thiobacilli* secretaban algunas sustancias que podrían ayudar al ataque, pero la naturaleza de estas sustancias era desconocida. Bennet y Tributuch (1978) observaron, con microscopio

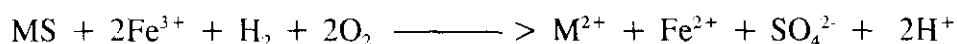
electrónico de barrido (SEM), cristales de pirita expuestos a la acción de *T. ferrooxidans*. Estos estudios detectaron huellas de corrosión en los cristales y sugirieron que eran causados por un agente bacteriano, un metabolito, que podría actuar por tres medios: oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} , solubilización del azufre molecular de las superficies del cristal o por ataque directo. También comprobaron que *T. ferrooxidans* tenía la capacidad de discernir las regiones más favorables de la superficie mineral para obtener su fuente de energía y seleccionar el sitio de ataque en función de la disponibilidad del nutriente.

Por otro lado, el mecanismo de lixiviación directa es muy importante, por ejemplo, al justificar la eliminación del azufre pirítico de los carbones (cratas). Es conocida la importancia que tiene el carbón como combustible en la generación de energía eléctrica, especialmente en un país como España, productora de carbón. Por desgracia, estos carbones son de muy mala calidad, con altos contenidos en azufre, lo que provoca graves problemas ambientales como consecuencia de su combustión. El uso de bacterias, ya sean mesófilas (Dugan, 1984) o termófilas (Kargi y Robinson, 1982), podría contribuir a solucionar este problema.

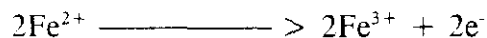
Lixiviación indirecta

En este caso, el verdadero agente oxidante son los metabolitos procedentes de la acción bacteriana y especialmente el ión férrico que oxida a los sulfuros metálicos reduciéndose a su vez al estado de ión ferroso (Dutrizac, MacDonald 1974). Así mismo, tiene gran importancia el ácido sulfúrico creado por las bacterias y que contribuye a acidificar el medio generando las adecuadas condiciones lixiviantes.

Esto se podría esquematizar mediante la siguiente reacción:



Posteriormente, el Fe^{2+} producido según esta reacción es oxidado, en presencia de bacterias oxidantes de hierro, estableciéndose, de esta manera, un proceso cíclico:



La velocidad de oxidación abiótica del ión ferroso, a valores bajos de pH, es considerablemente lenta; no obstante, ésta se acelera en gran medida, en presencia de bacterias oxidantes de hierro, llegando a ser 10^5 - 10^6 veces mayor (Lundgren y Silver, 1980).

El mecanismo de lixiviación indirecta es la base de los procesos extractivos que se están empleando a gran escala, desde hace años en Canadá, para la obtención de uranio. También tiene gran interés en procesos de biolixiviación "in situ".

1.3.7. Factores que afectan a la actividad microbiana

Como se ha visto hasta ahora, los microorganismos juegan un importante papel en los procesos de lixiviación metálica. Por ello, en las aplicaciones industriales, se deben considerar, junto con los aspectos económicos y los derivados del diseño del sistema, aquellos que puedan condicionar la actuación de los microorganismos implicados en el proceso.

Posiblemente, el factor más importante es la humedad, imprescindible para que pueda darse vida microbiana. El riego adecuado de los montones de lixiviación tiene que estar bien controlado para evitar gastos inútiles de agua, pero tiene que ser suficiente para que los microorganismos puedan colonizar todo el mineral acumulado.

El pH de la solución lixivante tiene que ser ácido, puesto que juega un importante papel en la obtención de energía por parte de las bacterias. Al mismo tiempo, un pH suficientemente ácido supone un límite biológico para bacterias no deseadas que pueden influir negativamente y contribuye a prevenir la precipitación de jarositas. El pH óptimo recomendado para operaciones de biolixiviación está entre 2.3 y 2.5 (Torma, 1977).

La temperatura es otro factor importante, puesto que las distintas especies bacterianas tienen unos rangos de temperatura óptimos para un buen desarrollo celular y fuera de los límites de estos rangos la actividad cae drásticamente. En los montones de lixiviación, debido

a su enorme volumen, las condiciones de temperatura varían mucho entre el exterior y el interior de los mismos, provocando una estratificación en las poblaciones de bacterias que los habitan (psicrófilos y mesófilos en el exterior y termófilos en el interior).

La disponibilidad de nutrientes debe estar asegurada por los propios minerales. *Cualquier adición de medios nutrientes externos encarecería considerablemente el costo del proceso.*

El oxígeno también puede ser un factor limitante. La mayoría de los microorganismos biolixiviantes son aerobios y esto puede impedir su presencia en zonas profundas de los montones donde las condiciones pueden impedir la llegada de oxígeno a las mismas. Por las mismas razones, la ausencia de CO₂, la fuente de carbono de estos microorganismos, puede impedir su presencia en estas zonas profundas de los montones.

La presencia de distintos compuestos orgánicos, consecuencia del tratamiento de los minerales por flotación, es otro factor que limita la actividad microbiana. La mayor parte de estos compuestos son tóxicos o inhibitorios para el crecimiento de las bacterias y por esta razón sería aconsejable la realización de estudios previos de estos reactivos para utilizar los menos perjudiciales para los microorganismos presentes en el proceso.

Hay otros factores que influyen en la actividad bacteriana aunque no desde un punto de vista biológico, pero que condicionan la efectividad del ataque bacteriano. El tamaño de las partículas de mineral es uno de estos factores, puesto que determina el área superficial expuesta a la acción de los microorganismos. Normalmente, a menor tamaño de partícula, mejor rendimiento de lixiviación. Sin embargo, la molienda del mineral es un proceso muy costoso que impide su realización a gran escala en el momento actual. Otros factores podrían ser el consumo de ácido (dependiente de la ganga existente en el mineral) y la precipitación de sales férricas que bloquean las vías de percolación del líquido (Muñoz, 1992).

OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO

La biolixiviación es un proceso biotecnológico con claras ventajas como actividad alternativa a los procesos pirometalúrgicos para el tratamiento de minerales de baja ley. Sin embargo, todavía no se aplica extensamente debido a las desventajas que presenta. Como se ha comentado anteriormente, uno de los problemas principales es el desconocimiento de los mecanismos microbiológicos del proceso. Una gran parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con poblaciones de microorganismos sin caracterizar y en otros casos con cultivos puros de colección donde los microorganismos estaban muy poco adaptados al proceso. Adicionalmente, existe un desconocimiento casi total de aspectos ecológicos de los sistemas naturales en los que se desarrollan este tipo de seres vivos.

Por estas razones, el primer objetivo de este trabajo será intentar el aislamiento de diversas bacterias quimiolitótrofas, procedentes de las propias aguas de la mina cuyos minerales van a ser objeto del estudio.

Dentro de estos microorganismos, se buscaron, con especial interés, aquellos capaces de desarrollarse a temperaturas elevadas con el fin de conseguir una mejora en la cinética del proceso.

Una vez aislados los microorganismos, el siguiente objetivo será realizar su caracterización morfológica, fisiológica y genética. El conocimiento de sus principales características debe ser una ayuda indispensable, si se pretende, en un futuro, utilizarlos a una escala mayor que la del laboratorio.

Dentro del estudio de las características de los microorganismos, tiene especial importancia, dada la naturaleza del presente trabajo, el comportamiento de los mismos en un proceso de lixiviación bacteriana frente a distintos sulfuros complejos.

Como se ha mencionado anteriormente, existe una tendencia hacia el empleo de microorganismos que trabajan a temperaturas elevadas. En este sentido, se realizará un estudio comparativo de la capacidad biolixivante de los microorganismos aislados al actuar, en condiciones óptimas de crecimiento, sobre un mismo tipo de concentrado mineral.

Uno de los problemas a los que se enfrenta la biolixiviación es el hecho de que especies que, en condiciones de cultivos puros, tenían una importante actividad biolixivante, en procesos donde compiten con otras bacterias disminuyen o pierden sus capacidades y con ello el proceso se invalida. Por ello, se realizarán estudios, tanto a nivel microbiológico como desde el punto de vista de la extracción metálica, de la evolución de una población microbiana que se inocule en estado puro aunque en condiciones no estériles. Este tipo de estudios permitirá, por otra parte, comparar la eficacia de lixiviación de los cultivos puros frente a poblaciones mixtas de microorganismos.

Finalmente, se persigue determinar la especificidad de los microorganismos aislados frente a una o alguna de las fases constitutivas de los minerales a atacar. Cualquier avance en este sentido trascendental desde el punto de vista de conseguir un ataque biológico selectivo de las materias primas ensayadas y por tanto, su tratamiento integral con una recuperación más o menos completa de los minerales contenidos.

Los anteriores objetivos se apoyan en un interés evidente del trabajo dada la situación actual de la *Metalurgia Extractiva*. Dicho interés se puede concretar en tres aspectos distintos: económico, científico y medioambiental.

A nivel económico se puede decir que España posee unas reservas de sulfuros complejos de unas 250 millones de toneladas con un valor, para los metales contenidos de más de un billón de pesetas. Sin embargo, la complicada distribución de las fases minerales en estas materias primas hace muy difícil la extracción de estos metales por métodos tradicionales. Desde este punto de vista, la solución de alguno de los problemas de la biolixiviación, que permitan una aplicación industrial de estos procesos, justifica plenamente los esfuerzos investigadores llevados a cabo en los distintos campos de este joven campo biotecnológico.

Adicionalmente, y como se apuntaba anteriormente, los trabajos se realizarán con microorganismos aislados de las propias minas, lo que también facilitará su posible aplicación al proceso, aunque previamente hay que conocer bien sus características para que puedan desarrollar todo su potencial biolixivante.

Existe, también, un indudable interés científico puesto que aborda el estudio de algunos mecanismos básicos del proceso de biolixiviación. Por otra parte, las bacterias aisladas ofrecen por sí solas un atractivo especial, puesto que, hasta el momento, han demostrado una cierta especificidad, facultad que no ha sido detectada anteriormente durante la biolixiviación de sulfuros complejos naturales.

Por último, la biolixiviación presenta un gran interés ecológico y medioambiental, puesto que la pirometalurgia tradicional ocasiona importantes problemas de contaminación atmosférica debido a las emisiones de SO_2 y CO_2 . Por lo tanto, la puesta en funcionamiento de procesos industriales de extracción basados en la biolixiviación podría contribuir a paliar parte de los graves problemas medioambientales que se padecen en las zonas próximas a las plantas actuales de tratamiento y recuperación de metales.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS UTILIZADOS

Reactivos para medios de cultivo.

AgNO ₃	Merck
Bactotripton	Difco
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck
Casaminoácidos	Difco
CoSO ₄	Merck
CuSO ₄ .5H ₂ O	Merck
Extracto de levadura	Difco
FeSO ₄ .7H ₂ O	Merck
Glucosa	Merck
H ₂ SO ₄	Merck
HCl	Panreac
HgSO ₄	Merck
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	Carlo Erba
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Carlo Erba
MgCl ₂ .2H ₂ O	Merck
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck
MnSO ₄ .H ₂ O	Merck
Na ₂ MoSO ₄ .2H ₂ O	Merck
NaCl	Merck
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
AsO ₂	Merck
VSO ₄ .5H ₂ O	Merck
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Merck

Otros reactivos

Acido acético glacial	Panreac
Acetona	Panreac
Bromuro de etidio	Sigma
BSA	Boehringer Mannheim
Cloroformo	Merck
EDTA	Merck
Etanol	Merck
Fenol	Merck
NaF	Panreac
Glicerol	Merck
Glutaraldehido	Merck
"Incert agarose"	FMC
Isopropanol	Merck
Laurilsarcosina	Sigma
Metanol	Riedel de Haën
NaOH	Merck
Nonidet P40	BDH

SDS	Merck
Seakem agarose	FMC
OsO ₄	Merck
Tween 20	Sigma
Tween 80	Sigma
Tiocianato de guanidina	Merck
Trizma base	Sigma

Antibióticos

Ampicilina	Boehringer Mannheim
Cloranfenicol	Boehringer Mannheim
Eritromicina	Boehringer Mannheim
Estreptomicina	Boehringer Mannheim
Kanamicina	Boehringer Mannheim
Tetraciclina	Boehringer Mannheim

Enzimas. Todos los enzimas de restricción utilizados fueron suministrados por New England Biolabs Inc. Otros enzimas utilizados han sido:

Lisozima	Boehringer Mannheim
Proteinasa K	Boehringer Mannheim
RNAsa A	Sigma

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. Microorganismos utilizados

Se utilizaron diversos microorganismos aislados como consecuencia del propio trabajo experimental:

Thiobacillus sp aislado de la mina de Aznalcollar

Termófilo moderado **TMRT** aislado de las aguas de mina de Río Tinto.

Termófilo extremo **TERT** aislado de mineral de cobre de Río Tinto.

Además de estos microorganismos aislados, se utilizaron también distintas bacterias de colección como controles de las distintas pruebas:

- *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 21835.

- *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859.

- *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270.
- *Thiobacillus cuprinus* DSM 5495.
- *Leptospirillum ferrooxidans* DSM 2319
- *Escherichia coli* TG-1.
- *Bacillus subtilis* 110 NA.
- *Sulfolobus solfataricus* DSM 1616 (MT4)

3.2.2. Medios de cultivo líquidos

Para el crecimiento de los microorganismos utilizados en esta tesis se emplearon los medios:

Medio 9K sin hierro: (Silverman y Lundgren, 1959).

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00 g/l
KCl	0,10 g/l
K ₂ HPO ₄	0,50 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50 g/l
Ca(NO ₃) ₂	0,01 g/l

La solución se ajustó a pH 2 con H₂SO₄ 10N.

El medio 9K, contiene originalmente hierro ferroso como fuente de energía para los microorganismos, sin embargo, en este trabajo fue sustituido por diferentes sustratos. Por este motivo y para simplificar, en el texto se denomina 9K al medio descrito por Silverman y Lundgren en 1959 aunque haya sido utilizado sin hierro ferroso.

Medio M1: (Huber y col., 1986)

KCl	0,33 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,75 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,45 g
NH ₄ Cl	1,25 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,14 g
K ₂ HPO ₄	0,14 g
KH ₂ PO ₄	0,14 g
NaCl	0,50 g
Solución de trazas	10 ml (*)
H ₂ O bidestilada	1 litro
(*) Balch y cols., 1979	

La solución se ajustó a pH 3,5 para el crecimiento de *T. cuprinus* y a pH 2 para el crecimiento de los microorganismos aislados. En ambos casos se ajustó con H₂SO₄ 10N.

Medio Norris: (Norris y Barr, 1985)

K ₂ HPO ₄	0,01 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,20 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,40 g/l
H ₂ O destilada	1 l

La solución se ajustó a pH 2 con H₂SO₄ 10N.

Medio CA: (De Rosa y col., 1975)

Casaminoácidos	1,00 g/l
Extracto de levadura	1,00 g/l
KH ₂ PO ₄	3,10 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,50 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,25 g/l

La solución se ajustó a pH 2,5 con H₂SO₄ 10N.

Medio LB: (Lennox, 1955).

Extracto de levadura	5 g/l
Triptona	10 g/l
NaCl	10 g/l

Thiobacillus sp. y *T. ferrooxidans* ATCC 19859 y 23270 fueron crecidos, a 37°C, en medio 9K suplementado con 4% de FeSO₄ o con un 3% de concentrados minerales. En el caso de *T. thiooxidans* ATCC 21853, el medio se suplementó con un 0,3% de S°. *T. cuprinus* DSM 5495 fue crecido a 37°C en medio M1 suplementado con un 0,1% de extracto de levadura. *L. ferrooxidans* fue crecido en medio Norris suplementado con un 4% de FeSO₄ a 30°C. *E. coli* TG-1 y *B. subtilis* NA 110 fueron crecidos, a 37°C, en medio LB. *S. solfataricus* DSM 1616 fue crecido a 85°C en medio CA. TMRT y TERT fueron crecidos a 50°C y 70°C, respectivamente, en medio 9K suplementado con un 0,3% de S° o un 3% de concentrados minerales.

Así mismo, también se realizaron unos experimentos en los que se suplementaron estos medios con compuestos orgánicos con el objeto de determinar la posible presencia de

contaminantes heterótrofos en el cultivo mixto como, por ejemplo, *T. acidophilus* o bien para comprobar si alguno de los microorganismos presentes en el mismo tenía la capacidad de crecer heterotrófica o mixotróficamente. Las fuentes de energía orgánica que se eligieron fueron: glucosa al 0,1% y extracto de levadura al 0,1%. Se añadieron solas o bien con azufre elemental (0,3%) como suplemento energético.

3.2.3. Medios de cultivo sólidos

Para el crecimiento en placas de los cultivos mesófilos se utilizaron dos tipos de preparación diferentes:

I.- Solución A: 9K x 2

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6,00 g/l
KCl	0,20 g/l
K_2HPO_4	1,00 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00 g/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,02 g/l

El pH se ajustó a 2,5 con H_2SO_4 10 N.

Solución B: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 15%

Solución C: agarosa al 2%

Estas tres soluciones se mezclaron en una proporción 2:1:2 (A:B:C:)

II.- Solución A: Medio Norris modificado

K_2HPO_4	0,01 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,40 g/l
MgSO_4	0,80 g/l
KCl	0,20 g/l

El pH se ajustó a 2.5 con H_2SO_4 10 N.

Solución B: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 27,8%

Solución C: agarosa al 2%

Las tres soluciones se mezclaron en la proporción 9:1:10 (A:B:C:)

Para el crecimiento de microorganismos termófilos se empleó el medio de Lindström (Lidström y Sehlin, 1989) según el siguiente procedimiento:

Las placas se realizaron en dos capas cuya composición fue la siguiente:

a.- **Gel de soporte:** (concentración final 2%). Constaba de dos soluciones:

- 1.- 2% (w/v) de Gelrite doble concentrado en agua destilada.
- 2.- Se preparaba el medio 9K x 2 con doble concentración de Mg^{2+} :

$(NH_4)_2SO_4$	6,00 g/l
KCl	0,20 g/l
K_2HPO_4	1,00 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,00 g/l
$Ca(NO_3)_2$	0,02 g/l

Antes de mezclar las soluciones 1 y 2 se añadía a la solución 2:

- 5 mM de tetrionato (concentración final)
- 2 mM de NaCl (concentración final)
- 0,2% de Casaminoácidos o extracto de levadura.

A continuación, cuando la capa inferior estaba perfectamente estabilizada, se preparaba la capa superior cuya composición era la siguiente:

b.- **Capa superior:** (0,4% concentración final)

- 1.- 0,8% de Gelrite en agua destilada. Se esterilizaba en autoclave y se ponía en tubos estériles (4 ml por tubo).
- 2.- Medio 9K x2 de Mg^{2+} se esterilizaba en autoclave y se colocaba en tubos estériles (4 ml por tubo).

Se añadían 100 μ l de cultivo al tubo 1 y se mezclaba inmediatamente con el tubo 2; finalmente, se vertía sobre el gel de soporte. Los tubos y las placas se mantenían a 65°C hasta el momento de ser usados.

También se emplearon placas con medio 9K x2, pero añadiendo tetrionato al 1% o azufre elemental al 0,3%, mezclados con el medio, como fuentes de energía, para el

intento de aislamiento de termófilos moderados a 50°C. El agente gelificante fue agarosa al 2% (1% de concentración final) en ambos casos.

3.3. MATERIAS PRIMAS MINERALES

Los concentrados minerales utilizados como fuente de energía para los microorganismos procedían de las minas de Aznalcollar (Sevilla) y Río Tinto (Huelva). Sus características principales fueron las siguientes:

a) Concentrados diferenciales.- Se trataba de concentrados minerales obtenidos por flotación diferencial a partir de un sulfuro complejo que fueron suministrados por la mina de Aznalcollar. Tenían un tamaño de partícula menor de 74 μm . Los ensayos se realizaron con tres tipos de concentrados diferenciales (concentrado de plomo -CPb-, concentrado de cinc -CZn- y concentrado de cobre -CCu-). También se utilizaron dos concentrados diferenciales de cobre (CCuL y CD1) suministrados por la mina de Río Tinto. El tamaño de partícula original en ambos era superior a 74 μm , por lo que se realizó una molienda manual del mineral, con un mortero, para reducir dicho tamaño.

b) Concentrados globales.- Estos concentrados (B1 y CGRT) se obtuvieron por flotación global directa a partir del sulfuro complejo. Fueron proporcionados por la mina de Río Tinto y su tamaño de partícula era menor de 74 μm .

Se realizó un estudio de caracterización de las principales fases minerales (tabla II) de estos concentrados por difracción de rayos X utilizando un difractómetro Siemens D500. Para cada uno de estos concentrados se realizó también un análisis químico cuantitativo de los principales elementos metálicos que contenían. Los resultados de estos análisis quedan reflejados en la tabla II.

Además de estos concentrados, se utilizaron, para ensayos específicos de biolixiviación, blenda pura (67,092% Zn y 32,91% S) procedente de los Picos de Europa (España) y calcopirita pura (35,3% Cu, 30,1% Fe y 34,7% S) originaria de Transvaal (Sudáfrica).

Tabla II: Concentración (%) de los principales elementos metálicos y fases minerales en los concentrados utilizados en la experimentación. Las fases minerales están numeradas en orden de importancia.

Metal (%)	Concentrados diferenciales					Concentrados globales	
	<i>Aznalcollar</i>			<i>Río Tinto</i>		<i>Río Tinto</i>	
	CCu	CZn	CPb	CCuL	CD1	CGRT	CGB1
Cu	16,12	0,50	1,43	15,70	27,63	14,00	2,20
Fe	31,87	15,00	13,75	17,10	29,70	25,00	19,00
Zn	7,29	40,20	6,25	5,46	0,15	17,10	35,00
Pb	4,83	0,95	45,92	n.d.	0,03	1,70	8,30
	Fases minerales						
	1. CuFeS ₂ 2. CuS ₂ 3. FeS ₂ 4. ZnS 5. PbS	1. ZnS 2. FeS ₂ 3. CuFeS ₂ 4. CuS ₂	1. PbS 2. ZnS 3. FeS ₂ 4. CuFeS ₂ 5. CuS ₂ 6. PbSO ₄	1. CuFeS ₂ 2. FeS ₂ 3. ZnS	1. CuFeS ₂ 2. FeS ₂ 3. SiO ₂	1. CuFeS ₂ 2. ZnS 3. FeS ₂	1. ZnS 2. FeS ₂ 3. CuFeS ₂ 4. PbS

n.d.: no determinado

El concentrado de cobre CCuL, procedente de una operación de flotación, fue lavado para evitar la influencia negativa de los reactivos de flotación en el desarrollo de las poblaciones bacterianas. Para ello, en un matraz, se ponía el mineral recubierto con acetona y se agitaba durante una hora. Posteriormente, se filtraba, lavándolo al mismo tiempo con agua destilada. Finalmente, se dejaba secar a temperatura ambiente.

3.4. ESTERILIZACIÓN

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave, a 121°C, durante 20 minutos y una atmósfera de presión.

Las soluciones minerales fueron esterilizadas por filtración con filtro Millipore de 0.2 μm de diámetro de poro.

Los minerales se esterilizaron mediante calor seco para evitar procesos de oxidación, manteniéndolos a una temperatura de 150°C durante doce horas.

El azufre fue esterilizado por el método de tinalización (Stanier y col., 1984) sometiéndolo a tres procesos alternativos de esterilización a 100°C y de incubación a 37°C.

3.5. ENRIQUECIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Para el aislamiento de los microorganismos se partió de muestras tanto de aguas como de minerales procedentes de las minas de Río Tinto y de Aznalcollar.

Se ensayaron distintos medios (9K, Norris, M1), así como diferentes temperaturas (30, 37, 50 y 70°C) y valores de pH (entre 1 y 6).

A partir de las aguas de Aznalcollar se aisló el microorganismo *Thiobacillus* sp y a partir de las aguas y el mineral de Río Tinto se aislaron los microorganismos termófilo moderado y termófilo extremo, respectivamente.

Las condiciones de cultivo en estos ensayos se fueron seleccionando en función del objetivo del trabajo, es decir, obtener microorganismos que creciesen en condiciones óptimas para la realización de procesos de biolixiviación. Por esta razón, se utilizaron siempre medios para bacterias quimolitótrofas desestimando la utilización de medios para bacterias heterótrofas.

3.6. AISLAMIENTO

Como método de aislamiento se utilizó el sistema de diluciones seriadas, consistente en hacer un banco de diluciones decrecientes (desde 10^{-3} hasta 10^{-9}) en el medio que mejor resultado había dado durante el proceso de enriquecimiento. Del matraz con la última dilución que crecía, se volvía a inocular un nuevo banco de diluciones. El proceso se repitió hasta que las observaciones al microscopio electrónico mostraron un solo tipo de microorganismos en el cultivo.

El método se complementó con siembras en medio sólido de muestras provenientes de los últimos bancos de diluciones realizados. Sólo se obtuvo crecimiento en el caso de microorganismos mesófilos. Colonias aisladas fueron resembradas varias veces y finalmente una de ellas se inoculó nuevamente en medio líquido para mantenimiento del cultivo. Tanto los microorganismos termófilos moderados como los termófilos extremos dieron resultados negativos en los intentos de aislamiento de colonias en placas, por lo tanto, el proceso de aislamiento en éstos se completó únicamente por el método de diluciones.

Para la incubación de los cultivos de microorganismos mesófilos se utilizaron tanto baños termostáticos con agitación (Gyrotory water bath shaker G76, de New Brunswick Scientific), como estufas de cultivo sin agitación (Memmert). Las placas se incubaron a 37°C en el mismo tipo de estufas de cultivo. Los cultivos de termófilos se crecieron en incubadores con agitación (Infors) y sin agitación (Thera Oven).

3.7. MICROSCOPIA ÓPTICA

Se utilizaron microscopios ópticos, con contraste de fases, Olympus y Zeiss Axioskosp. La microscopía óptica fue ampliamente utilizada a lo largo de todo el desarrollo del trabajo, tanto para el control cotidiano de los cultivos como para ensayos específicos con determinadas tinciones o para el control de la adhesión de células al mineral.

a.- Control del crecimiento celular. El seguimiento del crecimiento celular se realizó mediante el conteo directo de células, al microscopio óptico, en una cámara de Thoma de 0,02 mm de profundidad de campo.

b.- Tinciones. Se realizaron tinciones de Gram y de esporas (Stanier y col., 1984) para la caracterización de los microorganismos aislados. Para la visualización de bacterias adheridas a partículas de mineral se utilizó la tinción con DAPI (Huber y col. 1985)

3.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

3.8.1. Microscopía electrónica de transmisión

Se utilizaron sendos microscopios electrónicos de transmisión: Jeol JEM 100B y Jeol JEM 1200EX.

El procedimiento previo de preparación de muestras consistió en la centrifugación de 1 ml de las mismas en un "ependorff" con el fin de concentrar las células. Se desechó casi todo el sobrenadante y se redisolvió el pellet en el líquido restante.

Se depositó una gota de la muestra en un papel de parafina y sobre ella una rejilla (Cu 400 Hx) durante 2 ó 3 minutos. En este período de tiempo se produjo la adsorción de las células a la rejilla. El exceso de líquido se eliminó con un papel de filtro. A continuación, se colocó la rejilla sobre una gota de una solución de tinción de acetato de uranilo al 2%. El exceso de colorante se eliminó mediante el lavado de la rejilla, pasando esta tres o cuatro veces por agua destilada y eliminando el exceso de agua en cada pase por contacto con un papel de filtro. Terminado este proceso de tinción, las muestras estaban preparadas para poder ser vistas.

Los cortes celulares se realizaron por centrifugación del cultivo de microorganismos. El pellet obtenido se resuspendió en agarosa al 6%. Las células incluidas en la agarosa fueron fijadas con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato, lavadas con agua destilada, fijadas con tretróxido de osmio al 1%, deshidratadas en sucesivos pasos con acetona a distintas concentraciones e incluidas finalmente en resina. Los moldes obtenidos, una vez endurecidos, fueron cortados con ultramicrotomo. Se realizó una tinción con acetato de uranilo previa a la observación de los cortes al microscopio electrónico de transmisión.

3.8.2. Microscopía electrónica de barrido

Para la observación por microscopía electrónica de barrido utilizó un microscopio JEOL JSM-6400.

Las muestras se pasaron por un filtro millipore de 0,2 μm de diámetro donde quedaron recogidas las células. Los filtros fueron sometidos a una deshidratación en acetona (punto crítico) y posteriormente metalizados con oro o grafito antes de ser introducidos en el microscopio.

3.9. TOXICIDAD DE CATIONES METÁLICOS

Para la realización de este tipo de ensayos se prepararon disoluciones "stock", en medio 9K a pH 2,0, de las sales metálicas con cada uno de los cationes que se querían estudiar (Ag, As, Co, Cu, Hg, Mo, Zn, V y Mn), a partir de las cuales se realizaron las diluciones a ensayar (tabla III). Las soluciones se añadieron, en condiciones estériles, a tubos de ensayo con medio 9K+S° y 10% (vol/vol) de inóculo procedente del cultivo de mantenimiento, también a pH 2,0. Los tubos se incubaron con una agitación de 100 rpm, a 50°C, durante 25 días. Se realizaron recuentos periódicos de las células en los cultivos como medio de seguimiento del ensayo. Como control, el microorganismo se creció en medio 9K+S° pero sin añadir el catión a estudiar en cada caso.

3.10. INHIBICIÓN POR ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos seleccionados para los experimentos fueron: Kanamicina (Km), Estreptomicina (Sm), Tetraciclina (Tet), Ampicilina (Amp), Eritromicina (Ery) y Cloranfenicol (Cm), todos ellos procedentes de la casa Boehringer Mannheim.

Inicialmente, se prepararon diluciones de cada uno de estos antibióticos en agua destilada estéril. Para poder ver la efectividad de los antibióticos se utilizaron, como controles, bacterias de las cepas *Escherichia coli* TG-1 y *Bacillus subtilis* 110 NA, a los que se añadieron las mismas concentraciones de antibiótico que al microorganismo aislado. Como controles se crecieron las mismas bacterias ensayadas pero sin añadir antibiótico con objeto de evaluar la inhibición del mismo.

Los experimentos se realizaron en tubos de ensayo, con medio 9K + S° en los tubos inoculados con TMRT (10% vol/vol) y con medio LB para los ensayos con *E. coli* y *B.*

subtilis. La temperatura de incubación fue de 50°C para TMRT y 37°C en el resto de las bacterias. La agitación fue, en todos los casos, de 100 rpm. Posteriormente, se prepararon diluciones de los antibióticos a las mismas concentraciones (tabla IV) en medio 9K a pH 2,5. Las condiciones de experimentación fueron las mismas.

3.11. EFECTO DE LAS SALES DEL MEDIO 9K

Se prepararon distintas soluciones del medio 9K, suprimiendo, en cada una de ellas, una de las sales que lo componían. Estas soluciones se ajustaron a pH 2 con H₂SO₄ 10N. Los experimentos se realizaron en tubos de ensayo, con 10 ml de medio 9K modificado en cada uno, y por duplicado, teniendo como controles ensayos inoculados con el medio completo. La fuente de energía fue, en todos los casos, azufre elemental y el inóculo (10% vol/vol) procedía del cultivo de mantenimiento, crecido también sobre azufre. El control de los ensayos se realizó mediante el recuento periódico de células con la cámara de Thoma.

3.12. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN BASES

El contenido en bases se determinó según el procedimiento de Mamur y Doty (1962).

3.13. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS DE MEMBRANA

La determinación de los ácidos grasos que componen la membrana de los microorganismos aislados se realizó según el procedimiento descrito por Van der Auwera y col. en 1986.

3.14. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS

Se pesaban 0,5 mg de las células contra las que se querían conseguir los anticuerpos y se disolvían en 0,5 ml de PBS (1,44 g/l Na₂HPO₄, 0,24 g/l KH₂PO₄, 8 g/l NaCl y 0,2 g/l de KCl, a pH 7,4). Se mezclaban, después, con la misma cantidad de adyuvante incompleto (se utilizaba este adyuvante debido a que las bacterias eran suficientemente antigénicas por ellas mismas para provocar la reacción inmunológica en los conejos) dentro de una jeringuilla

Materiales y Métodos

SAL METÁLICA	METAL	STOCK (mg/l)	CONCENTRACIONES UTILIZADAS (mg/l)									
AgNO ₃	Ag	630	378	315	252	189	126	63	31,5	6,3	0,63	
NaAsO ₂	As	570	342	285	228	171	114	57	28	5,7	0,57	
CoSO ₄ ·7H ₂ O	Co	10490	6294	5245	4196	2137	2098	1049	5245	1049	104	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Cu	12720	7632	6360	5088	3816	2544	1272	636	1272	127	
HgSO ₄	Hg	67	402	33,5	26,8	20,1	13,4	6,7	3,35	0,67	0,06	
Na ₂ MoSO ₄ ·2H ₂ O	Mo	350	210	175	140	105	70	35	17,5	3,5	0,35	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Zn	22470	2252	11235	8988	6741	4494	2247	11235	2247	224	
VSO ₄ ·5H ₂ O	V	210	126	105	84	63	42	21	10,5	2,1	0,21	
MnSO ₄ ·H ₂ O	Mn	320	192	160	128	96	64	32	16,5	3,2	0,32	

Tabla III: Concentraciones utilizadas en los ensayos de determinación de la toxicidad de diferentes cationes metálicos frente al microorganismo TMRT.

ANTIBIÓTICO	SOLUCIÓN STOCK (mg/l)	CONCENTRACIONES UTILIZADAS (mg/l)										
Ampicilina	200	0,1	0,5	1	1,5	3	5	10	25	50	100	-
Eritromicina	200	0,1	0,5	1	1,5	3	5	10	25	50	100	200
Cloranfenicol	200	0,1	0,5	1	1,5	3	5	10	25	50	100	-
Estreptomicina	200	0,1	0,5	1	1,5	3	5	10	25	50	100	-
Kanamicina	200	0,1	0,5	1	1,5	3	5	10	25	50	100	-
Tetraciclina	200	0,1	0,5	1	1,5	3	5	10	25	50	100	-

Tabla IV: Concentraciones de antibióticos utilizadas en los ensayos de determinación de la sensibilidad del microorganismo TMRT frente a distintos antibióticos.

estéril. Se formaban dos fases que eran sometidas a un proceso de sonicación. Cuando las dos fases estaban uniformemente mezcladas, la emulsión estaba lista para ser inyectada. Se utilizaron dos conejos de raza Neozelandesa, 4 meses de edad y aproximadamente 3,3 Kg de peso, para los experimentos. Las células se inyectaban por vía subcutánea (aproximadamente 0,8 ml de emulsión a cada animal). Previamente, se sacaba una muestra de sangre como control. Las inyecciones se repetían cada 15 días aproximadamente durante dos meses y finalmente se sacrificaba el animal y se extraía toda la sangre para obtener el suero con los anticuerpos.

La sangre se dejaba coagular a 37°C durante una hora, se retiraba el suero y el tubo con el coágulo se mantenía en una nevera, a 4°C, para que siguiera destilando el suero. Al día siguiente, se retiraba el coágulo y el suero se centrifugaba para limpiarlo de células sanguíneas. Una vez limpio, se preparaban alícuotas de 1 ml y se guardaban, a -20°C, hasta el momento de ser utilizadas.

Los ensayos con anticuerpos se realizaron utilizando el método ELISA y con inmunodots en filtros de nitrocelulosa (Margni, 1989)

3.15. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE DNA INTACTO

Para la preparación de DNA intacto de los microorganismos aislados (*Thibacillus* sp, TMRT y TERT), así como de los utilizados como controles (*S. solfataricus*, *T. cuprinus*, *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*), se siguió el método descrito por Smith y Cantor en 1987. Se dejó decantar el precipitado, previamente a la centrifugación, para recoger las células, agitándose la solución entre centrifugación y centrifugación, para intentar separar las células de éste.

3.15.1. Digestión del DNA en agarosa

Se siguió el método descrito por Smith y col., en 1988. La digestión enzimática se realizó en tubos "eppendorf" como se indica en la tabla V.

Tabla V: Condiciones para la digestión enzimática. El tampón es específico para cada enzima. BSA es albúmina de suero bovino.

1/3 INSERTO	33 μ l de DNA
TAMPÓN 10X	20 μ l
BSA (20 mg/ml)	1 μ l
ENZIMA	20 unidades/ μ l de DNA
H ₂ O	Hasta 200 μ l

La mezcla de reacción se incubaba durante toda la noche a la temperatura óptima de actuación del enzima.

Para parar la reacción se añadían 25 μ l de 0,5 M EDTA pH 9-9,5; 12,5 μ l de lauril-sarcosina 10%; y 25 μ l de Proteínasa K 10mg/ml, y se incubaba a 50°C durante dos horas.

El sobrenadante de la reacción se recogía porque las bandas más pequeñas podían salir de la agarosa quedando en el líquido. El inserto, a partir de este momento, ya podía ser utilizado en una electroforesis de campo pulsado. Hasta el momento de su uso se guardaban a 4°C.

3.15.2. Condiciones de carrera

El modelo utilizado fue el 2015 Pulsaphor Plus System de LKB consistente en una unidad de control LKB 2015 Pulsaphor Plus Control Unit, una fuente de alimentación LKB 2301 Macrodrive 1 Power supply, una cubeta de electroforesis con electrodos puntuales, dispuestos los tres negativos a 30, 120 y 210 mm de la esquina Norte/Oeste de la caja y los positivos a 60 mm de las esquinas Oeste/Sur y Norte/Este y un baño de refrigeración de Savant Instruments Inc.

Los geles de campo pulsado fueron preparados con agarosa al 1% en TBE 0,5X (50 mM Trizma base; 50 mM H₃BO₃; 0,1 mM EDTA). Durante la electroforesis, los geles fueron mantenidos a 15°C.

Para resolver los distintos fragmentos de DNA obtenidos por el tratamiento con diferentes enzimas de restricción (tabla VI), se necesitaron correr geles a pulsos entre 5 y 100 segundos.

Tabla VI: Enzimas de restricción utilizados y secuencia de corte de los mismos.

ENZIMA	SECUENCIA DE CORTE
Dra I	TTT'AAA
Hind III	T'CTAGA
Bam HI	G'AATTC
Sfi I	GGCCNNNN'NGGCC
Ase I	AT'TAAT
Spe I	A'CTAGT
Eag I	C'GGCCG
Not I	GC'GGCCGC

En la determinación de la topología del cromosoma bacteriano, los geles se corrieron a pulsos de 4500 segundos, durante 169 horas y a una intensidad de 3 V/cm.

3.16. ENSAYOS DE BIOLIXIVIACIÓN

3.16.1. Adaptación de los cultivos

Con el objeto de disponer de los inóculos apropiados para los ensayos de biolixiviación, se operó de la siguiente manera: En matraces de 250 ml se introdujeron 100 ml de medio 9K y 3 g del concentrado mineral que se quería estudiar, todo ello previamente esterilizado y ajustándose el pH inicialmente al óptimo del microorganismo. Cada matraz fue inoculado con 5 ml de un cultivo crecido de microorganismos puros. Estos matraces inoculados se mantuvieron en un incubador con agitación orbital (G25 Incubator Shaker, de New Brunswick Scientific) a 150 rpm y la temperatura apropiada para cada cultivo, hasta que por microscopía óptica se observó una densidad de población microbiana elevada. A partir de ese momento, se repetía nuevamente el proceso inoculando nuevos cultivos con medio y minerales estériles.

3.16.2. Condiciones de experimentación

La experimentación se realizó en condiciones similares a la de los cultivos de adaptación, pero, en este caso, el inóculo de cada ensayo provenía del cultivo del correspondiente microorganismo ya adaptado al mineral objeto de estudio. Tales condiciones experimentales se resumen en la tabla VII.

Además de los ensayos inoculados, se realizaron otros tantos experimentos en las mismas condiciones de trabajo, pero sin inóculo, con el fin de disponer de los correspondientes controles estériles del proceso.

Tabla VII: Condiciones de experimentación en los ensayos de biolixiviación.

	CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN		
	Mesófilos	Termófilos moderados	Termófilos
Reactor (erlermeyers)	250 ml	250 ml	250 ml
pH	2,5	2,0	2,0
Temperatura	37°C	50°C	68,5°C
mineral	5 g	3 g	3 g
agitación	150 rpm	150 rpm	100 rpm
Medio	9K (150 ml)	9K (100 ml)	9K (100 ml)
inóculo	5%	5%	5%

El seguimiento de los ensayos se llevó a cabo de la siguiente manera: Periódicamente, y después de reponer con agua destilada estéril el líquido evaporado, se procedía a la toma de muestra de 1 ml de solución. Antes de recoger la muestra, se dejaba sedimentar el mineral del cultivo con el objeto de no retirar parte sólida. Una vez tomada la muestra, se reponían las correspondientes condiciones de cultivo. Las muestras, convenientemente diluidas, eran posteriormente analizadas por espectrofotometría de absorción atómica en los elementos metálicos de interés.

Una vez terminado el ensayo, el contenido de los reactores se filtraba, lavando repetidamente con agua destilada el residuo sólido retenido en el filtro, el cual, cuando estaba totalmente seco, era analizado por difracción de rayos X.

3.17. DETERMINACIÓN DE METALES EN LAS SOLUCIONES

En los ensayos de biolixiviación se determinaron las concentraciones de Cu, Zn y Fe total por espectrofotometría de absorción atómica. El espectrofotómetro fue Perkin-Elmer 1100B. El atomizador fue un mechero de llama de aire-acetileno y como fuente de radiación primaria se utilizó una lámpara de cátodo hueco con argón a baja presión, y cátodos de cinc, cobre y hierro, respectivamente.

Las longitudes de onda y los patrones de concentración con los que se trabajó fueron:

Metal	Longitud de onda (nm)	Patrones de concentración (ppm)
Cobre	324,8	5,15,30
Cinc	213,9	1,3,6
Hierro	248,3	5,15,30

En el momento de realizar el análisis de las muestras problema, se hubo de conseguir una dilución adecuada de tal manera que la concentración del elemento quedase en la zona de la curva de calibrado en la que había linealidad.

Por otra parte, para la determinación de Fe^{2+} , se empleó la técnica de fotolorimetría usando ortofenantrolina como reactivo colorimétrico (Herrera y col., 1989). El equipo utilizado fue un colorímetro Metrohm, modelo 662, a una longitud de onda de 510 nm. La concentración de Fe^{3+} se obtuvo por diferencia entre el Fe total (determinado por absorción atómica) y el Fe^{2+} .

3.18. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Es la técnica mas usada para la identificación de los compuestos químicos mediante la interpretación del correspondiente diagrama de difracción. Este, es función de la composición y estructura atómica del sólido según la ordenación de sus átomos, siendo distintivo y característico para cada compuesto. La caracterización del diagrama de difracción obtenido se define por la localización y medida de las intensidades de las líneas en el mismo.

Se utilizó un difractómetro Siemens D500, conectado a un DACO. Los residuos de los ensayos de biolixiviación, una vez secos y totalmente pulverizados, se colocaron en un portamuestras que se introducía en el difractómetro. Las condiciones de trabajo fueron:

- Ánodo: Cu, λ_1 : 1,54051, λ_2 : 1,54443
- Tamaño de paso: 0,07
- Sensibilidad (Impulsos/seg./cm): 35
- Monocromador de grafito

3.19. ENSAYOS DE ADHESIÓN DE CÉLULAS AL MINERAL

Para la realización de estos ensayos, se tomaron muestras de los distintos cultivos que estaban creciendo sobre los mismos concentrados minerales que los utilizados en los experimentos de biolixiviación.

Las muestras se sometieron a un pulso de centrifugación, en una centrífuga de mesa, con el fin de precipitar todo el mineral de la muestra. Este, se pesaba, mientras que en el sobrenadante se contaban las bacterias presentes mediante una cámara de Thoma. Estas células representaban la fracción de células libres presentes en el cultivo. El mineral recogido se lavaba con el mismo medio de cultivo utilizado (9K) y tras una breve agitación se volvía a someter a un pulso de centrifugación, realizándose de nuevo la operación de recuento celular. En este caso, el número de células obtenido representaba la fracción celular que estaba atrapada entre los espacios intersticiales del mineral. El mineral se volvía a lavar con una solución de Tween 20 al 0,1 % en medio 9K (vol/vol), se agitaba brevemente y se volvía a centrifugar. Este detergente afectaba a las estructuras de la pared celular de tal manera que

en el sobrenadante se podían contar las bacterias que estaban adheridas de forma más o menos fuerte al mineral. Finalmente, se hacía otro lavado con Tween 80 al 0,1% en medio 9K (vol/vol) y se volvían a contar las células presentes en el sobrenadante después de agitar y centrifugar la muestra. En este lavado se conseguían eliminar las bacterias que estaban adheridas más fuertemente al mineral. Se realizaron más lavados posteriores con esta última solución pero el número de bacterias que se obtenía era prácticamente nulo, por lo que se consideró que el mineral ya estaba libre de bacterias. Para asegurar esto, se realizaron tinciones del mineral con DAPI, que teñía específicamente las bacterias y permitía distinguirlas si estaban adheridas a partículas de mineral.

3.20. ESTUDIO DE PROBETAS

Se realizaron probetas de muestras masivas con calcopirita pura procedente de Transvaal (Sudáfrica). El fin era estudiar la posible especificidad del microorganismo aislado TMRT hacia los sulfuros de cobre. La calcopirita, en forma de partículas de gran tamaño ($> 0,5$ cm de diámetro) fue montada sobre una resina (Castolite Resin, de Buehler). Las probetas así obtenidas eran desbastadas en diferentes condiciones para obtener una superficie plana. Más tarde, eran pulidas mecánicamente con alúmina y, por último, acabadas mediante pulido manual con sílice. Una vez pulidas, se introducían en un matraz con 95 ml medio 9K a pH 2 y se añadan 5 ml de un inóculo puro del microorganismo aislado TMRT. No se añadía ningún tipo de fuente energética adicional. Las condiciones de incubación fueron las óptimas para el microorganismo (150 rpm de agitación y 50°C). Se realizaba otro ensayo en las mismas condiciones pero sin inóculo bacteriano como control del experimento. Las probetas se mantenían en estas condiciones durante 50 días. Después de este tiempo, y previa metalización, se analizaban mediante microscopía electrónica de barrido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los procesos de biolixiviación tienen todavía una serie de problemas que resolver para poder ser aplicados a escala industrial en una mayor proporción de lo que están siendo utilizados actualmente. Uno de estos problemas es el escaso conocimiento de los procesos biológicos básicos que tienen lugar en el sistema. Las complejas interacciones entre los distintos microorganismos que componen el ecosistema biolixivante tienen que ser estudiadas, pero es difícil entender las relaciones entre las distintas especies cuando aún no son bien conocidas todas las características y propiedades de las propias especies aisladas, e incluso muchas de las especies de microorganismos que participan en el proceso están todavía sin identificar. Por tanto, la aplicabilidad a escala industrial debe pasar por realizar esfuerzos importantes a nivel de investigación de estos procesos básicos. Por estas razones, este trabajo se ha centrado en el intento de aislamiento de distintas especies bacterianas a partir de muestras de aguas de minas y, dentro de estas, en el aislamiento de bacterias quimiolitótrofas. Este tipo de microorganismos, a pesar de las dificultades de trabajo que presenta su aislamiento frente a bacterias heterótrofas u hongos, también presentes en las muestras de aguas, es más interesante debido a su mayor potencial en procesos de biolixiviación.

Dentro de este trabajo de aislamiento, se pretendió, por ser un objetivo comentado por diversos autores como una solución a los problemas de la biolixiviación, el encontrar microorganismos capaces de desarrollarse y oxidar sulfuros minerales a temperaturas elevadas.

Como resultado de estos ensayos se aislaron tres bacterias que abarcan un amplio rango de temperaturas: una bacteria mesófila, una termófila moderada y una termófila extrema.

Sobre los tres microorganismos aislados se realizaron diferentes pruebas encaminadas a su caracterización, aunque el trabajo principal dentro de este apartado se centró en la especie termófila moderada, debido a que este tipo de bacterias son las grandes desconocidas de los procesos de biolixiviación, con muy pocas especies caracterizadas taxonómicamente, lo que añade al aspecto puramente práctico de resolución de problemas de la biolixiviación, un indudable interés científico.

La caracterización de este microorganismo se realizó mediante su estudio morfológico y fisiológico, así como a través de una serie de pruebas bioquímicas para facilitar su ubicación taxonómica. Una vez realizada la caracterización, se realizaron una serie de pruebas de biolixiviación a escala de laboratorio. Este tipo de ensayos estuvo encaminado a comprobar que las bacterias seleccionadas en el proceso de aislamiento eran realmente aptas para la biolixiviación. Para ello, se comprobó la capacidad de extracción metálica de los distintos microorganismos aislados en presencia de sulfuros minerales complejos procedentes de minas de la Franja Pirítica del Suroeste de la Península Ibérica.

Durante la realización de estos ensayos se pudo observar una cierta especificidad por parte del microorganismo termófilo moderado en la extracción de cobre frente a otros cationes metálicos presentes en el mineral. Esta es una propiedad de gran interés en los procesos de biolixiviación, puesto que permite una recuperación selectiva de los metales, lo cual puede suponer un importante ahorro en el coste de los procesos posteriores de concentración de las soluciones de lixiviación por la fácil separación de los diferentes cationes presentes en la misma. Esta propiedad había sido descrita anteriormente en otro microorganismo aislado de aguas de mina, *T. cuprinus*, pero no se había comprobado sobre minerales naturales como en el presente caso.

Los ensayos de biolixiviación también sirvieron para comparar la actuación de los diferentes microorganismos aislados con la de los cultivos mixtos naturales presentes en el agua de la mina y, por otra parte, para comparar la eficacia de la biolixiviación en trabajos con especies puras trabajando a distintas temperaturas.

4.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

4.1.1. Muestras de partida

El trabajo de aislamiento de microorganismos se llevó a cabo a partir de una muestra de agua procedente de una balsa de lixiviación de la mina de Río Tinto (Huelva) y de un cultivo mixto procedente de la mina de Aznalcollar, Sevilla (CMA).

Estas muestras fueron observadas por microscopía óptica y electrónica, pudiendo detectarse diferentes tipos de bacterias, así como la presencia de algas y hongos en la muestra de agua procedente de Río Tinto. Debido a que los procesos de biolixiviación están básicamente estudiados con bacterias, se desechó la posibilidad de intentar crecer tanto los hongos como las algas, centrándose los intentos de aislamiento en aquellas y más concretamente en las que mostrasen características más acordes con las propias de los procesos de biolixiviación, es decir, condiciones de pH reducido, presencia de cationes metálicos a concentraciones elevadas y, principalmente, la capacidad de crecer autotróficamente.

4.1.2. Enriquecimiento de las muestras

Como primer paso, se procedió al enriquecimiento de los cultivos en bacterias quimiolitótrofas. Para ello, se inocularon 5 ml de las muestras originales en erlenmeyers de 250 ml con 95 ml de distintos medios específicos para bacterias lixiviantes. Las condiciones iniciales de cultivo fueron 37°C, 100 rpm de agitación y un pH inicial de 2. Estas condiciones se escogieron por ser las más utilizadas en los procesos de biolixiviación llevados a cabo en nuestro laboratorio. Los medios utilizados para el enriquecimiento fueron medio 9K y medio Norris, por las mismas razones.

Cada uno de estos medios se suplementó con distintas fuentes energéticas, principalmente hierro y azufre elemental, aunque también se añadió, en algunos casos, extracto de levadura o glucosa debido al interés en obtener bacterias heterótrofas facultativas que presentan una serie de ventajas en relación a su estudio con las quimiolitótrofas estrictas, principalmente una mayor facilidad de crecimiento (tabla VIII).

Periódicamente, se extraían muestras de los cultivos y se observaban por microscopía para determinar su estado, así como el número de bacterias presentes en el mismo y sus distintas morfologías. Cuando se observaba un estancamiento del crecimiento bacteriano, se procedía a dar un nuevo pase al cultivo en las mismas condiciones anteriores.

Los mejores resultados (determinados por las densidades de población bacteriana), en ambas muestras, se obtuvieron con el medio 9K suplementado con Fe^{2+} o con azufre elemental. Las morfologías bacterianas observadas en estos cultivos correspondían, en su mayoría, a bacilos del tipo *Thiobacillus* aunque también se podían observar bacterias del tipo *Leptospirillum* y algunos cocos.

Tabla VIII: Condiciones iniciales de cultivo en el proceso de enriquecimiento de las muestras originales. (n.d.) no determinado; (+) crecimiento positivo; (-) ausencia de crecimiento.

	Aguas de Río Tinto		Cultivo mixto Aznalcollar	
	9K	Norris	9K	Norris
S°	+++	++	+++	++
Fe ²⁺	+++	++	+++	+++
S° + Extracto de levadura	++	+	++	+
S° + Glucosa	+	+/-	+/-	+/-
Tetracionato	-	-	n.d.	n.d.
Mineral	++	+	+++	+++

Sin embargo, en las muestras de Río Tinto, los ensayos con 9K + S° presentaban una mayor uniformidad de tipos bacterianos que los ensayos con 9K + Fe²⁺. Debido a esta razón, y para completar el proceso de enriquecimiento en los cultivos de un solo tipo de bacterias, se continuaron los ensayos únicamente a partir de los cultivos crecidos sobre 9K + S°. Para ello, se volvieron a inocular 5 ml sobre medio 9K con azufre elemental, pero a distintos valores de pH y a distintas temperaturas (37°C y 45°C).

Nuevamente, se efectuó un control periódico mediante microscopía óptica y electrónica para determinar en cual de los ensayos había una mayor uniformidad del tipo de bacterias presentes. En todos los casos en los que se obtuvo crecimiento bacteriano, se volvieron a inocular nuevos ensayos con el medio 9K con distintas fuentes energéticas.

Como resultado de estos nuevos ensayos, se obtuvo un cultivo bacteriano crecido sobre 9K+S^o a 45°C y pH 1,5 en el que predominaba casi totalmente un tipo de bacterias de morfología bacilar pero ligeramente diferente de la del género *Thiobacillus*. Estas condiciones, muy adecuadas para los procesos de biolixiviación, hicieron que el proceso de aislamiento se iniciase a partir de este cultivo.

En el caso de los ensayos inoculados con el cultivo CMA, los mejores resultados se obtuvieron sobre medio 9K suplementado con Fe²⁺ al 4%. En estos cultivos, en los que inicialmente se observaban morfologías similares a las de las bacterias del género *Thiobacillus* y *Leptospirillum*, al cabo de varios pases, desaparecía la segunda, pudiéndose observar únicamente microorganismos bacilares muy similares a *T. ferrooxidans*. A partir de estos cultivos, se continuó el trabajo de enriquecimiento y de aislamiento.

Posteriormente, en ensayos de lixiviación utilizando mineral de cobre de Río Tinto sin esterilizar, se consiguió un cultivo mixto con presencia de distintos microorganismos termófilos moderados. A partir de este cultivo mixto y por sucesivos pases en los que se elevó la temperatura de incubación hasta 68,5°C, se logró obtener un cultivo enriquecido en bacterias termófilas, de morfología similar a la del género *Sulfolobus*. Estos cultivos fueron la base para el intento de aislamiento de bacterias termófilas de Río Tinto.

4.1.3. Aislamiento de bacterias

El aislamiento de bacterias quimiolitótrofas presenta grandes dificultades para poder ser realizado por medios convencionales de crecimiento de colonias aisladas en placas de Petri sobre medio sólido. Estas dificultades se acentúan cuando las bacterias crecen a un pH por debajo de dos y cuando la temperatura supera los 40°C. Por estas razones, inicialmente, se eligió como sistema de aislamiento el método de diluciones límite (descrito en materiales y métodos), para los microorganismos termófilos moderados procedentes de Río Tinto.

En el caso del aislamiento de microorganismos mesófilos hierro-oxidantes, este método se completó con ensayos de crecimiento en placas. En los casos en que se obtuvo resultado positivo, las colonias fueron repicadas varias veces en placas y, posteriormente, una

colonia aislada se traspasó de nuevo al medio líquido 9K suplementado con Fe^{2+} , como fuente de energía, y a un pH inicial de 2,5.

Los bancos de diluciones se repitieron 8 veces, siempre inoculando cada nueva serie a partir de la última dilución que crecía. La dilución, a partir de la que se realizaba el inóculo, se controlaba por microscopía óptica y electrónica. La inoculación de una nueva serie de diluciones se realizaba en el momento en el que el cultivo con la última dilución que había crecido presentaba una densidad de población elevada. Después de 6 series de diluciones, con una duración aproximada por serie de 21-24 días, ya se observaba un único tipo de microorganismos presentes en los cultivos, aunque se realizaban dos pases más para asegurar el total aislamiento de la bacteria.

Con los microorganismos termófilos procedentes del cultivo mixto de Río Tinto, el método de aislamiento fue por diluciones sucesivas, pero debido a las restrictivas condiciones de crecimiento ($68.5^{\circ}C$ de temperatura, pH 2 y minerales de sulfuros complejos como fuente de energía) en tres pases ya se observó un único tipo de bacterias en los cultivos. También se intentó el crecimiento de estos microorganismos termófilos en placas; sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos en ningún caso.

El resultado de estos experimentos fue la obtención de tres cultivos puros de microorganismos, capaces de crecer a tres temperaturas distintas, y a partir de los cuales se realizaron todos los experimentos posteriores de caracterización y de biolixiviación.

Como ya se ha comentado, el mayor esfuerzo dentro de este trabajo se ha dedicado a la caracterización del microorganismo termófilo moderado. Esto se debió al hecho, entre otros, de que esta especie bacteriana demostró, en los primeros ensayos de biolixiviación sobre sulfuros complejos minerales, una gran especificidad hacia las especies de cobre. Este hecho todavía no se ha descrito con claridad en ningún otro tipo de microorganismos, lo que aumenta el interés del trabajo. Además, los microorganismos termófilos moderados son mucho más desconocidos y su posible utilización en procesos de biolixiviación es una interesante alternativa al empleo de microorganismos mesófilos por trabajar a una temperatura más elevada, lo que implica un aumento de la cinética global del proceso y, por

otra parte, no requiere de un gasto de energía tan elevado como en los sistemas en los que las bacterias utilizadas son termófilos extremos. Por estas razones, la mayor parte de las pruebas de caracterización, así como gran parte de los ensayos de biolixiviación, se realizaron con este microorganismo y no con los otros aislados.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

4.2.1. Caracterización morfológica

Se realizó mediante microscopía electrónica (tamaño, forma, presencia de flagelos y cortes celulares) y microscopía óptica (tinciones de Gram y de esporas, movilidad y agrupaciones de bacterias).

Los estudios de microscopía óptica y electrónica (figura 4A) mostraron que el *Thiobacillus* sp. era un bacilo alargado (aproximadamente $0,5 \times 1 \mu\text{m}$). Generalmente eran individuos aislados pero en ocasiones aparecían cadenas de dos o tres bacterias. Eran móviles, con un flagelo polar, Gram negativos y no presentaban esporas.

El microorganismo termófilo moderado TMRT (figura 4B) era de tipología bacilar ($0,5 \times 1,5\text{-}2 \mu\text{m}$) con un flagelo polar (figura 5). La forma no era regular sino que presentaba una envuelta celular con un contorno con muchas irregularidades (figura 6). En el interior de la envuelta se observaban formas también irregulares y mucho más electrodensas al microscopio electrónico de transmisión. Formaba, a veces, pequeñas cadenas de dos a cuatro individuos pero en su gran mayoría se presentaban como células aisladas, con gran movilidad. No presentaba esporas y era Gram negativo.

Las bacterias termófilas extremas (TERT) eran cocos esféricos, de un tamaño aproximado de $1 \mu\text{m}$ de diámetro y bastante regulares. La tinción de Gram no daba un resultado claro. No presentaban esporas. Al microscopio óptico, se observaba una elevada motilidad de estas bacterias pero no pudo detectarse ningún tipo de flagelo o cilios en las observaciones por microscopía electrónica (figura 4C).

La microscopía electrónica de barrido confirmó las observaciones anteriormente mencionadas en cuanto a forma y tamaño para los tres microorganismos aislados

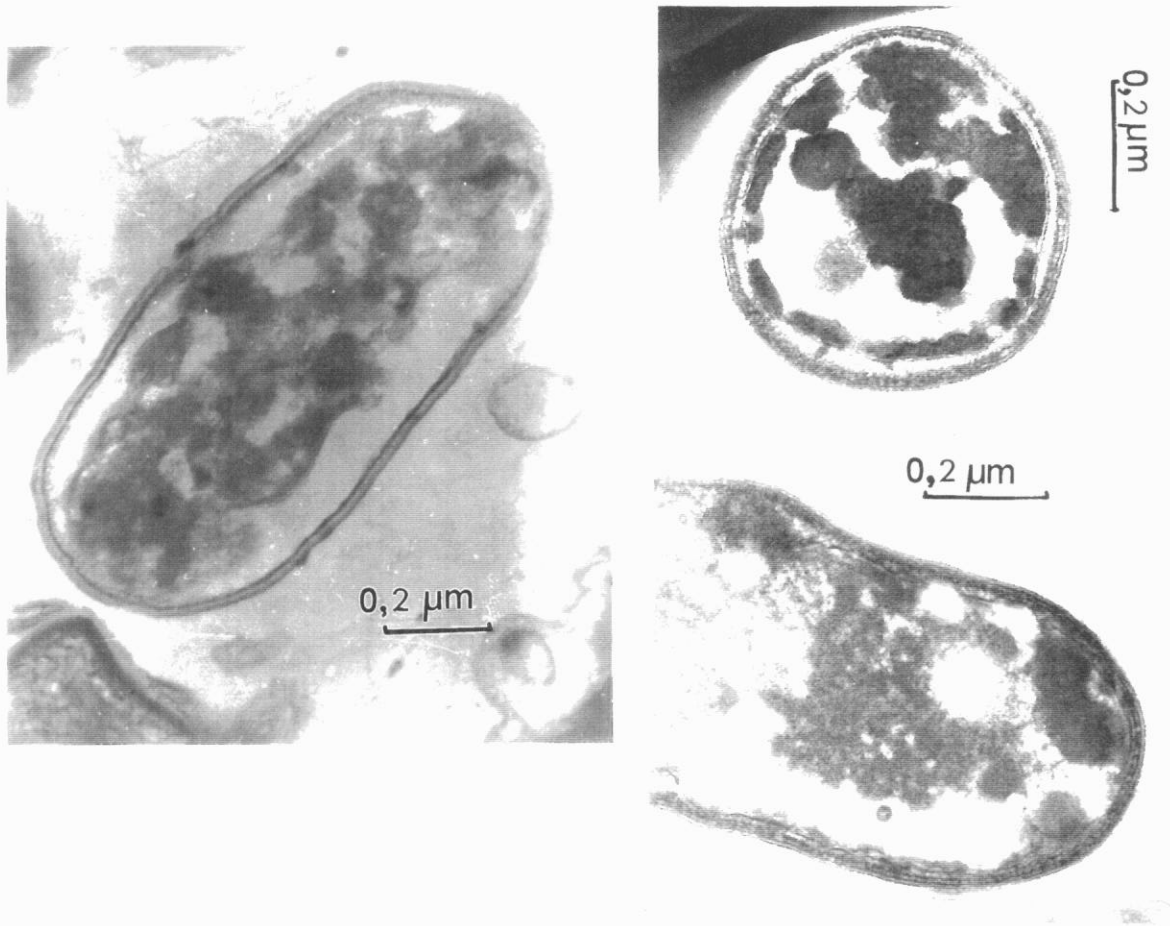


Figura 6: Fotografías de distintos detalles de cortes celulares del microorganismo aislado TMRT

4.2.2. Caracterización fisiológica

Agitación del cultivo.- Se observaron grandes diferencias en el tiempo de crecimiento de los cultivos al comparar ensayos mantenidos en estufas de cultivo sin agitación o en incubadores agitados. En el caso de los termófilos TMRT y TERT, los mejores resultados de crecimiento se obtuvieron con agitaciones del orden de 100 rpm. Por encima de las 150 rpm, el crecimiento fue mucho menor, posiblemente debido a fenómenos de atrición con las partículas de azufre elemental o mineral. El microorganismo mesófilo creció mejor con agitaciones altas, por encima de las 150 rpm, debido a que en el medio de cultivo no había partículas sólidas.

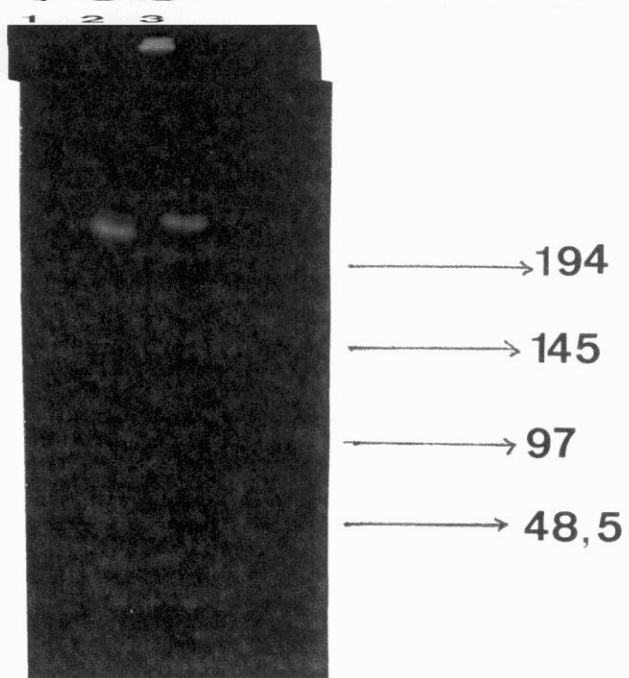


Figura 11: Comparación de los patrones de restricción de TERT (1) y *S. solfataricus* (2) obtenidos con el enzima Eag I.(3) concatémeros de fago lambda. Las condiciones de carrera fueron 10 segundos de pulso a 330 V/cm durante 36 horas.

Fuentes de energía.- Se inocularon matraces de 100 ml con 30 ml de medio 9K, utilizando en cada caso una fuente de energía diferente (Tabla IX).

En los ensayos inoculados con TMRT, los mejores resultados se obtuvieron con S° como fuente de energía. No se obtuvo crecimiento al utilizar fuentes de energía orgánicas, pero si estas estaban suplementadas con azufre elemental, sí que se observaba un pequeño crecimiento del cultivo, posiblemente debido a la presencia de la fuente inorgánica.

Tabla IX: Utilización de distintas fuentes de energía en los microorganismos aislados. (+) crecimiento; (-) ausencia de crecimiento; (n.d.) no determinado.

	TMRT	TERT	<i>Thiobacillus</i> sp.
S°	+++	+	++
Fe ²⁺	-	+	+++
S° + Extracto de levadura	+	n.d.	+/-
S° + Glucosa	+/-	n.d.	-
Mineral	++	+++	++
Tetrionato	-	n.d.	-
Glucosa	-	n.d.	-
Extracto de levadura	-	n.d.	-
Tiosulfato	-	n.d.	-

El crecimiento no era en estos casos muy grande, lo que podría indicar una ligera inhibición del crecimiento por parte de las sustancias orgánicas. Tampoco se obtuvo crecimiento con compuestos de azufre como el tetrionato o el tiosulfato, pero sí con mineral (sulfuros metálicos naturales).

En el caso del *Thiobacillus* sp., los mejores resultados se obtuvieron con el crecimiento en presencia de Fe²⁺ como fuente de energía, pero también se observaron altos

rendimientos celulares en cultivos crecidos con azufre y mineral. Sobre sustancias orgánicas y otros compuestos de azufre los resultados fueron negativos.

El microorganismo termófilo TERT creció muy bien sobre minerales y también fue capaz de hacerlo, aunque con bajas poblaciones de bacterias, sobre hierro y azufre.

Medio óptimo.- Se realizaron ensayos en matraces de 100 ml con 30 ml de los distintos medios elegidos (9K, Norris, M1). En todos los casos, la fuente de energía añadida fue aquella en la que se obtenían mejores rendimientos celulares: S^o, Fe²⁺ y mineral para TMRT, *Thiobacillus* sp. y TERT, respectivamente (Tabla X).

Los mejores resultados, para los tres microorganismos aislados, se obtuvieron con el medio 9K.

En todos los casos, se dieron varios pases a los cultivos sobre los nuevos medios ensayados para evitar los efectos de la adaptación del cultivo original al medio 9K.

Tabla X: Determinación del medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos aislados.(+) crecimiento; (-) ausencia de crecimiento; (n.d.) no determinado.

Medio	TMRT	TERT	<i>Thiobacillus</i> sp
9K	+++	+++	+++
Norris	+	++	+
M1	+/-	n.d.	+/-

pH inicial.- Para determinar el pH óptimo de crecimiento, se realizó un banco de pruebas a diferentes valores de pH. Los resultados obtenidos están representados en la figura 7A.

Thiobacillus sp. tuvo un crecimiento óptimo en un rango de pH de 2 a 2,5, en presencia de Fe^{2+} , mientras que TMRT creció en un rango óptimo cercano a 2, en presencia de S° .

Estos ensayos no se realizaron con TERT; sin embargo, en los experimentos de biolixiviación creciendo sobre mineral, se observó un carácter más acidófilo por parte de este microorganismo que por parte de los otros dos aislados.

Los tres aislados, al igual que la mayor parte de microorganismos lixiviadores, acidificaron el medio debido a la formación de ácido sulfúrico en el proceso de oxidación de sulfuros. En el caso de TMRT, se produjo una bajada del pH del medio hasta 0,8. Se observó que cuando el pH inicial del medio era superior a 4,5 no se producía crecimiento del microorganismo.

Temperatura óptima.- Para la realización de estos ensayos se prepararon distintos matraces de 100 ml con 30 ml de medio 9K al pH óptimo para cada microorganismo y con la fuente de energía adecuada. Se inocularon con 5 ml procedentes del cultivo de mantenimiento. Se dieron a los cultivos dos pases previos en las condiciones de temperatura elegidas para estos ensayos. El resultado de estos ensayos se puede observar en la figura 7B.

Para TMRT se apreció un mejor desarrollo de la población bacteriana en el entorno de los 48-50°C. Por encima de estos valores de temperatura, la población bacteriana descendió drásticamente, siendo prácticamente nula al alcanzar los 58°C. Por debajo de los 30°C no se observó crecimiento del cultivo bacteriano, pero tampoco una disminución del número de células, pudiéndose mantener los cultivos a temperatura ambiente durante períodos prolongados de tiempo sin que perdieran su actividad al devolver los cultivos a sus condiciones óptimas.

Para *Thiobacillus* sp. la temperatura óptima de crecimiento fue de 37°C. Por encima de los 40°C disminuyó mucho la población del microorganismo.

También fue capaz de permanecer largo tiempo a temperatura ambiente sin experimentar un desarrollo apreciable de la población, pero sin perder la actividad al retornarlo a las condiciones óptimas de cultivo.

El microorganismo aislado TERT creció bien a temperaturas que oscilaron entre los 50°C y 70°C, aunque se encontró como temperatura óptima de crecimiento una en torno a los 68°C. Al igual que los otros microorganismos aislados, pudo permanecer largos períodos de tiempo a temperatura ambiente sin perder su capacidad de crecimiento.

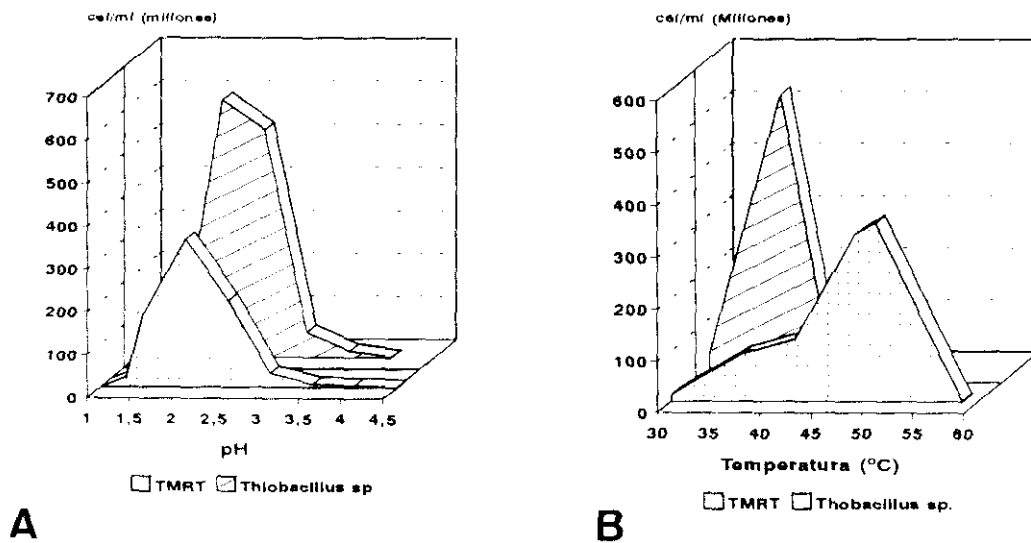


Figura 7: Capacidad de crecimiento de los microorganismos aislados TMRT y *Thiobacillus* sp. en diferentes condiciones de pH (A) y temperatura en °C (B)

Inhibición del crecimiento por antibióticos.- La susceptibilidad de un microorganismo hacia determinados antibióticos es una herramienta muy útil para la selección de cepas dentro de una misma especie, así como para facilitar posteriores trabajos de manipulación genética con estas cepas. Con estos fines, se realizaron ensayos de inhibición de crecimiento bacteriano por antibióticos según se ha descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados, al cabo de tres días de incubación de *E. coli* y *B. subtilis*, están representados en la tabla XI. Con TMRT, debido a su mayor tiempo de generación, los resultados se obtuvieron tras 18 días de incubación.

Tabla XI: Concentraciones de antibióticos inhibitorias del crecimiento de los distintos microorganismos utilizados. (n.i.): no inhibe el crecimiento

	Concentración de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$)					
	Km	Sm	Tet	Amp	Ery	Cm
<i>E. coli</i>	10	<25	3	<25	<25	5
<i>B. subtilis</i>	1,5	3	3	0,5	0,5	3
TMRT	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

En vista de los resultados, en los que se podía determinar que antibióticos tenían efecto inhibitorio sobre las bacterias crecidas a pH neutro, pero no sobre el microorganismo aislado, se realizaron pruebas de estos mismos antibióticos aumentando las concentraciones, aunque las diluciones de estos se realizaron a pH 2,5. En estos ensayos se utilizaron TMRT y, como bacteria de referencia, sólo se utilizó *E. coli*, ya que había demostrado tener una mayor resistencia a los antibióticos que *B. subtilis*, así como cultivos de TMRT sin antibiótico. El pH inicial de los cultivos de TMRT se varió de 2 a 2,5. El resultado mostró que de los seis antibióticos, tres quedaban afectados por el pH y, por lo tanto, no son aplicables en trabajos con bacterias acidófilas. El resultado de estos nuevos ensayos está reflejado en la tabla XII.

Tabla XII: Concentraciones inhibitorias de los antibióticos preparados a pH 2,5. (n.i.): no inhibe el crecimiento.

	Concentración de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$)					
	Km	Sm	Tet	Amp	Ery	Cm
<i>E. coli</i>	10	25	n.i.	25	n.i.	n.i.
TMRT	100	100	n.i.	100	n.i.	n.i.

Como se desprende de los valores de la tabla, la bacteria aislada, mostró una notable capacidad de resistencia frente a los antibióticos en comparación con *E. coli*.

Existe poca bibliografía en cuanto al uso de antibióticos sobre bacterias relacionadas con la biolixiviación y los pocos datos encontrados difieren bastante con respecto a los obtenidos con este nuevo microorganismo aislado, como puede verse en la tabla XIII, lo que supone, en principio, una nueva prueba en favor del hecho de estar frente a una especie no descrita con posibilidades para su aprovechamiento tecnológico.

Tabla XIII: Datos bibliográficos referentes a la inhibición de antibióticos en distintas bacterias presentes en procesos de biolixiviación. (-) sin datos disponibles.

	Concentración de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$)					
	Km	Sm	Tet	Amp	Ery	Cm
<i>T. ferrooxidans</i> ^a	>250	>250	-	-	-	62,5
<i>Ps. fluorescens</i> ^b	-	25	-	50	-	32
<i>Ps. aeruginosa</i> ^b	50	-	12,5	50	-	-
<i>Ps. cepacia</i> ^b	-	-	12,5	50	-	25
<i>T. cuprinus</i> ^c	-	-	-	1	-	-

a)Pichuantes y col., 1986; b)Ahmad y col., 1987; c)Huber, Stetter. 1990

Toxicidad de cationes metálicos.- Las soluciones resultantes de los procesos de biolixiviación están muy concentradas en cationes metálicos, normalmente muy tóxicos para una gran mayoría de las especies bacterianas, y esto supone un fuerte impedimento para la utilización biotecnológica de algunas bacterias que previamente podrían haber mostrado interesantes perspectivas. Por lo tanto, una de las principales características que se les debe exigir a los microorganismos que participen en procesos de biolixiviación es una alta capacidad de resistencia frente a estos cationes.

Los resultados obtenidos tras el período de incubación están representados en la gráfica 8. Se puede observar que los elementos menos tóxicos fueron el cinc, cobre y

cobalto. Estos resultados son lógicos desde el punto de vista de la procedencia del microorganismo, es decir, una balsa de lixiviación donde las concentraciones de estos elementos (exceptuando el cobalto) son muy altas y, por lo tanto, el microorganismo debe estar adaptado a las mismas.

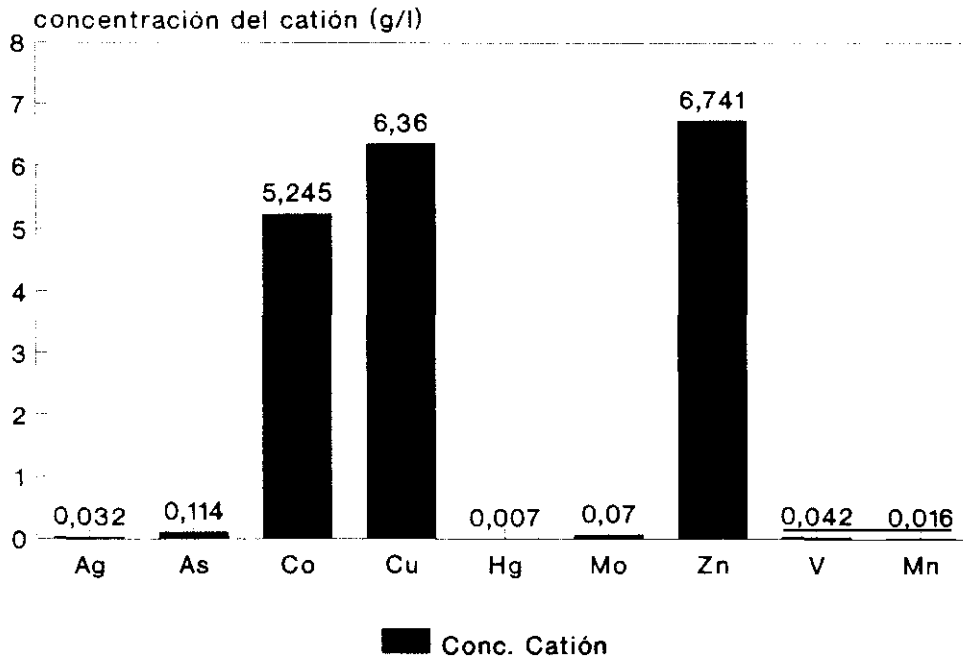


Figura 8: Determinación de la toxicidad de distintos cationes metálicos frente a TMRT.

Si comparamos esta toxicidad con la provocada por estos elementos sobre otros microorganismos lixiviantes (tabla XIV), podemos observar que TMRT presenta una gran resistencia frente a potentes venenos biológicos como la plata y el mercurio, dos elementos muy tóxicos para la mayoría de las bacterias. En los dos casos, pero especialmente con la plata, las diferencias con el resto de las otras bacterias lixiviantes son muy importantes; este hecho es una ventaja adicional del microorganismo aislado, frente a otros microorganismos, para su posterior intento de aplicación a procesos industriales.

Es importante también el hecho de presentar una gran resistencia frente al cobre, comparable a la de *T. ferrooxidans*, el microorganismo más utilizado para la recuperación

de cobre a nivel industrial, y superior a la del resto de los otros microorganismos comparados.

Tabla XIV.- Concentraciones de metales pesados inhibitorias del crecimiento de distintos microorganismos. (-): sin datos disponibles.

	Concentración de cationes (mM)								
	Ag	As	Co	Cu	Hg	Mo	Zn	V	Mn
TMRT	0,29	1,5	89	100,08	0,034	0,73	103,10	0,82	0,29
<i>T.ferrooxidans</i>	0,0005	< 2,6	> 169,7	100	0,00025	0,25	-	-	-
<i>T.thiooxidans</i>	-	-	-	> 0,1	-	0,5	3,05	-	-
<i>L.ferrooxidans</i>	0,005	< 1,3	-	1	0,00025	1	10	-	-
<i>M. sedula</i>	> 0,09	> 1,3	1,7	79	0,05	1	> 150	-	-
BC1	0,0011	-	-	50	0,0025	0,5	-	-	-
<i>Sulfolobus</i> BC	0,0001	20	-	75	0,005	1	-	-	-

Utilización de sulfuros minerales puros.- Uno de los principales objetivos del presente trabajo era la aplicación de los microorganismos que se fueran aislando a la biolixiviación de minerales. Normalmente, los minerales tratados en procesos de biolixiviación son sulfuros de muy diversa índole. El poder saber que tipo de sulfuro es más fácilmente atacable por las bacterias seleccionadas permitiría poder dirigir el proceso hacia ese tipo de sulfuros con lo que se obtendrían mayores rendimientos. En este sentido y como una primera aproximación a este objetivo, se realizaron distintos ensayos en los que se intentaba observar que sulfuros eran preferentemente atacados por el microorganismo aislado. Para ello, se prepararon tubos de ensayo con 10 ml de medio 9K a pH 2,0 más 1 ml de inóculo bacteriano crecido sobre 9K+S°, en los que se sustituyó la fuente de energía, es decir, se eliminó el azufre elemental y se añadieron diversas concentraciones de sulfuros minerales puros (sulfuros comerciales) previamente esterilizados. La temperatura de incubación fue de 50°C y la agitación de 100 rpm. El control de los ensayos se realizó mediante el recuento periódico de células con cámara de Thoma. Los sulfuros y las concentraciones mínimas y máximas utilizadas en cada caso están reflejadas en la tabla XV.

Después de 21 días de incubación no se detectó crecimiento bacteriano sobre ninguno de los sulfuros preparados. Se pudo observar que el mineral quedaba en el fondo de los tubos y que la agitación del mismo era insuficiente; por lo tanto, se repitieron los ensayos con las mismas concentraciones de sulfuros anteriormente utilizadas, pero cambiando los tubos de ensayo por matraces de 50 ml, con 20 ml de medio más inóculo y elevando la agitación a 125 rpm.

Tabla XV: Concentraciones de sulfuros metálicos puros ensayadas para el crecimiento del microorganismo TMRT. No se observó crecimiento en ninguna de las concentraciones utilizadas.

		CdS	FeS	Ag ₂ S	MoS ₂	SnS	ZnS	SbS
g/l	min	0,33	6,6	3,33	0,33	0,33	6,6	6,6
	max	66,6	200	66,6	66,6	66,6	200	200
Crecimiento		-	-	-	-	-	-	-

Con las nuevas condiciones y tras 21 días de incubación, tampoco se observó un aumento de la población de microorganismos. Sin embargo, en los casos del FeS, ZnS y SnS, todos en las concentraciones más pequeñas, al contrario que en los experimentos realizados en tubos de ensayo, si que se pudieron observar bacterias en el medio, es decir, la población bacteriana se mantuvo o decreció ligeramente. Los minerales no mostraron alteraciones aparentes. Se realizó un segundo pase de estos cultivos sobre nuevos matraces, con las mismas condiciones, y, finalmente, tras 21 días de incubación, las poblaciones de bacterias, en todos los matraces, eran prácticamente nulas. Parece, por lo tanto, que este microorganismo fue incapaz de utilizar sulfuros minerales puros como fuente de energía.

Utilización de sulfuros minerales naturales.- Este tipo de sulfuros tiene el inconveniente de estar formado por varias clases de compuestos, no todos bien identificados, por lo cual los efectos de los mismos no pueden ser clarificados tan fácilmente como en el caso de sulfuros puros. Por otra parte, el trabajo con este tipo de minerales tiene la ventaja de utilizar el tipo de material sobre el que se quieren evaluar las posibilidades biolixivantes del microorganismo aislado.

Estos experimentos se prepararon directamente en matraces de 50 ml para evitar los problemas de agitación del mineral, con 20 ml de medio 9K a pH 2,0 más el inóculo de TMRT procedente del cultivo de mantenimiento. Se añadieron a cada matraz diferentes cantidades de tres concentrados minerales de sulfuros complejos: CCu, CZn y CPb (la composición fue descrita en "Materiales y Métodos"). Los cultivos permanecieron durante 21 días en un incubador orbital, a 50°C y 125 rpm de agitación. Los resultados del crecimiento bacteriano, sobre las diferentes concentraciones de sulfuros, están resumidas en la tabla XVI.

Tabla XVI.- Resultados de los ensayos de crecimiento del microorganismo aislado sobre sulfuros minerales naturales

Concentrado Mineral	Concentración (g/l)	Crecimiento
Concentrado de cobre	2,5	++
	5	++
	12,5	++
	25	+
	50	-
Concentrado de cinc	2,5	++
	5	++
	12,5	+/-
	25	-
	50	-
Concentrado de plomo	2,5	+/-
	5	-
	12,5	-
	25	-
	50	-

Fue de destacar la presencia de bacterias en todos los matraces con las concentraciones más bajas de mineral, si bien en el caso del concentrado de plomo no pudo hablarse de crecimiento de la población microbiana, sino más bien de un mantenimiento de la misma. En cualquier caso, quedó comprobada la capacidad del microorganismo para desarrollarse utilizando la oxidación de estos sulfuros como fuente de energía.

Por otra parte es interesante destacar una mayor capacidad del microorganismo para crecer mejor sobre el concentrado de cobre que sobre el resto de los concentrados, puesto que en este fue capaz de mantenerse con concentraciones del orden de 25 gramos de mineral por litro de cultivo, mientras que, como se puede ver en la tabla, sobre el concentrado de zinc llegó hasta 12,5 g/l y en el concentrado de plomo únicamente se detectaron bacterias en la concentración más baja (2,5 g/l).

Efecto de los constituyentes del medio nutriente 9K sobre el crecimiento bacteriano.-

Estos ensayos son importantes desde un punto de vista económico, de cara a la posible aplicación del microorganismo aislado en procesos de biolixiviación, puesto que el medio 9K está compuesto de diferentes sales minerales, algunas de las cuales podrían ser aportadas por el mineral que se quiera tratar y otras habría que añadirles. La preparación de medio 9K, en volúmenes tan grandes como los necesarios para este tipo de procesos, podría ser económicamente inviable y, por lo tanto, una excesiva dependencia del microorganismo aislado de este medio, o de alguna de sus sales en particular, lo convertiría en un candidato poco adecuado para su utilización práctica en sistemas de biolixiviación.

Se prepararon cinco soluciones del medio 9K, y en cada una de ellas se eliminó una de las sales que componen el medio original: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , CaNO_3 y K_2HPO_4 .

Las condiciones iniciales del ensayo fueron 50°C de temperatura, con los distintos medios salinos, a un pH 2, una agitación de 100 rpm, tubos de ensayo con 10 ml de los medios 9K modificados, con S° como fuente de energía y 1 ml de inóculo del cultivo puro de TMRT.

Este tipo de experimentos fue realizado por otros autores (Dave y col., 1981), con bacterias mesófilas como *T. ferrooxidans*, para estudiar el efecto de los componentes del medio 9K en la lixiviación de concentrados de esfalerita (sulfuros de cinc). Las sales que resultaron ser más importantes para alcanzar altas disoluciones de cinc fueron $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y K_2HPO_4 . Sin embargo, en nuestro caso, la ausencia de una determinada sal no pareció afectar al crecimiento bacteriano, aunque como se puede observar en la gráfica 9, el número de

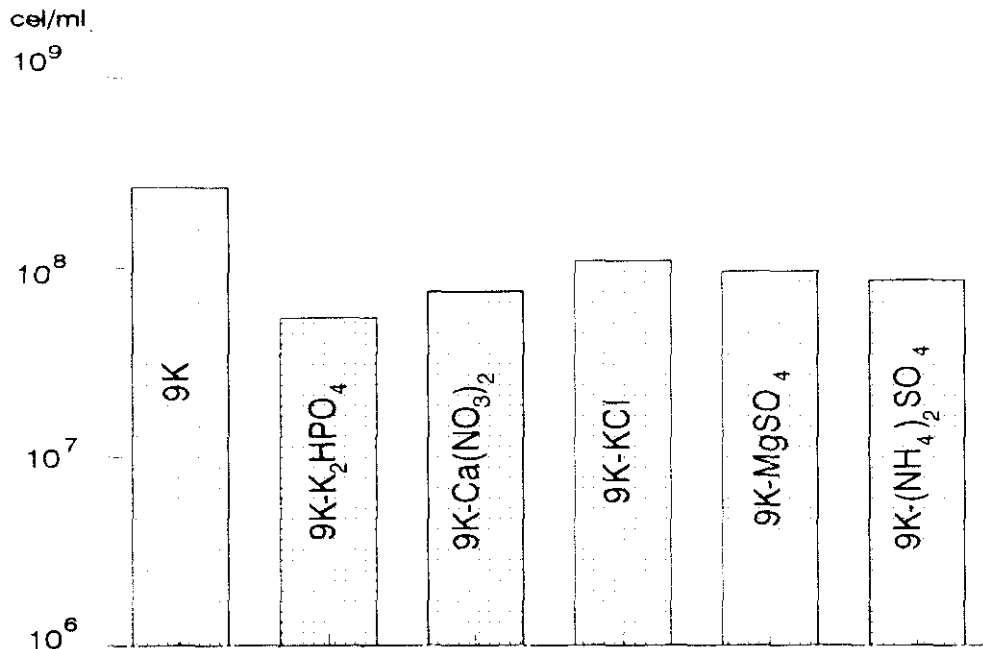


Figura 9: Efecto de las sales del medio 9K sobre el crecimiento del microorganismo aislado TMRT

células presente en los cultivos fue ligeramente menor en los medios carentes de K_2HPO_4 que en los otros casos. La diferencia entre el medio 9K completo y las distintas modificaciones del mismo no fueron excesivamente importantes lo que podría suponer un importante ahorro de inversión en nutrientes a la hora de la aplicación de este microorganismo a un proceso industrial.

Almacenamiento y mantenimiento de los cultivos puros.- Una vez determinadas las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo aislado y comprobado el estado de pureza total en los cultivos de mantenimiento, se procedió a la realización de un cultivo para crecer a gran escala la bacteria y obtener un elevado número de células. Para ello, se preparó un fermentador de 100 litros, con 80 litros de medio 9K (pH inicial 2) y azufre elemental como fuente de energía. La temperatura de incubación fue de $50^\circ C$. Durante el proceso, se hizo pasar a través del cultivo una corriente de aire al 1% en CO_2 (vol/vol). El fermentador contaba con un sistema de agitación mecánica que mantenía el cultivo en movimiento. El tiempo de incubación fue de 15 días hasta alcanzar una densidad de población celular de

aproximadamente 10^9 cel/ml. El medio de cultivo fue centrifugado obteniéndose 10 gramos de células que fueron congeladas a -20°C para su posterior utilización.

Una vez aislados, los cultivos se mantuvieron continuamente creciendo en las mismas condiciones en las que se había logrado el aislamiento y a partir de ellos se inocularon los ensayos posteriores de caracterización y biolixiviación. La manera más eficaz de mantener el cultivo en perfectas condiciones fue mediante la realización de pases continuados en el medio óptimo. De estos pases, se recogía una pequeña muestra que se almacenaba en la nevera a 4°C .

En el caso del microorganismo termófilo moderado, estas muestras podían permanecer en estas condiciones durante unos pocos meses (3-4 meses), pero pasado este tiempo la gran mayoría de las células perdían la viabilidad y resultaba muy difícil reanudar un cultivo. Las células obtenidas del crecimiento del cultivo en el fermentador, como ya se ha mencionado, se almacenaron en la nevera a -20°C . Estas células perdían su viabilidad en pocos días, pero podían ser utilizadas en muy diversos tipos de pruebas. Sin embargo, es poco recomendable este tipo de almacenamiento si no se cuenta además con cultivos de mantenimiento continuos, pues se corre el peligro de perder el microorganismo.

También se almacenaron células del microorganismo TMRT en glicerol, que posteriormente se mantuvieron a -20°C . Estas células tampoco eran viables transcurridos varios meses a partir de su almacenamiento.

Con los otros dos microorganismos aislados no hubo problemas de viabilidad después de largos períodos de mantenimiento en la nevera a 4°C .

4.2.3. Pruebas bioquímicas

Lípidos de membrana.- Este tipo de pruebas es muy importante en bacterias extremófilas, muchas de las cuales pertenecen al reino de las Archaeobacterias. Estas, entre otras características particulares, presentan los lípidos de su membrana en forma de éteres, mientras que las eubacterias los tienen en forma de ésteres. Así mismo, la comparación de

los lípidos de membrana del microorganismo aislado con otras bacterias biolixiviantes puede permitir relacionarlo con alguna de las especies ya conocidas y, por lo tanto, ayudar a su caracterización.

El resultado del análisis fue que los lípidos de la membrana de TMRT eran ésteres y, por lo tanto, el microorganismo aislado era una eubacteria. El resultado de la comparación con otros microorganismos lixiviantes está representado en la tabla XVII. Por su parte, TERT, presentó los lípidos de membrana en forma de éteres, lo que le incluye en el reino de las Archaeobacterias. Hasta estos momentos, todas las bacterias termófilas extremas (> 65°C) descritas pertenecen a este reino.

Tabla XVII. % de similitud entre los lípidos de membrana de distintos microorganismos biolixiviantes

	<i>T. ferrooxidans</i>	<i>T. cuprinus</i>	TMRT
<i>T. ferrooxidans</i>	100	39	76
<i>T. cuprinus</i>	39	100	54
TMRT	76	54	100

Contenido en bases.- Esta determinación sólo se ha realizado con el microorganismo aislado TMRT. El valor obtenido (61.7%) no corresponde con el de ninguna de las principales bacterias descritas que intervienen en procesos de lixiviación como se puede observar en la tabla XVIII.

Finalmente, y a modo de resumen, las principales características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos aislados están resumidas en la tabla XIX.

4.3. ESTUDIO GENÉTICO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Uno de los procedimientos más útiles a la hora de caracterizar un microorganismo es el estudio de su material genético y su comparación con el de otras especies próximas bien caracterizadas. Este estudio se puede realizar mediante la construcción de mapas de

Tabla XVIII. Porcentaje de C + G de algunas de las principales bacterias implicadas en procesos de biolixiviación.

Microorganismos más comunes en procesos de biolixiviación		% C + G
Mesófilos	<i>T. ferrooxidans</i> ^a	58
	<i>T. thiooxidans</i> ^a	52
	<i>T. cuprinus</i> ^b	66-69
	<i>L. ferrooxidans</i> ^f	51,7
Termófilos moderados	<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i> ^h	45.5-49.3
	TMRT	61,7
Termófilos	<i>Methallosphaera sedula</i> ^c	44
	<i>Acidianus infernus</i> ^d	31
	<i>S. acidocaldarius</i> ^e	38
	<i>S. metallicus</i> ^a	38
	<i>S. solfataricus</i> ^e	35

a.- Huber, Stetter. 1991; b.- Huber, Stetter. 1990; c.- Huber y col. 1989; d.- Segerer y col. 1986; e.- Zillig y col. 1980; f.- Harrison y Norris. 1985; g.- Kuenen, Tuovinen. 1981; h.- Karavaiko y col. 1987

restricción utilizando diferentes enzimas. El patrón de restricción es una característica particular de cada microorganismo; por lo tanto, en función de la similitud de los patrones obtenidos de los diferentes microorganismos, junto con el resto de pruebas realizadas anteriormente, podremos conocer la proximidad filogenética entre las diferentes especies estudiadas o bien determinar que se trata de especies nuevas.

Para la realización de estos estudios se utilizó la técnica de electroforesis de campo pulsado. Esta técnica ya ha sido puesta a punto y usada con éxito en microorganismos lixiviantes (Marín I., 1989).

En este tipo de estudios es preciso disponer de una elevada cantidad de células para extraer su DNA. Este es uno de los problemas de los microorganismos lixiviantes, es decir, su bajo rendimiento celular en los cultivos de crecimiento, unido al hecho de que gran parte de las células quedan adheridas a las partículas de S^o, mineral o jarositas que se forman en el medio, disminuyendo aún más el rendimiento obtenido.

Tabla XIX

Características	<i>Thiobacillus</i> sp.	TMRT	TERT
Tamaño	0,5x1 μm	0,5x1,5-2,0 μm	1,0x1,0 μm
Forma	Bacilos	Bacilos irregulares	Cocos
Esporas	NO	NO	NO
Pared celular	Gram negativa	Gram negativa	
Movimiento	1 ó 2 flagelos	Flagelo polar	
Fuentes de energía	Quimiolitótrofo estricto	Quimiolitótrofo estricto	Quimiolitótrofo estricto
S ⁰	++	+++	+
Fe ²⁺	+++	-	+
Sulfuros minerales	++	++	+++
Sustancias orgánicas	-	-	-
Rango de pH	2,0-3,5	0,8-4,5	0,9-4,5
Óptimo	2,5	2,0	1,5
Rango de T ^a	25-39°C	30- < 60°C	50°C- > 68,5°C
Óptimo	37°C	48-50°C	68,5°C
Relación con el O ₂	Aerobio	Aerobio	Aerobio
DNA (C+G)	-----	61,7	-----

Se prepararon insertos de DNA en agarosa de los microorganismos aislados, según el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos".

Las primeras pruebas realizadas con los insertos de DNA preparados a partir de células de TMRT mostraron que el tratamiento utilizado en la rotura celular no servía para este microorganismo puesto que las células continuaban enteras. Por esta razón, se iniciaron una serie de ensayos encaminados a conseguir la rotura celular y que fueran lo suficientemente suaves como para permitir que el DNA quedase intacto.

Para la realización de estos ensayos se prepararon diferentes tubos "eppendorf", con 50 μl del cultivo bacteriano con una densidad de población aproximada de 5×10^9 cel/ml. El

control de estas pruebas se realizaba por observación directa al microscopio óptico del cultivo inmediatamente después de realizar las pruebas y posteriormente se repetían las observaciones en función del tiempo necesario para cada método.

Como conclusión de todas estas pruebas (tabla XX), se decidió tratar las células con los detergentes Tween 20 y Nonidet P40. Después del tratamiento, las células eran lavadas para eliminar cualquier resto de detergentes y a continuación se sometieron al proceso estándar de obtención de DNA intacto en agarosa. Sin embargo, en los insertos preparados de esta manera, el DNA que se obtuvo quedó, parte en los pocillos y parte, apareció totalmente degradado. Es decir, que los detergentes cuando rompen las células, afectan también al DNA, mientras que si no las han roto, como ya se ha mencionado, los enzimas utilizados no son capaces de actuar. Esta característica del microorganismo termófilo moderado, a pesar de ser un problema a la hora de su estudio, constituye una prueba más para afirmar que se trata de una nueva especie de microorganismo todavía no caracterizada.

Con los otros dos microorganismos aislados no ha habido este tipo de problemas y se han podido obtener insertos de agarosa que contienen su DNA intacto.

Para realizar la comparación, se utilizaron como microorganismos de referencia otras bacterias que normalmente están presentes en aguas de minas. Así, el microorganismo mesófilo *Thiobacillus* sp. se comparó con otros microorganismos mesófilos como *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y *T. cuprinus*, mientras que el termófilo extremo se comparó con *Sulfolobus solfataricus*.

El resultado de estas pruebas ha sido comprobar la gran similitud existente entre el *Thiobacillus* sp. y *T. ferrooxidans* (figura 10), resultado que viene a apoyar los obtenidos en la caracterización morfológica y fisiológica del mismo. Las pequeñas diferencias en los patrones de restricción de ambos microorganismos podrían indicar que, siendo la misma especie, corresponde a una nueva cepa de *T. ferrooxidans*.

TRATAMIENTO	REACTIVO	RESULTADOS
Enzimáticos	Lisozima	No afectó al microorganismo, independientemente de la cantidad de enzima añadida.
Detergentes	Lauryl-Sarcosina 20%	Se añadieron distintas concentraciones (10, 15 y 20%). Sólo en este último caso se observó una aglutinación de las células y pérdida de movilidad.
	SDS	Se probó a las concentraciones de 10, 15 y 20%. Los tubos se dejaban incubar durante toda la noche a 50°C. La mayor parte de las células conservaban la forma y la movilidad. No pareció afectar demasiado a las paredes celulares.
	Tween 20	Se añadió el Tween 20 para que quede a una concentración final del 50%. Afectó rápidamente a las células. Se formaron acúmulos de bacterias. No se distinguieron células en movimiento y las que estaban libres presentaban un aspecto muy deformado.
	Nonidet P40	Se añadió en las mismas proporciones que el Tween 20, obteniéndose resultados muy similares. Afectó a una gran mayoría de las células.
	TENS (SDS 1%, NaOH 0.1N)	Se mezcló en proporción 1:1 con el cultivo celular. Se observaron células lisadas, pero en muy escasa proporción.
	Tiocianato de guanidina 4M	Se mezcló en proporción 1:1 con el cultivo celular. No hubo resultados positivos y la gran mayoría de las células estaban inalteradas.
Químicos	Fenol	Degradó totalmente las células.
	NaOH 4M	Se mezcló con el cultivo en una proporción 1:1 en volumen. La gran mayoría de las células siguieron aparentemente en buenas condiciones aunque se vieron unas pocas afectadas que tendían a aglutinarse.
	Cloroformo-Metanol	Se preparó una mezcla con el cultivo en las siguientes proporciones: 1:1,25:2,5, y se agitó durante 1 minuto. La mayoría de las células no estaban afectadas. Se observaron pequeñas aglutinaciones de células.
	HCl 1M	Se mezcló en una proporción 1:1 con el cultivo celular. No afectó a las células.
Físicos	Sonicación	Las células se sometieron durante distintos tiempos a la acción de ultrasonidos. A partir de dos minutos de tratamiento empezaron a observarse efectos como la aglutinación de células y la adopción de formas extrañas en las células libres.
	Microondas	Se mantuvo el cultivo durante distintos tiempos en el microondas. Se llegó hasta la ebullición del cultivo y aún se observó una gran cantidad de células vivas en el cultivo.

Tabla XX: Tratamientos efectuados al microorganismo TMRT para conseguir la rotura de su pared celular y obtener el DNA.

En cuanto al microorganismo termófilo TERT, presenta diferencias respecto a *S. solfataricus* (figura 11). Sin embargo, debido a la falta de otros microorganismos termófilos lixiviantes en cultivos puros, no se ha podido determinar si se trata de una especie nueva.

También se ha determinado la topología del cromosoma de estos dos microorganismos mediante la técnica de campo pulsado. Esta técnica permite diferenciar entre DNAs circulares y lineales. Las moléculas intactas de DNA de gran tamaño, con una topología circular, son incapaces de entrar en el gel de agarosa cuando se someten a una electroforesis de campo pulsado, quedando atrapadas en el pocillo del gel. Sin embargo, moléculas del mismo tamaño, pero de topología lineal, si que se resuelven con este tipo de electroforesis (Schwartz y Cantor, 1984; Garvey y Santi, 1986). En ambos casos, se ha demostrado la presencia de un único cromosoma circular.

Otra prueba realizada con estos microorganismos fue la determinación de la presencia de plásmidos en su genoma. Muchas de las propiedades de los microorganismos, como la resistencia a metales pesados, suele estar codificada en plásmidos. Su presencia en las bacterias podría contribuir a una mejora, con respecto a los procesos de lixiviación, de otras especies mediante la introducción de estos plásmidos por ingeniería genética. Sin embargo, en los ensayos con insertos que contenían el DNA intacto de los dos microorganismos aislados no se pudo apreciar la presencia de material extracromosómico en ningún caso.

4.4. INMUNOLOGÍA

Uno de los grandes inconvenientes de los procesos de biolixiviación es el de desconocer inicialmente el tipo de microorganismos con los que se está trabajando. Hay grandes problemas para realizar las identificaciones y enumeraciones de los mismos de una manera rápida, ya que es difícil encontrar los medios y las condiciones óptimas de crecimiento para cada caso. Una de las posibilidades, sobre la que ya se han realizado varios trabajos, es el empleo de técnicas inmunológicas (Apel y col., 1976, Muyzer y col., 1987, Jerez y Peirano, 1986). Con estas técnicas, se han logrado anticuerpos específicos contra *T. ferrooxidans* (Arredondo y Jerez, 1989., Coto y col., 1992) y *L. ferrooxidans* (Jerez y Arredondo, 1991).



Figura 10: Comparación entre los patrones de restricción de *T. ferrooxidans* y *Thiobacillus* sp. En los diferentes carriles se muestran las digestiones realizadas con los enzimas: 2 y 6 Dra I; 3 y 7 Hind III; 4 y 8 BamH I; 5 y 9 Sfi I. Los carriles 1 y 10 corresponden a concatémeros de fago lambda. Las condiciones de carrera fueron de 36 horas a un pulso de 10 segundos y una fuerza de campo de 330 V/cm

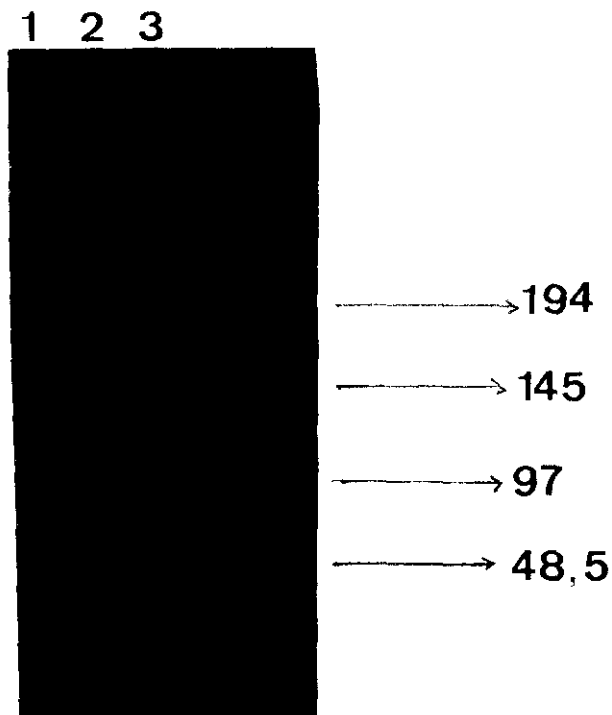


Figura 11: Comparación de los patrones de restricción de TERT (1) y *S. solfataricus* (2) obtenidos con el enzima Eag I, (3) concatémeros de fago lambda. Las condiciones de carrera fueron 10 segundos de pulso a 330 V/cm durante 36 horas.

En este sentido, se realizaron una serie de pruebas para obtener anticuerpos específicos contra el microorganismo aislado TMRT. Como antígenos se utilizaron células enteras de la bacteria debido a las particulares propiedades de su envuelta celular, muy difícil de romper en comparación con otros microorganismos lixiviantes, que hacían pensar que los anticuerpos contra esta envuelta podían ser muy específicos.

El suero obtenido de dos conejos, según el protocolo explicado en "Materiales y Métodos", fue titulado en anticuerpos mediante el método ELISA.

Los primeros ensayos con los anticuerpos fueron para comprobar su especificidad. Para ello, se prepararon filtros de nitrocelulosa en los que se fijaron muestras del microorganismo aislado (bacterias enteras y rotas por sonicación) y de *E. coli* (células enteras y rotas por sonicación). Los filtros con las muestras se hicieron reaccionar con el suero obtenido. El revelado de la reacción mostró claramente una fuerte reacción entre los anticuerpos y las muestras del microorganismo aislado, ligeramente más acusada en el caso de las bacterias sonicadas. Por el contrario, el anticuerpo no reaccionó frente a *E. coli* en ninguna de las dos formas en que había sido preparado. Estas pruebas corroboraron los resultados existentes para otras bacterias lixiviantes en los que también se obtuvieron los anticuerpos a partir de las células enteras (Coto y col., 1992; Jerez y Arredondo, 1991).

El interés del trabajo, una vez comprobada la especificidad de los anticuerpos, se centró en demostrar la validez de los anticuerpos para distinguir y enumerar el microorganismo aislado en muestras de aguas de mina, con poblaciones muy complejas de bacterias. Este tipo de pruebas se realizaron por el método ELISA.

Se preparó una curva patrón con la D.O. obtenida al medir la reacción colorimétrica que se produce entre el complejo antígeno-anticuerpo y un anti-anticuerpo comercial preparado. Los antígenos, en este caso, fueron concentraciones decrecientes del microorganismo aislado, previamente sonicadas, en las que se calculó el número de células a partir de recuentos al microscopio óptico con cámara de Thoma.

En primer lugar, se prepararon muestras de cultivos puros de microorganismos lixiviantes y se hicieron reaccionar con el anticuerpo para TMRT. Todas las muestras fueron previamente sonicadas. Estas bacterias de control se añadieron a concentraciones del orden de 10^7 cel/ml, excepto *T. cuprinus* que fue del orden de 10^9 cel/ml. Los resultados obtenidos están reflejados en la figura 12.

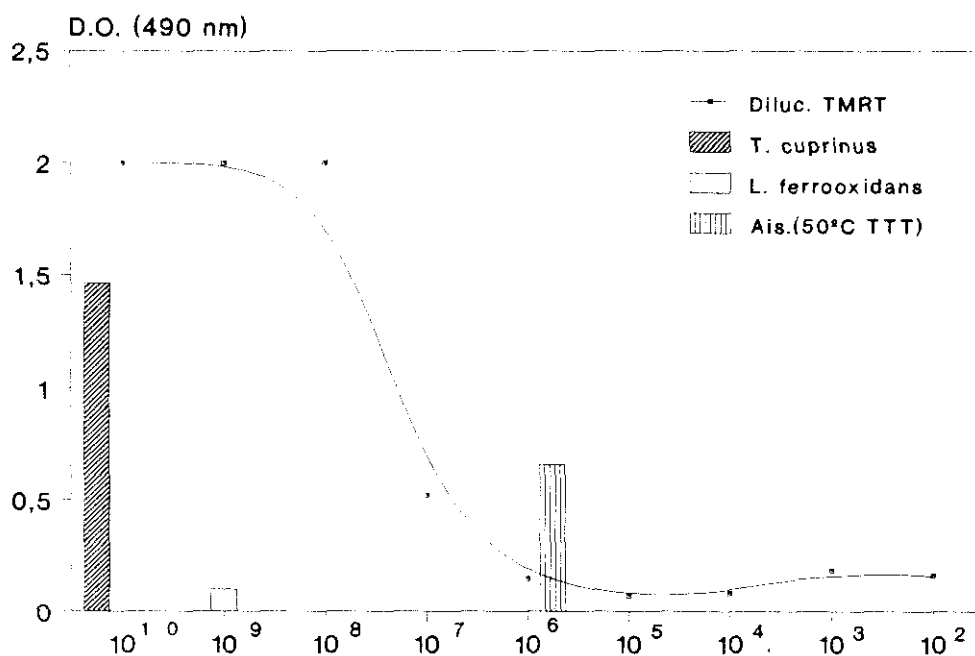


Figura 12: Sensibilidad de los anticuerpos obtenidos contra el microorganismo TMRT frente a otras bacterias comunes en distintas aguas de minas

Se puede apreciar que hubo una importante reacción con *T. cuprinus* por parte de los anticuerpos, aunque pudiera haber sido debido a la elevada concentración de la muestra. Con los otros dos microorganismos la reacción fue poco importante: casi nula con *L. ferrooxidans* y algo mayor con el aislado TTT, un microorganismo también procedente de aguas de mina de Río Tinto y con muchas similitudes con TMRT como crecer a 50°C y oxidar compuestos de azufre como fuente de energía. Por otra parte, durante el proceso de sonicación, como se ha indicado anteriormente, TMRT permaneció entero en una gran mayoría de la población. Sin embargo, las otras bacterias utilizadas fueron más sensibles, lo que implicaría una mayor rotura de sus componentes. Este hecho pudo provocar el aumento de la reacción

con los anticuerpos, lo que explicaría la reacción tan fuerte con *T. cuprinus* (más sensible a la sonicación que los otros microorganismos utilizados en esta prueba).

En los tres casos, teniendo en cuenta la concentración bacteriana utilizada, se observó una reacción mucho menor que con esa misma concentración del microorganismo aislado, por lo tanto, el suero obtenido pudo ser considerado como un buen indicador para la detección de nuestro microorganismo puesto que, a la misma concentración bacteriana, fue mucho más alta la densidad óptica para TMRT que para el resto de las bacterias.

Comprobado el hecho de que los anticuerpos podían detectar, con una buena especificidad, la presencia del microorganismo aislado, se pasó al análisis de diferentes muestras tomadas en la zona de la mina de Río Tinto (figura 13). Las muestras, con una población variada de microorganismos y tratadas por sonicación, fueron sometidas a la prueba ELISA con el suero anti-TMRT. El resultado de estas pruebas está reflejado en la gráfica 14.

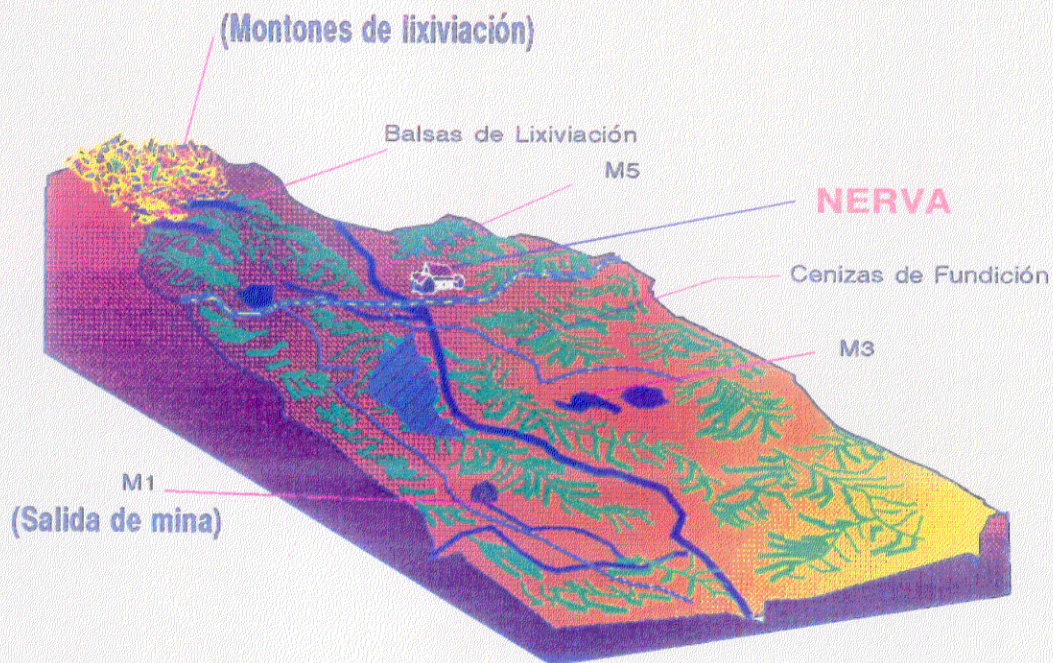


Figura 13: Zonas de las minas de Río Tinto donde fueron tomadas las muestras.

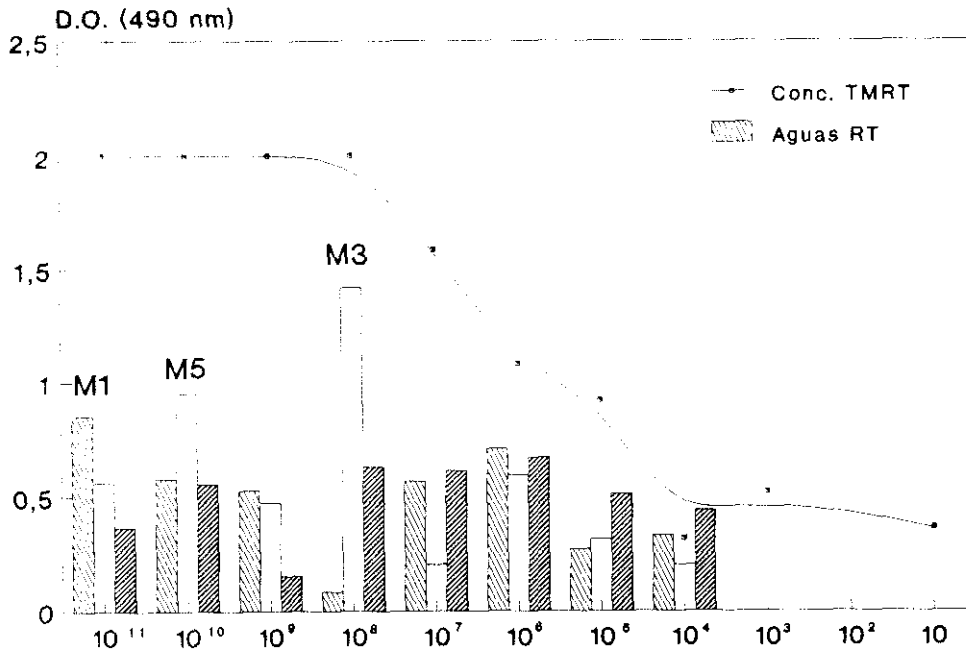


Figura 14: Detección de TMRT en distintas muestras de aguas de la mina de Río Tinto mediante anticuerpos específicos.

Como se puede ver en la gráfica, sólo en tres de las muestras tomadas se detectó, claramente, la presencia de TMRT, mientras que en el resto la señal de D.O. fue muy débil o incluso por debajo del límite de detección del microorganismo. Los resultados demostraron que TMRT sólo está presente de manera importante en algunas zonas de minas (presas -M3-, y zonas del río cercanas a las balsas de lixiviación -M1 y M5).

Por último, se probaron anticuerpos específicos contra distintas bacterias biolixiviantes (*T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*) frente al microorganismo aislado. En todos los casos los resultados fueron negativos, obteniéndose así una nueva prueba a favor que el microorganismo aislado era una nueva especie bacteriana.

4.5. ADHESIÓN DE CÉLULAS A LAS PARTÍCULAS DE MINERAL

Como se ha explicado en la introducción, la lixiviación bacteriana de sulfuros minerales tiene lugar a través de mecanismos directos e indirectos. Para que tengan lugar los primeros, es necesario que haya un contacto físico entre los microorganismos y el mineral

a lixiviar. Esta adhesión es un fenómeno complicado en el que toman parte mecanismos físico-químicos y fisiológicos y sobre el cual, a pesar de los estudios realizados, todavía falta mucho por conocer.

Se han identificado dos estados de adhesión: el primero de estos es reversible y se produce por una atracción instantánea de los microorganismos hacia la superficie sólida del mineral. Los microorganismos todavía exhiben un movimiento "browniano" y pueden ser eliminados fácilmente de la superficie sólida mediante una suave agitación. El segundo estado de adhesión es irreversible y se produce cuando los microorganismos forman el glicocalix, un polímero extracelular. Esta unión es muy estable y solamente se pueden recuperar las bacterias adheridas mediante una fuerte agitación o mediante el tratamiento químico con diversos detergentes. La existencia del glicocalix ha sido hipotetizada en diversas especies de *thiobacilli*, pero sólo se ha comprobado su existencia en *T. albertis* y se ha demostrado que este microorganismo lo utiliza para adherirse al azufre elemental (Bryant y col., 1983)

Diversos estudios indican que la adhesión de microorganismos a la superficie de los minerales juega un papel importante en los procesos de biolixiviación (Berry y Murr, 1976; Weiss, 1973; Solari, 1986).

Berry y Murr demostraron que la adhesión de las bacterias se producía específicamente en las fases con sulfuros minerales puesto que estas regiones ofrecían una fuente de energía a los microorganismos.

La adhesión de células es diferente según el mineral y los microorganismos de que se trate. Así, en función del mineral, se ha observado que la unión de *T. ferrooxidans* era menor en sulfuros de cobre que sobre la pirita de los carbones (Espejo y Ruiz, 1987). En relación al tipo de microorganismo, otros estudios muestran que hasta un 87% de las células de *L. ferrooxidans* pueden estar unidas al mineral mientras que sobre ese mismo mineral sólo se unían un 7% de las células de *T. ferrooxidans* (Norris y col., 1987). Por otra parte, estudios realizados sobre desulfuración de carbones con *T. ferrooxidans* y *S. acidocaldarius* (Bagdigian y Myerson, 1986; Chen y Skidmore, 1988) demostraron que la adhesión de las

bacterias termófilas fue, en este caso, mayor que la de las mesófilas. Esto se atribuyó a la ausencia del flagelo y a la rigidez de la pared celular.

De todos estos comentarios anteriores, se deduce la importancia de controlar las poblaciones de células adheridas al mineral. Para realizar este control, se han sugerido diversos métodos como la medida de proteínas totales (Norris y col., 1987) o la utilización de diversos detergentes (Pronk y col., 1992, Dziurla y col., 1992). En nuestro caso, se utilizó una combinación de detergentes en pasos sucesivos. Los ensayos se realizaron con los dos microorganismos termófilos estudiando su adhesión a distintos concentrados minerales, CCu, CCuL y CDI, los tres con un alto contenido en sulfuros de cobre.

En primer lugar, se tomaron muestras de tres cultivos de los microorganismos termófilos TMRT y TERT (figura 15), que estaban creciendo sobre los minerales anteriormente mencionados y se realizaron sobre ellas, según el procedimiento descrito en "Materiales y métodos", los ensayos necesarios para determinar la cantidad de células presentes en el cultivo en función de su estado de adherencia al mineral. Los resultados se pueden observar en la figura 16.

Se puede apreciar un comportamiento muy similar por parte de los microorganismos independientemente del tipo de concentrado utilizado, si bien se detectan ligeras diferencias.

En el caso de TMRT estas diferencias indicaron que fue en el concentrado CDI donde se produjo una mayor adherencia de las bacterias. Esto pudo deberse a que este concentrado fue el que mayor concentración tenía de sulfuros de cobre, por lo que, como se ha explicado en apartados anteriores, tiene el microorganismo TMRT una cierta especificidad. En todos los casos, se observó una proporción ligeramente mayor de bacterias libres frente a las que estaban adheridas al mineral (tabla XXI).

Esta pequeña proporción a favor de las bacterias libres fue también consecuencia del estado de ataque del mineral. Estudios realizados sobre *T. ferrooxidans* mostraron que al comienzo (24 h) de un proceso de biolixiviación, la cantidad de células adheridas puede llegar al 50% de las mismas, mientras que al final del proceso, la proporción de bacterias

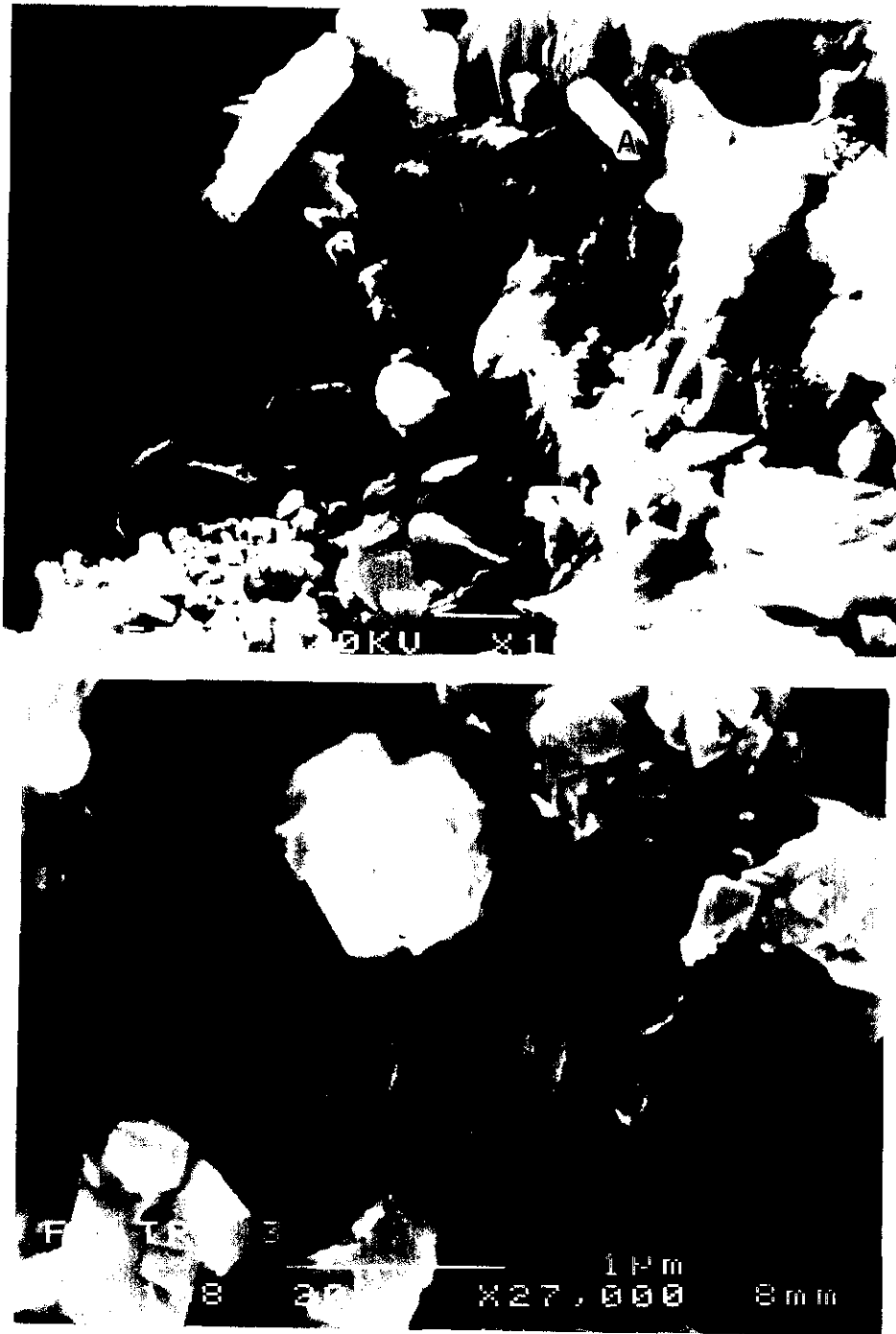
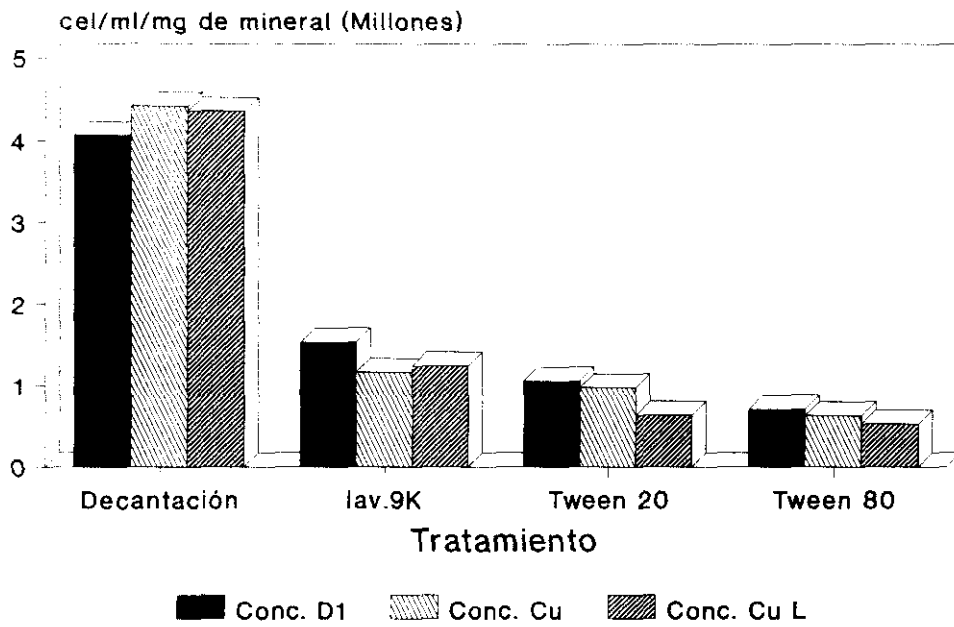


Figura 15: Fotografías con el microscopio electrónico de barrido de las bacterias adheridas al mineral A. TMRT B.-TERT.

A



B

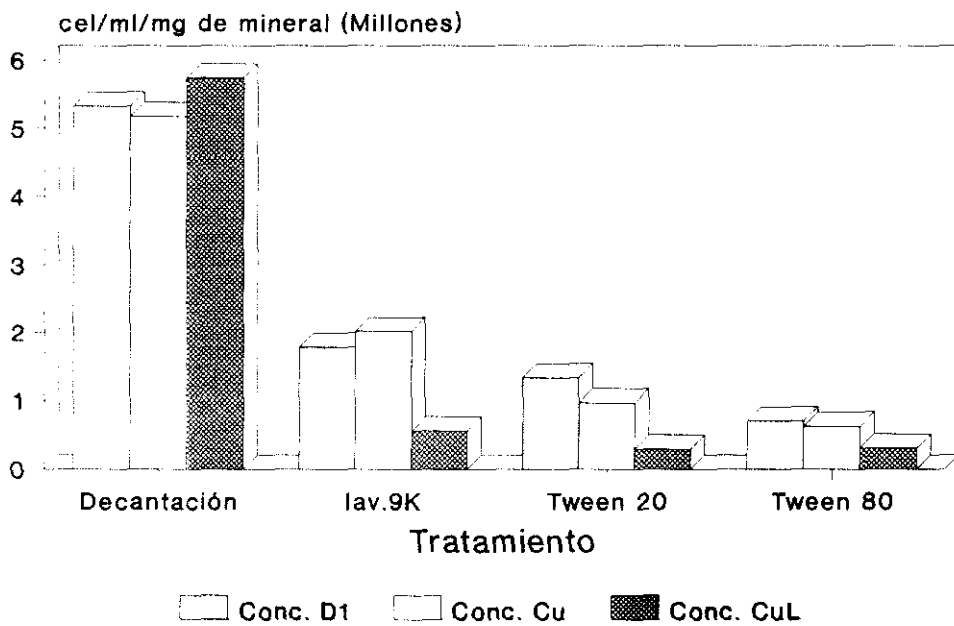


Figura 16: Determinación de la adherencia de microorganismos al mineral en función del tratamiento utilizado. A: TMRT. B: TERT

Tabla XXI: Relación entre bacterias libres y bacterias adheridas al mineral en los ensayos realizados con distintos concentrados de sulfuros complejos minerales.

relación células libres/células adheridas		
Concentrado	TMRT	TERT
CDI	1,23	1,39
CCu	1,61	1,43
CCuL	1,82	5,21

unidas al mineral descendió hasta un 1-5% (Dziurla y col., 1992). Sin embargo, en nuestro caso, el mineral estaba muy atacado y, aún así, el número de células adheridas era alto. El único caso en que esta relación fue muy alta en favor de las bacterias libres fue con el concentrado CCuL y el microorganismo TERT. Esto se debió a que TERT creció muy bien sobre este concentrado y el ataque al mineral fue más importante que en los otros casos.

Para comprobar la influencia del estado del mineral, se realizaron nuevos ensayos en los que se extrajeron a diferentes tiempos muestras de cultivos de TMRT y TERT que estaban creciendo sobre el concentrado de cobre CDI. Los resultados de estos ensayos están representados en las figuras 17 y 18. En las gráficas se puede apreciar claramente que en la muestra tomada al inicio del ensayo de lixiviación (24 horas después de la inoculación) una gran parte de las células se adhirieron, en mayor o menor grado, al mineral, mientras que en la muestra final (después de 30 días) esta proporción se invirtió en el caso de TERT, mientras que en el ensayo con el microorganismo termófilo moderado hubo una situación de equilibrio entre ambos tipos de bacterias. Esta situación fue consecuencia de una mayor actividad de TERT en los procesos de lixiviación. El concentrado CDI inoculado con TMRT aún no estaba totalmente atacado, por lo que todavía había un alto número de células adheridas al mineral.

Como resultado de estos ensayos, pudo concluirse que, durante el proceso de lixiviación, el número de bacterias unidas al mineral fue muy alto al inicio del proceso y a medida que este transcurría, las bacterias se iban separando, posiblemente, por un agotamiento de las fuentes de energía disponibles en la superficie de las partículas de mineral. Por otra parte, la importancia del número de bacterias adheridas fue una prueba más

a favor de la trascendencia de la biolixiviación directa, especialmente en microorganismos como TMRT que no pueden obtener la energía metabólica de la oxidación de Fe^{2+} . El proceso no pareció depender del tipo de concentrado mineral utilizado, si bien, en estos ensayos, todos los concentrados utilizados tuvieron una composición bastante similar.

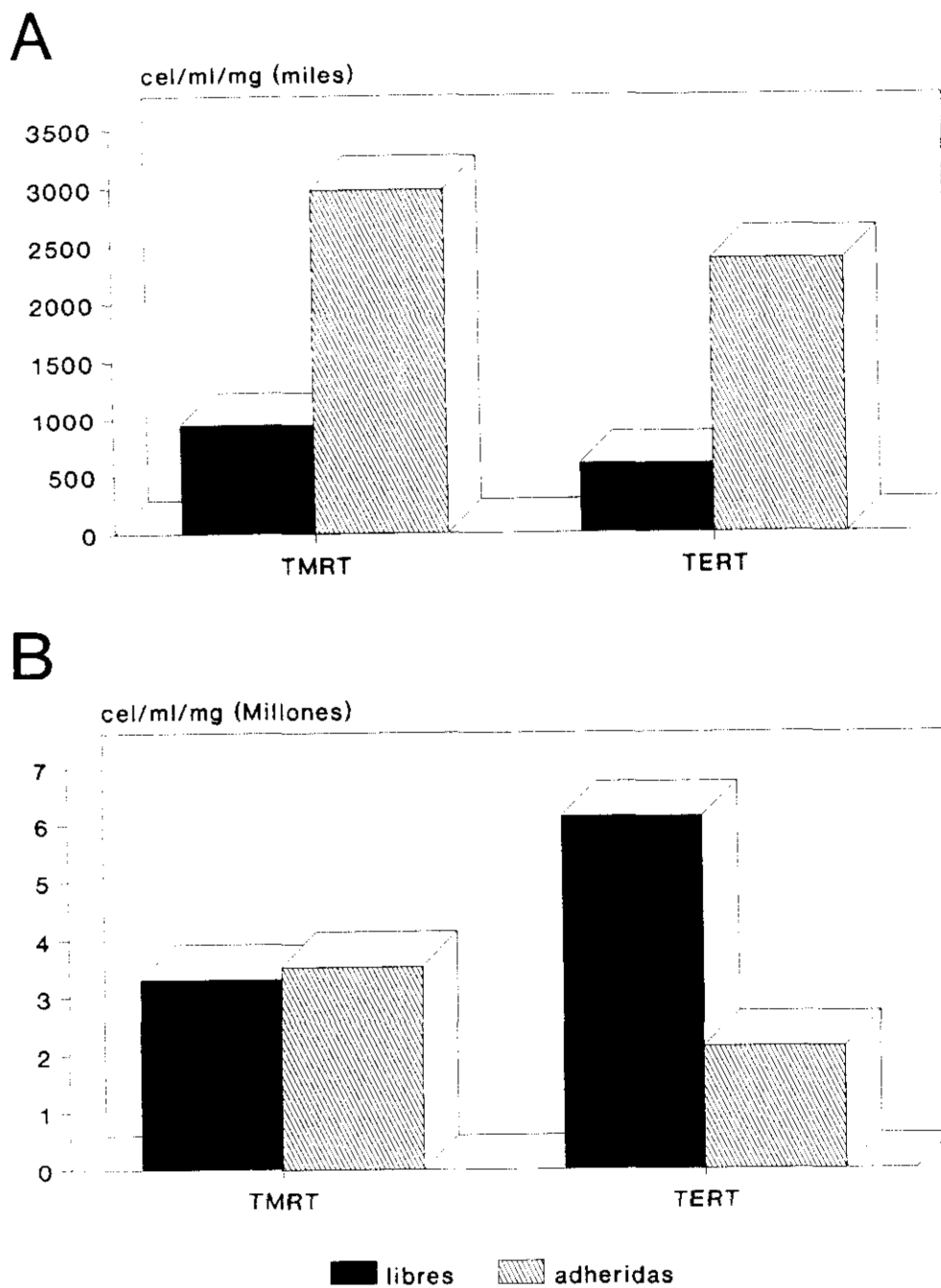


Figura 17: Determinación de la adherencia de microorganismos al mineral en distintos tiempos A.- 24 horas después de la inoculación. B.- Después de 30 días de experimentación

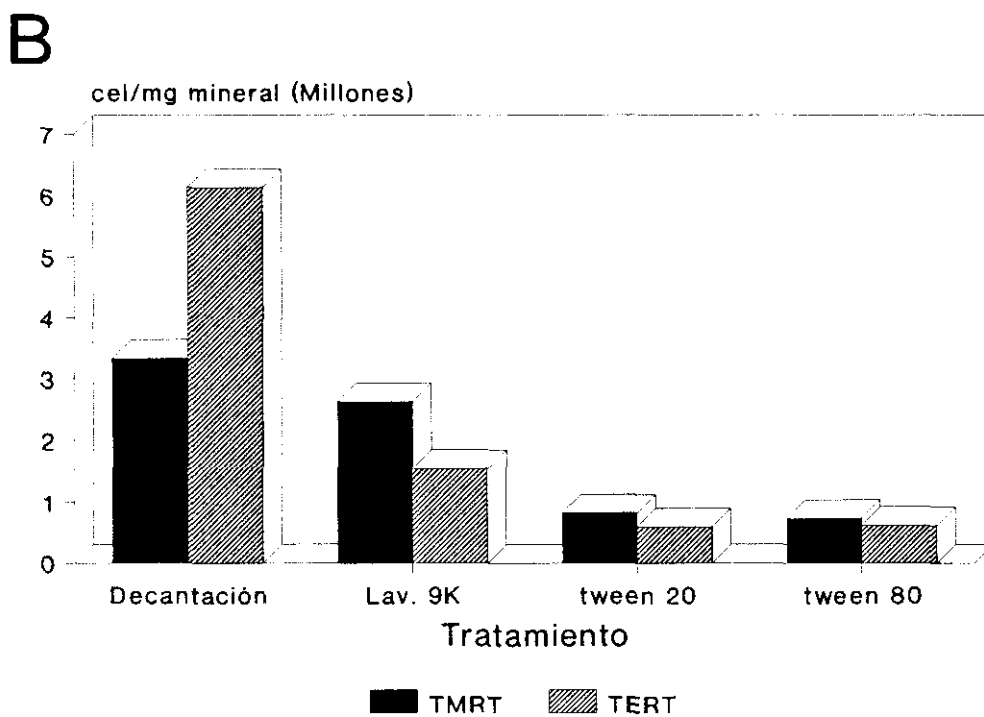
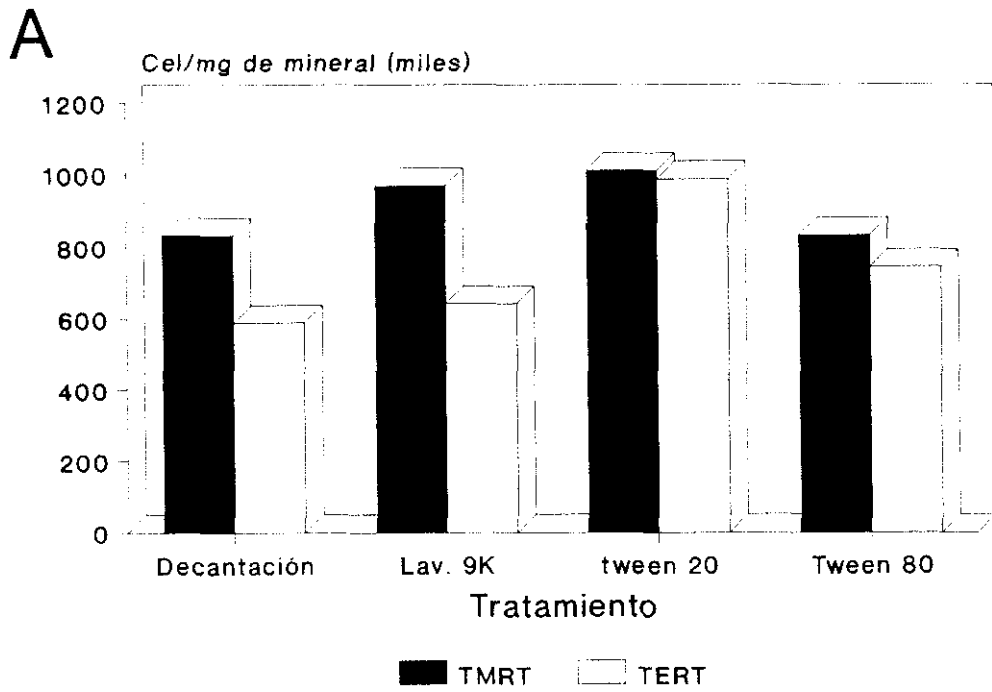


Figura 18: Determinación de la adherencia de microorganismos al mineral en función del tratamiento efectuado. A.- 24 horas después de la inoculación. B.- Después de 30 días de experimentación

4.6. ENSAYOS DE BIOLIXIVIACIÓN

El aislamiento de bacterias procedentes de aguas de mina tiene, como fin más ambicioso, una posible aplicación en procesos industriales a gran escala. Para ello, es necesario la realización previa de una serie de experimentos para demostrar que las bacterias, seleccionadas por características como capacidad de crecimiento sobre sulfuros minerales, acidofilia, elevada resistencia a la toxicidad por metales pesados, etc., son aptas para los procesos de biolixiviación. Esto se tiene que traducir en una aceptable recuperación metálica a partir de los minerales que haga que su utilización pueda llegar a ser rentable económicamente.

Por lo tanto, en los ensayos que se describen a continuación se comprobó la capacidad de biolixiviación de los microorganismos aislados cuando disponían como fuente de energía de sulfuros complejos minerales. El microorganismo mesófilo *Thiobacillus* sp fue anteriormente estudiado en relación a su comportamiento biolixivante (Gómez, 1990; Gómez y col., 1991). Se comprobó entonces que este microorganismo tenía unas claras ventajas en cuanto a capacidad de extracción metálica con respecto a la especie pura de colección (*T. ferrooxidans* 23270 ATCC), en todos los concentrados minerales utilizados, aunque con efectividad inferior a la del cultivo mixto de microorganismos del cual procedía. Así mismo, se comprobó su inespecificidad hacia los diferentes metales formadores de la materia prima. En función de estos resultados, el trabajo de biolixiviación se centró en los otros dos microorganismos aislados: TMRT y TERT.

4.6.1. Cinética de la biolixiviación en presencia de TMRT

Elección de la densidad de pulpa de trabajo.- En primer lugar, se estudió la capacidad del microorganismo para crecer a diferentes densidades de pulpa de mineral. Para ello, se inocularon distintos matraces con medio 9K y mineral a distintas densidades de pulpa (1; 3; 5; 7,5; 10; 12 y 15%). Las condiciones de pH y temperatura fueron las óptimas determinadas para el desarrollo del microorganismo durante el proceso de caracterización (pH 2 y 50°C). El mineral elegido fue el concentrado diferencial de cobre de Aznalcollar, por ser este sobre el que se registró un mayor crecimiento de la población del microorganismo

durante los citados ensayos de caracterización. El resultado de estos ensayos, expresado en número de células/ml se representa en la figura 19. Se pudo observar que a densidades de pulpa superiores al 5% el microorganismo no se desarrollaba. Las poblaciones celulares más numerosas se consiguieron con un 1% de mineral, pero la escasa diferencia con la población obtenida al ensayar con un 3% hizo aconsejable elegir esta última concentración, puesto que la cantidad de mineral procesada es mayor y, con vistas a una posible aplicación industrial, siempre es preferible utilizar pulpas lo más concentradas posible.

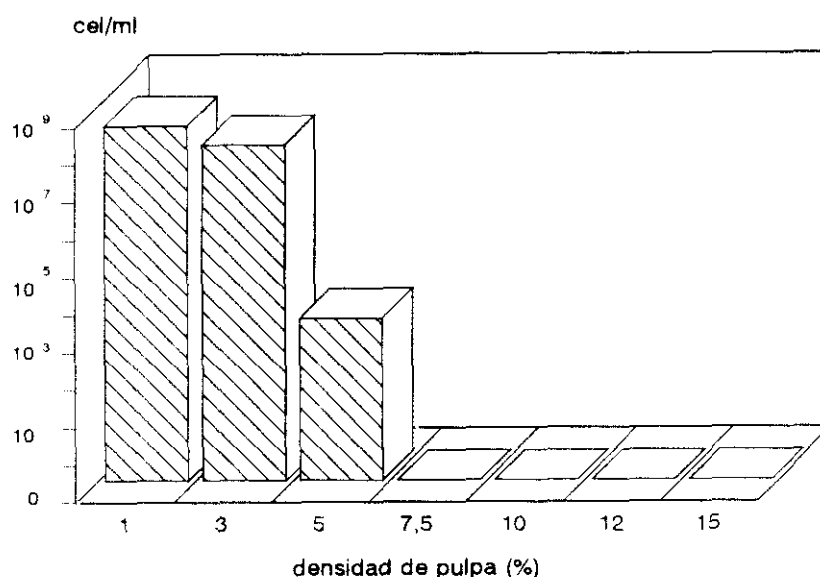


Figura 19: Crecimiento celular del microorganismo aislado TMRT, a diferentes densidades de pulpa

Influencia del tipo de concentrado mineral.- Una vez elegida la densidad de pulpa del 3%, se procedió a ensayar la efectividad del microorganismo sobre distintos tipos de concentrados minerales. Es importante observar, siempre pensando en una posible aplicación a escala industrial, que los rendimientos de lixiviación serán mayores cuando el microorganismo actúe sobre el sustrato más adecuado a sus características. Con este fin, se ensayaron tres concentrados diferenciales (CCu, CZn y CPb) y dos concentrados globales (CGB1 y CGRT), cuya composición está descrita en "Materiales y Métodos". Sobre los concentrados diferenciales de cinc y plomo no se obtuvo crecimiento de las bacterias y la lixiviación metálica obtenida correspondió únicamente a la lixiviación química producida. Lo

mismo sucedió en el caso del concentrado global CGB1, aunque en este caso si que se observó un ligero crecimiento de las bacterias. Sin embargo, los únicos casos en los que se apreció un proceso de lixiviación metálica superior a la encontrada en los ensayos estériles utilizados como control fueron los de los concentrados CCu y CGRT.

Como se puede ver en la gráfica 20, la proporción de cobre en solución fue mayor en el caso de CCu que en el de CGRT y, en ambos casos, muy por encima de lo obtenido en los ensayos estériles, lo que indicó una gran influencia de las bacterias en el proceso.

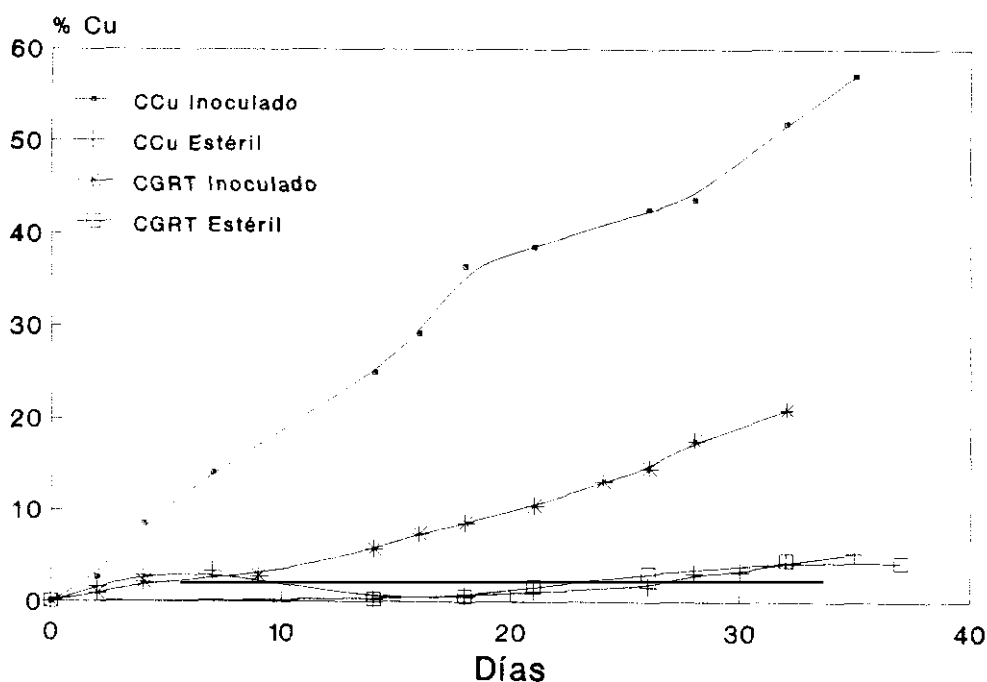


Figura 20: Lixiviación de cobre de los concentrados CCu y CGRT por el microorganismo aislado TMRT

Estas diferencias no fueron tan importantes en el caso del hierro (gráfica 21), aunque se confirmaron los resultados obtenidos durante la caracterización del microorganismo al comprobarse que no utilizaba hierro, en forma de Fe^{2+} , como fuente de energía. Esto se reafirma al observar las gráficas 22 y 23, en las que se puede observar que la mayor parte del hierro lixiviado, a partir de ambos concentrados, estaba en forma de Fe^{2+} .

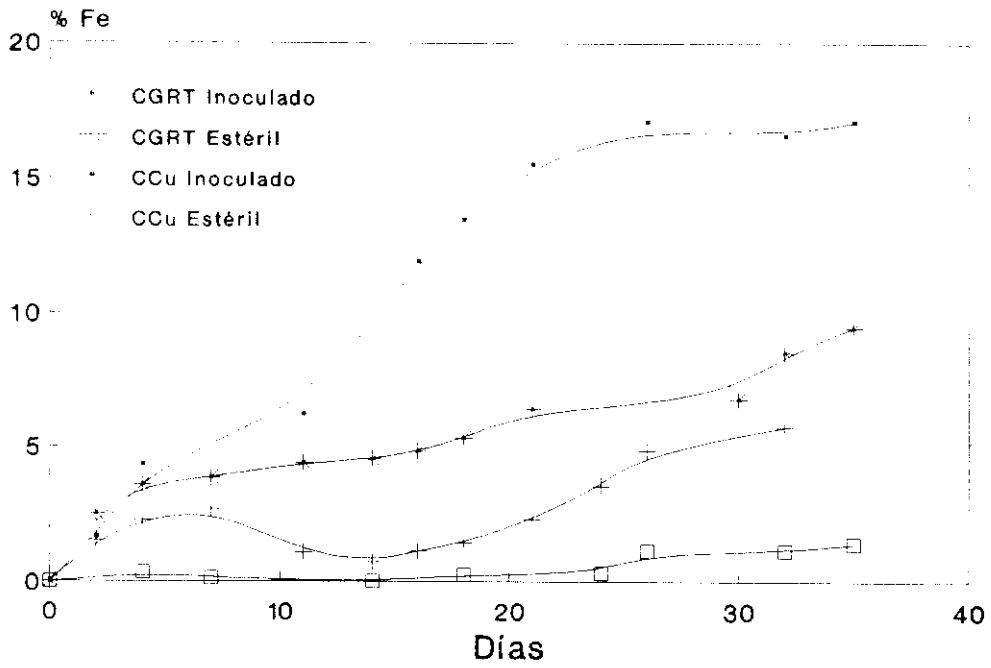


Figura 21: Disolución de hierro a partir de los concentrados CCu y CGRT por el microorganismo aislado TMRT

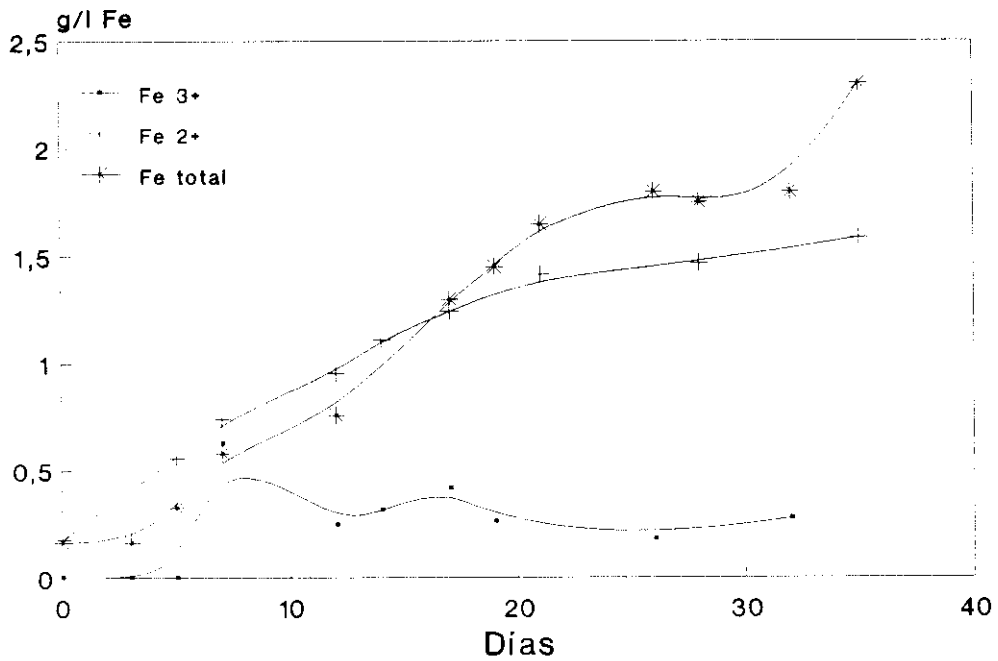


Figura 22: Estado del hierro en solución durante la lixiviación del concentrado CCu en el ensayo inoculado con el microorganismo aislado TMRT.

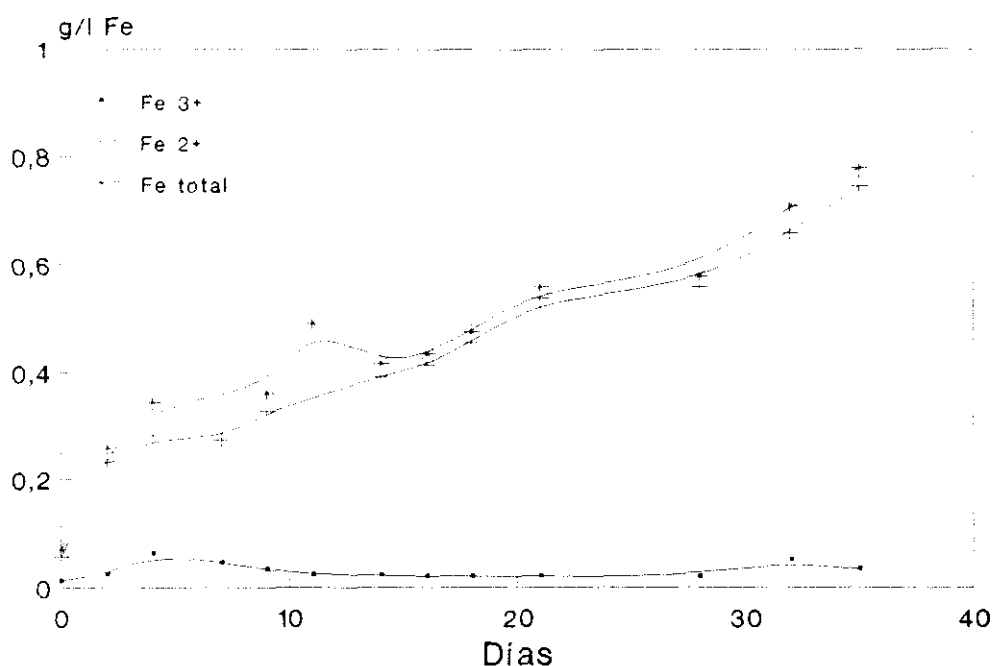


Figura 23: Estado del hierro en solución durante la lixiviación del concentrado CGRT en el ensayo inoculado con el microorganismo aislado TMRT

El hecho más significativo se produjo, sin embargo, durante la lixiviación del cinc (gráfica 24). Se comprobó, también en ambos concentrados, aunque con mayor claridad en el caso del CCu, que la presencia de cinc en solución es prácticamente igual en los ensayos inoculados y en los estériles. Las pequeñas diferencias observadas podrían ser achacadas a que en los ensayos inoculados, como consecuencia de la oxidación de los sulfuros, se produjo una acidificación del medio que contribuyó al proceso de lixiviación. Por otra parte, los cationes Cu^{2+} , liberados por la acción de los microorganismos, tienen una cierta acción catalítica en la disolución de otros sulfuros metálicos, como, en este caso, el ZnS (Ballester y col., 1989, 1990). Es decir, la lixiviación de los sulfuros de cinc que forman parte del mineral se debió únicamente a una acción química en la que no tomaron parte las bacterias de una forma directa, lo que indicaba una cierta especificidad, por parte de los microorganismos, hacia los sulfuros que contenían cobre (CuS_2 o CuFeS_2). A partir de estos ensayos, se continuaron los trabajos utilizando como concentrados minerales aquellos que tenían un porcentaje de sulfuros de cobre más elevado, facilitando así el crecimiento de los microorganismos.

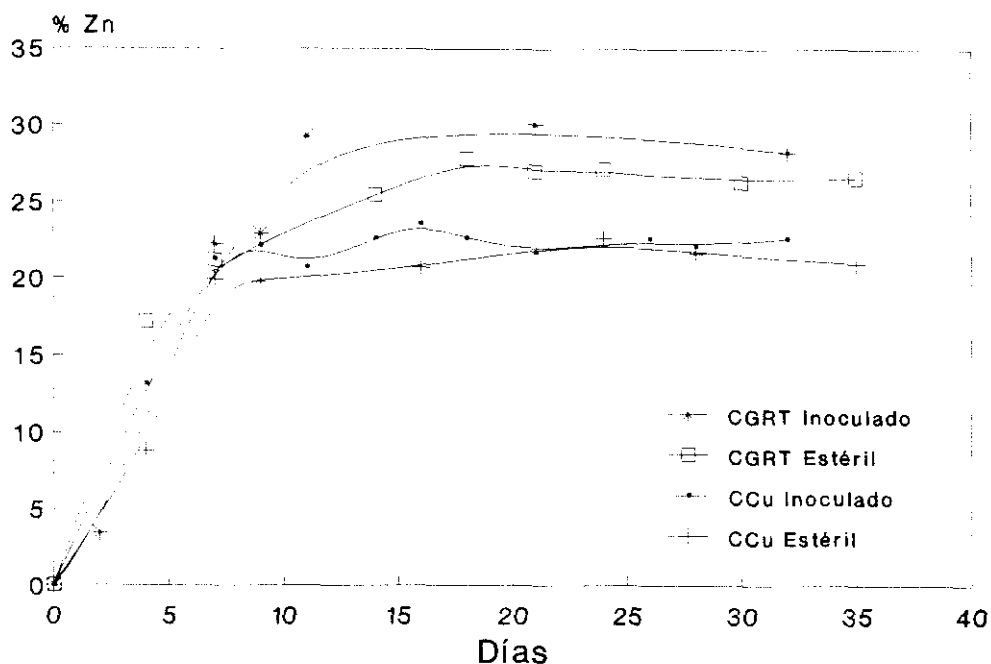


Figura 24: Lixiviación de cinc a partir de los concentrados CCu y CGRT por el microorganismo aislado TMRT

Influencia de la adaptación de los cultivos.- El microorganismo termófilo moderado se mantuvo durante prolongados períodos de tiempo creciendo sobre medio 9K sin hierro suplementado con azufre. Como resultado de esto, al volver a inocular ensayos en los que la fuente de energía eran minerales, el microorganismo no estaba adaptado y no crecía. Este problema se solucionó realizando unos ensayos de adaptación de la bacteria a concentraciones crecientes de mineral. Como consecuencia de los anteriores ensayos, en los que se había visto una cierta predisposición de TMRT a crecer sobre minerales con altos contenidos en sulfuros de cobre, los minerales seleccionados para estos experimentos fueron los concentrados CCu, CCuL y CGRT. La adaptación se inició a partir de una densidad de pulpa del 1% y se incrementó en sucesivos pasos hasta llegar a un 3%, la concentración más adecuada para obtener buenos rendimientos de extracción metálica, según se ha visto anteriormente. Cada ensayo era inoculado con 5 ml de medio del experimento anterior, una vez que las densidades de población celular eran lo bastante numerosas (del orden de 10^8 cel/ml).

En el proceso de disolución de cobre a partir de los tres concentrados, se produjo una situación similar en la que se apreció claramente un aumento progresivo en la concentración del cobre lixiviado en los sucesivos pases realizados. Se debe destacar especialmente el buen crecimiento del microorganismo sobre el concentrado CCuL, donde se alcanzaron, por otra parte, los resultados más altos en cuanto a cobre en solución. Lo mismo sucedió con el hierro, aunque en este caso no fue hasta el cuarto pase cuando más se incrementó la cantidad de metal en solución. En el proceso de disolución de los sulfuros de cinc, se repitieron las observaciones anteriormente reseñadas con respecto a esta especie mineral. El porcentaje de cinc en solución fue prácticamente similar en todos los casos, independientemente de que el microorganismo estuviera o no adaptado al proceso, lo que volvía a indicar una especificidad de esta bacteria hacia los sulfuros de cobre.

Estos resultados se pueden apreciar con detalle en las gráficas 25 a 33, en las que se representan los distintos pases realizados a los cultivos en función del tipo de concentrado utilizado.

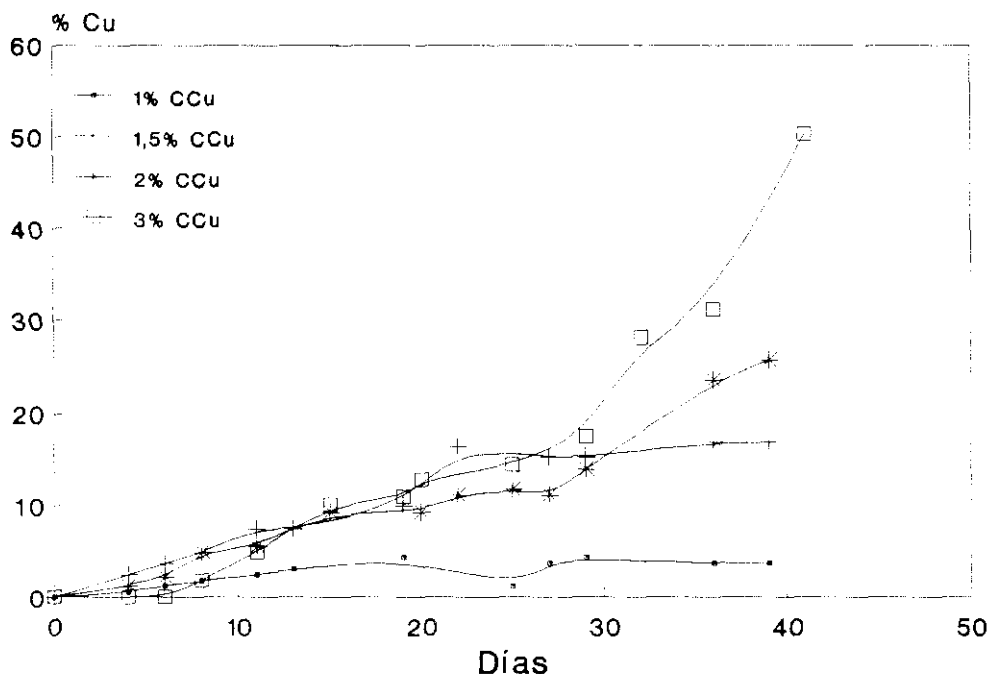


Figura 25: Disolución de cobre durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CCu

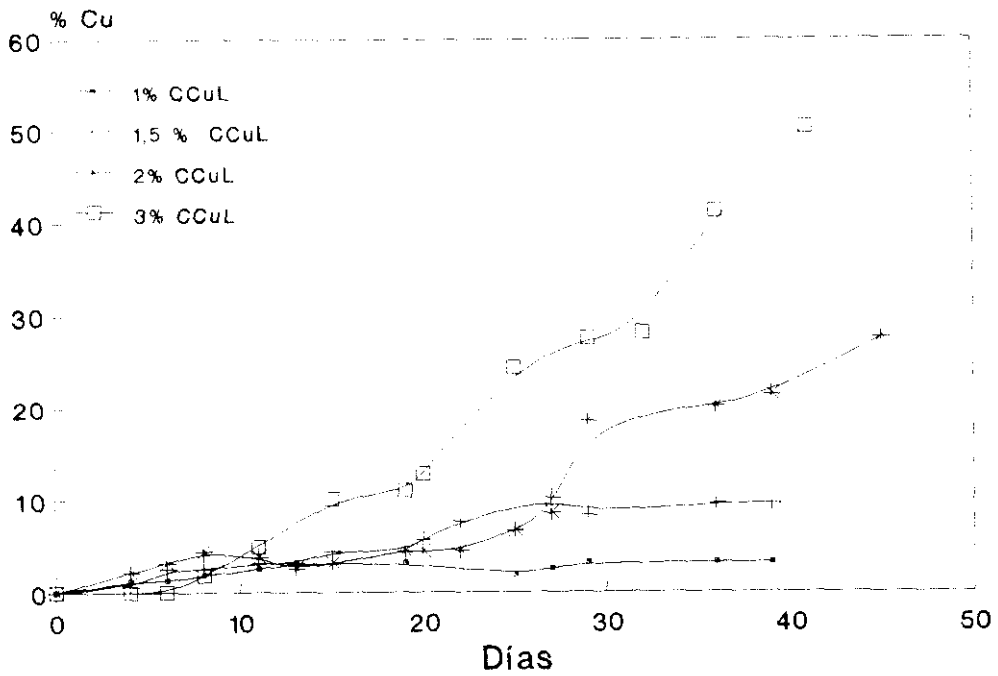


Figura 26: Disolución de cobre durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CCuL

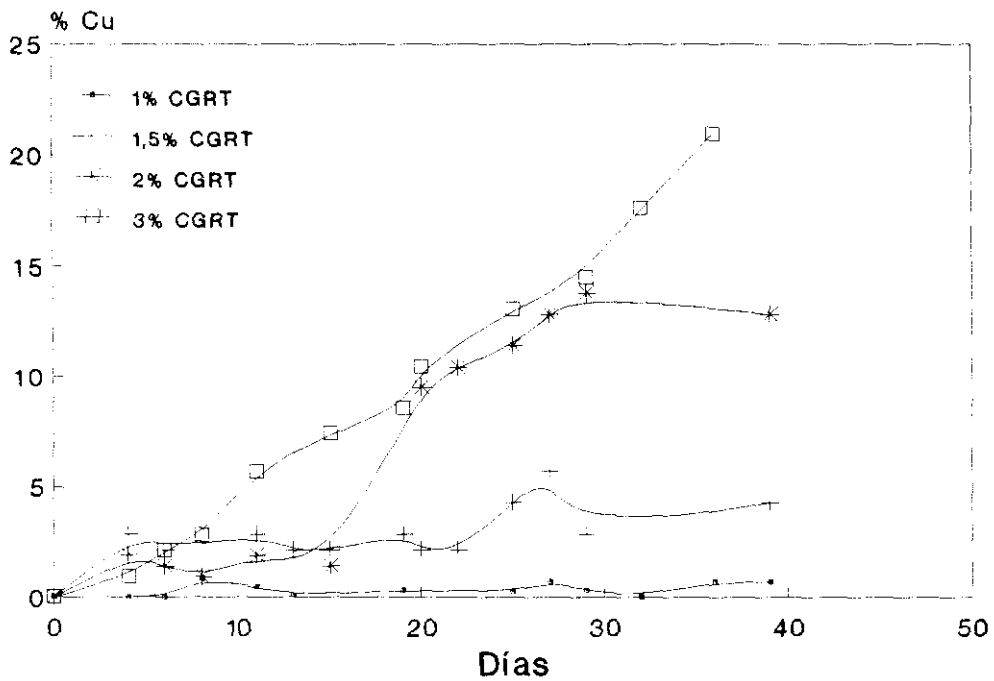


Figura 27: Disolución de cobre durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CGRT

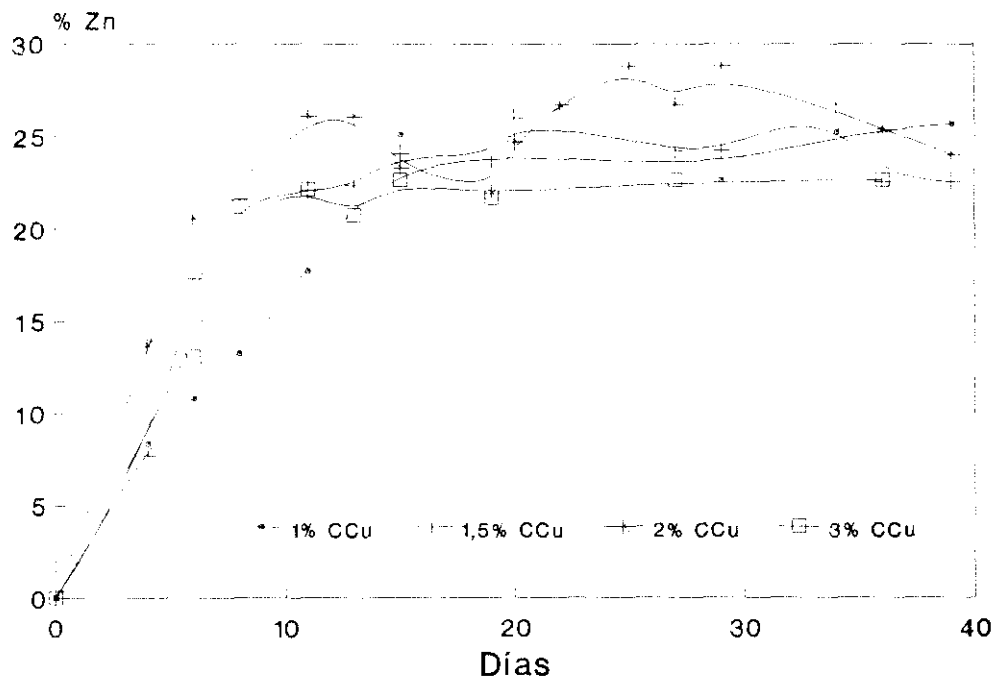


Figura 28: Disolución de cinc durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CCu

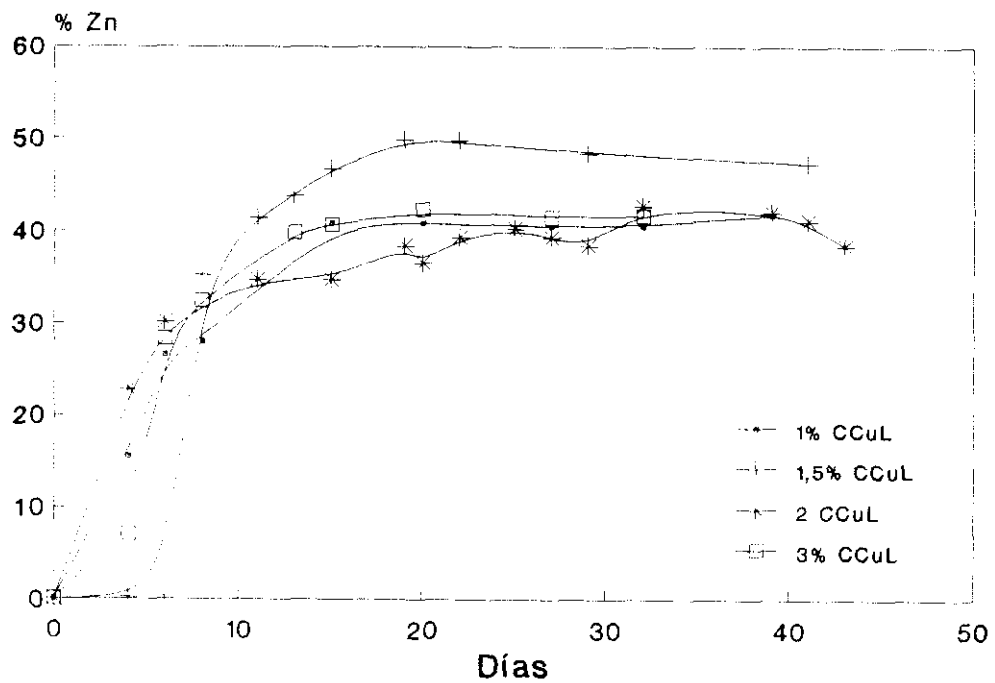


Figura 29: Disolución de cinc durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CCuL

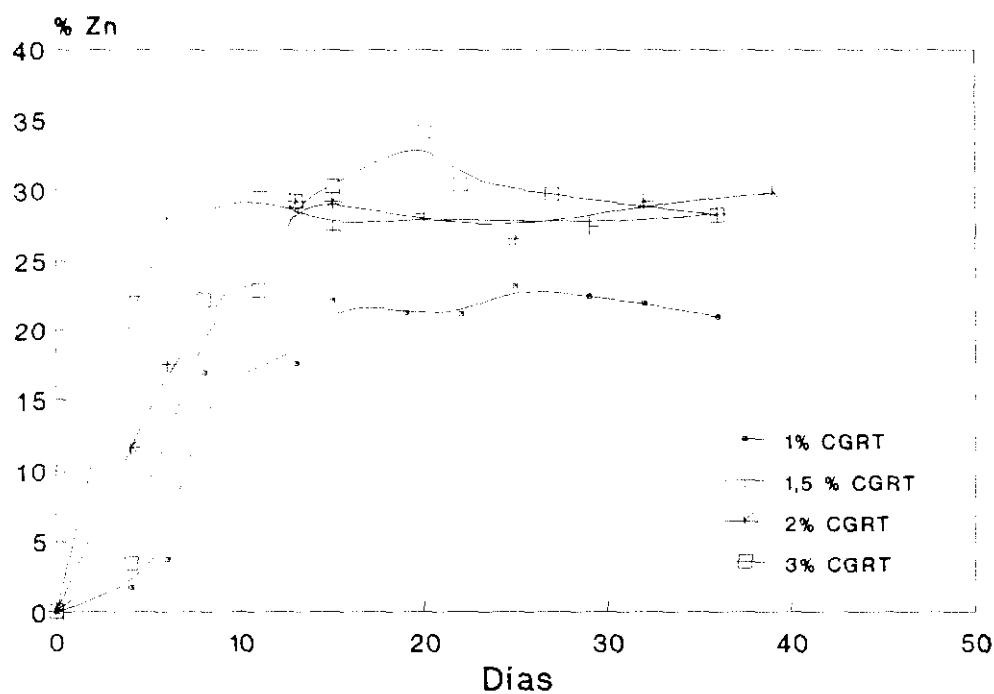


Figura 30: Disolución de cinc durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CGRT

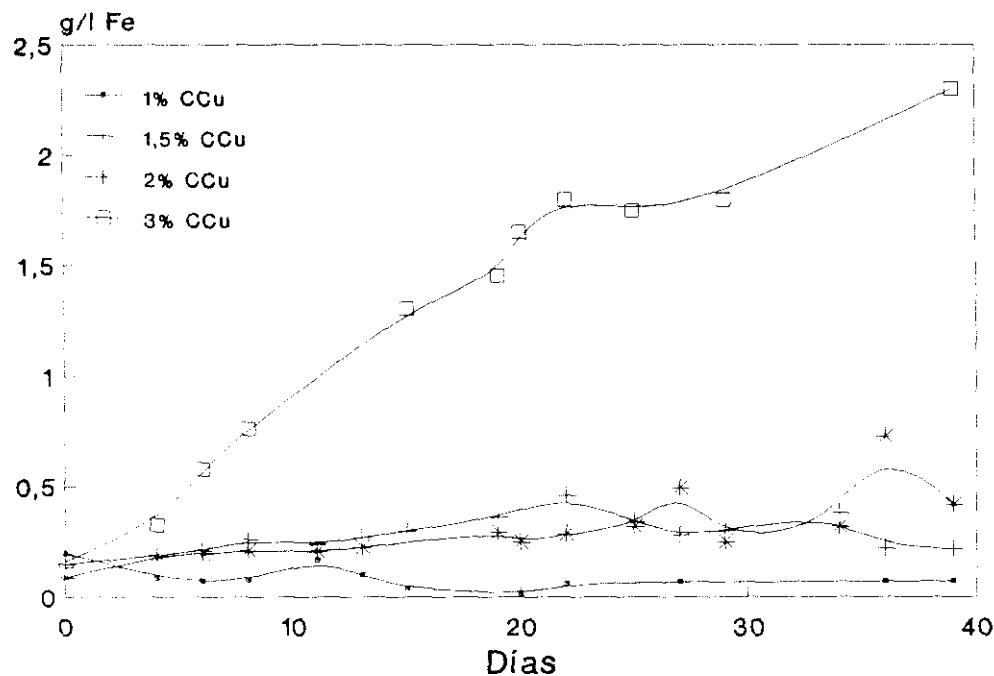


Figura 31: Disolución de hierro durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CCu

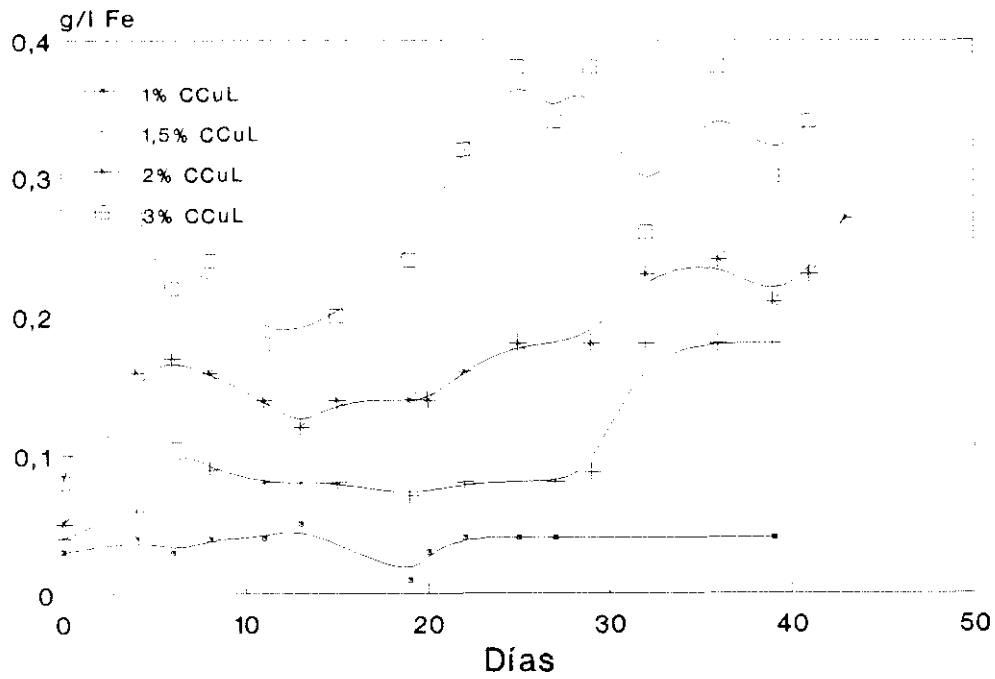


Figura 32: Disolución de hierro durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CCuL.

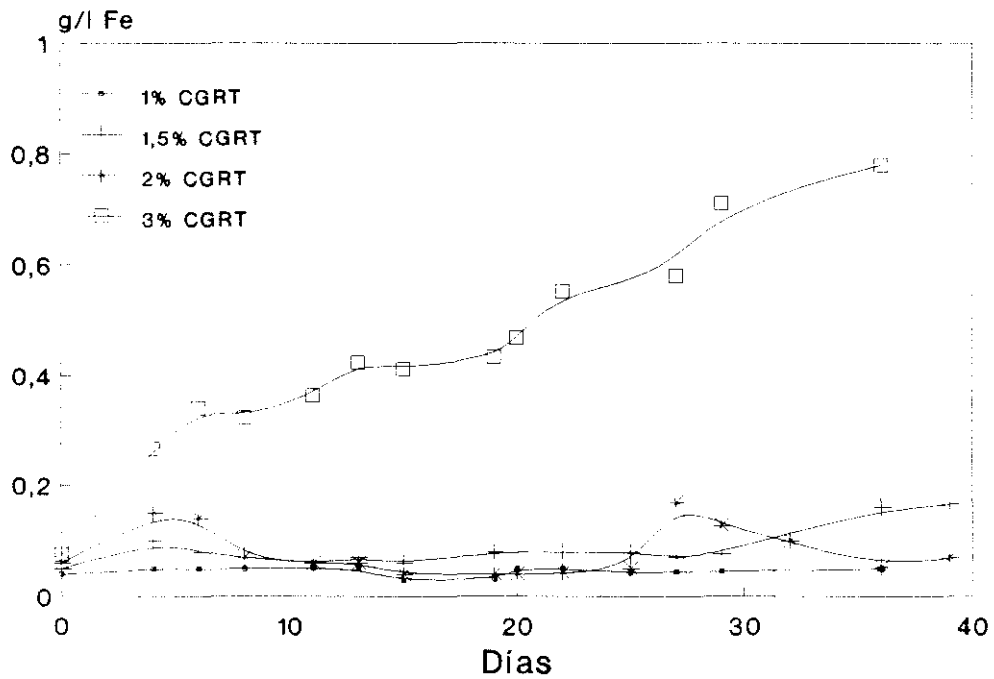


Figura 33: Disolución de hierro durante los pases de adaptación al concentrado de cobre CGRT

4.6.2. Estudio de la especificidad de TMRT por los sulfuros de cobre

Ensayos con blenda pura.- Como se vio en los ensayos de biolixiviación anteriores, el microorganismo termófilo moderado TMRT presentó una cierta especificidad por los sulfuros de cobre, mientras que su influencia en la extracción de cinc fue muy escasa, lo que se pudo apreciar claramente al comparar los ensayos inoculados y los estériles.

Para corroborar estas afirmaciones, se realizaron una serie de ensayos en los que se determinó la capacidad de extracción de cinc utilizando diferentes microorganismos (TMRT, TERT, *T. ferrooxidans* ATCC 19859 y un cultivo mixto de termófilos moderados) cuando la fuente de energía fue un sulfuro de cinc puro. La muestra original del sulfuro fue blenda acaramelada procedente de la mina Áliva en los Picos de Europa. El mineral fue molido manualmente hasta conseguir un tamaño de partícula menor de 74 μm . En todos los ensayos, la densidad de pulpa elegida fue de un 1% para evitar que los valores de cinc en solución sobrepasaran los límites de tolerancia por parte de las bacterias.

Los resultados de estos ensayos, después de 40 días, mostraron que en todos los casos, con excepción del inoculado con TMRT, se producía una extracción de cinc muy superior a la obtenida en los ensayos estériles (gráfica 34).

En el caso de TMRT, la concentración de cinc en solución fue del mismo orden que en el ensayo estéril (gráfica 34). Se observó que la mayor cantidad de cinc se solubilizaba con el cultivo mixto a 50°C, muy por encima de los valores logrados con cultivos puros, ya fuera de mesófilos (*T. ferrooxidans* ATCC 19859) o de termófilos extremos (TERT). La presencia de distintas especies bacterianas, en los cultivos mixtos, hizo que el efecto de unas se sumase al de otras mejorando el rendimiento global del proceso.

Con respecto al crecimiento de los microorganismos en los cultivos, en todos los casos se pudo apreciar un aumento de la población bacteriana, pero mientras que en el ensayo inoculado con TMRT la población simplemente se mantuvo o aumentó ligeramente, debido a que este microorganismo no pudo utilizar los sulfuros de cinc como fuente de energía, los otros tres cultivos utilizados si que crecieron de manera notable. Hay que

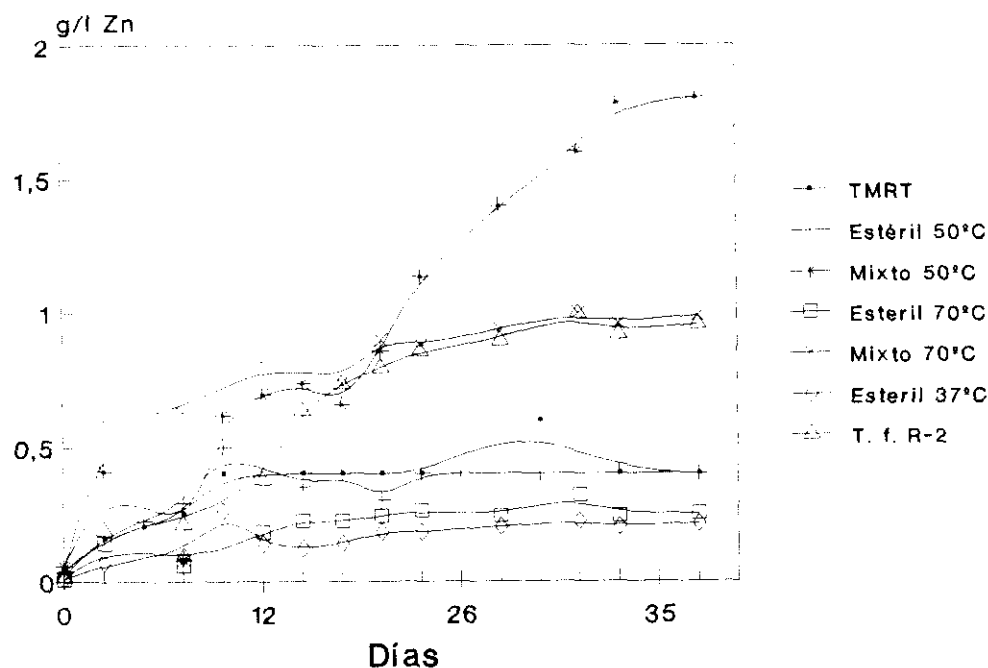


Figura 34: Disolución de cinc en los ensayos con blenda pura por los diferentes microorganismos utilizados

destacar la rapidez de crecimiento de *T. ferrooxidans* ATCC 19859, que a los 10 días ya había alcanzado su máxima población para mantenerse, en los mismos valores, a lo largo del experimento. El cultivo mixto tuvo un período de adaptación mayor, pero también creció rápidamente, mientras que fue la bacteria TERT la que tuvo un mayor período de adaptación y su fase exponencial fue, así mismo, la más larga. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, los tres cultivos bacterianos alcanzaron, al final del experimento, un número similar de células (gráfica 35). El pH en los cultivos inoculados descendió por debajo del valor de los ensayos estériles, incluso en el ensayo inoculado con TMRT, aunque con muy poca diferencia respecto al estéril correspondiente. En los otros casos, la diferencia fue mucho más apreciable. Hay que destacar que fue nuevamente con el cultivo mixto de termófilos moderados donde se alcanzó un valor de pH más bajo, algo que estuvo de acuerdo con los valores obtenidos anteriormente, puesto que un mayor ataque al ZnS implicó una mayor conversión de los sulfuros en sulfatos y una mayor producción de ácido sulfúrico. Además, en este ensayo el pH mínimo se alcanzó mucho más rápidamente que en los otros ensayos inoculados (gráfica 36).

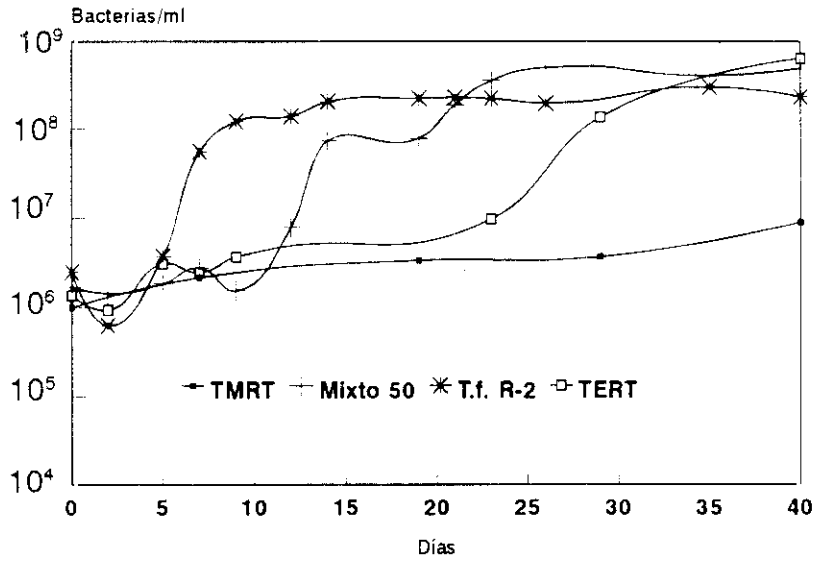


Figura 35: Crecimiento de los diferentes microorganismos al utilizar blenda pura como única fuente de energía.

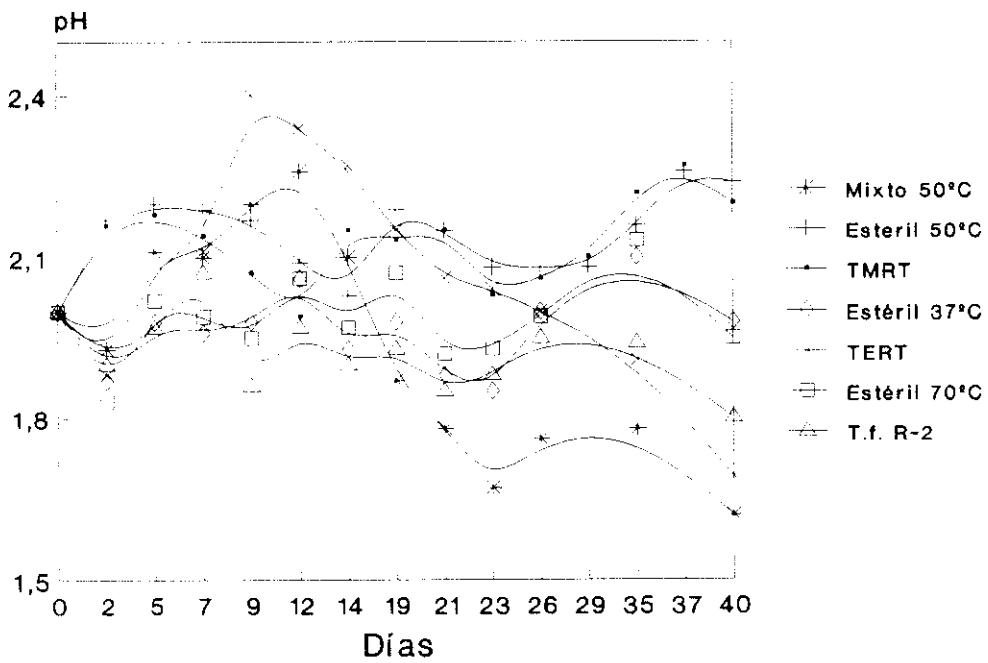


Figura 36: Evolución del pH en los ensayos con blenda pura inoculados con diferentes cultivos de microorganismos.

Ensayos con probetas masivas de calcopirita.- Con el fin de disponer de nuevas evidencias en cuanto a la especificidad del microorganismo TMRT por los sulfuros de cobre, se realizaron otros experimentos sobre probetas de muestras masivas de calcopirita según se describe en "Materiales y Métodos".

La muestra original (figura 37) presentaba fracturas originadas a partir de poros o defectos del mineral. La calcopirita en medio ácido, como en este caso (pH 2), es prácticamente inerte. Así, después de 50 días de lixiviación química la superficie de la probeta apareció muy poco atacada (figura 38).

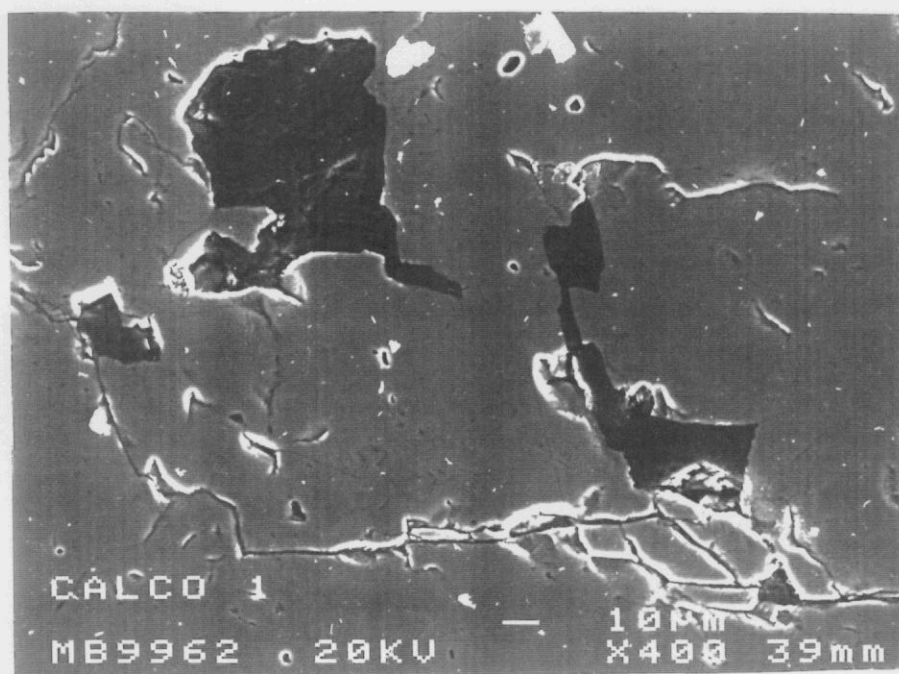


Figura 37: Probeta de calcopirita antes de ser atacada

La presencia de bacterias produjo un fuerte ataque que llegó a fracturar las partículas de mineral (figura 39). Esta fracturación, favorecida por los defectos estructurales, estuvo acompañada de un desmoronamiento de material (figura 40) que facilitó el proceso de disolución de la calcopirita. De hecho, estas partículas desprendidas presentaron grietas debidas al proceso de biolixiviación (figura 41), lo que fue indicativo de que el ataque

Ensayos con probetas masivas de calcopirita.- Con el fin de disponer de nuevas evidencias en cuanto a la especificidad del microorganismo TMRT por los sulfuros de cobre, se realizaron otros experimentos sobre probetas de muestras masivas de calcopirita según se describe en "Materiales y Métodos".

La muestra original (figura 37) presentaba fracturas originadas a partir de poros o defectos del mineral. La calcopirita en medio ácido, como en este caso (pH 2), es prácticamente inerte. Así, después de 50 días de lixiviación química la superficie de la probeta apareció muy poco atacada (figura 38).

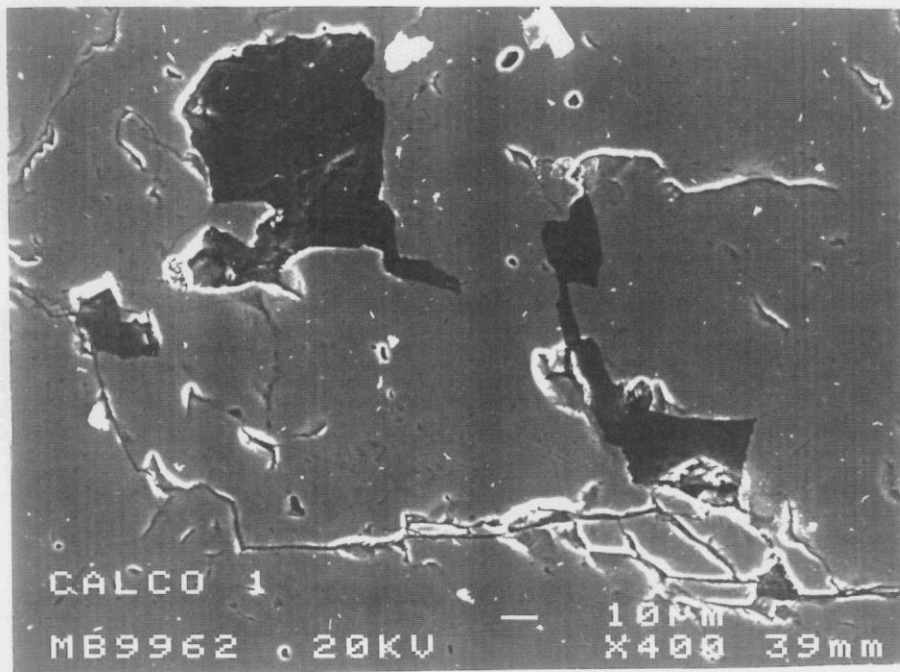


Figura 37: Probeta de calcopirita antes de ser atacada

La presencia de bacterias produjo un fuerte ataque que llegó a fracturar las partículas de mineral (figura 39). Esta fracturación, favorecida por los defectos estructurales, estuvo acompañada de un desmoronamiento de material (figura 40) que facilitó el proceso de disolución de la calcopirita. De hecho, estas partículas desprendidas presentaron grietas debidas al proceso de biolixiviación (figura 41), lo que fue indicativo de que el ataque



Figura 39: Vista general de una de las partículas incluidas en la probeta sometida a la acción de las bacterias

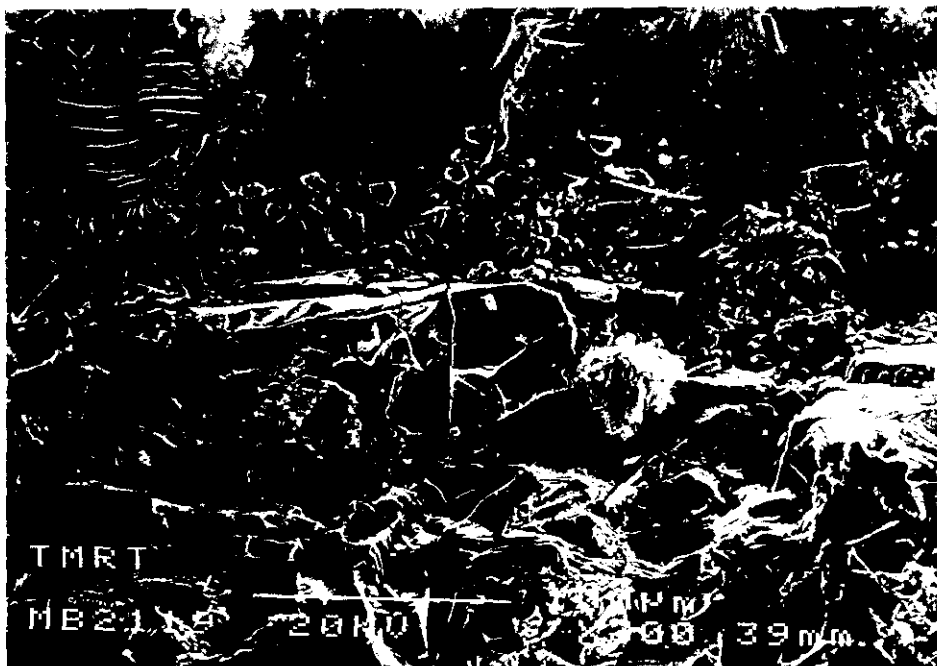


Figura 40: Detalle de la probeta de calcopirita atacada con bacterias. Se puede apreciar claramente el desmoronamiento de partículas sobre la superficie de la probeta.

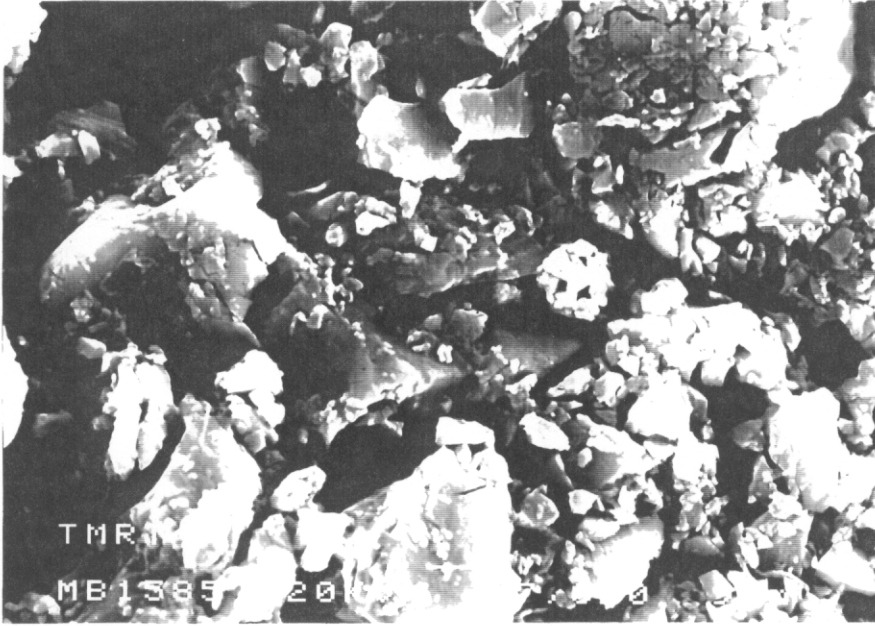


Figura 41: Detalle de las partículas de mineral en las que se pueden apreciar las fracturas producidas durante el ataque bacteriano.

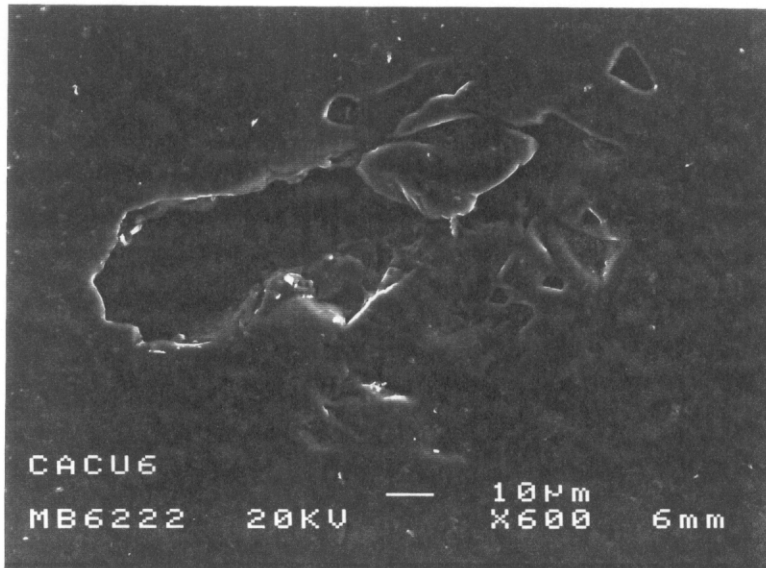


Figura 42: Probeta de calcopirita atacada con *T.ferrooxidans*

4.6.3. Ensayos de evolución de poblaciones a 50°C

Uno de los problemas que se plantean a la hora de trabajar con cultivos puros, a escala industrial, es la imposibilidad de mantener la pureza de los cultivos cuando los volúmenes de mineral y medio líquido son muy grandes. Lógicamente, el cultivo puro inicial irá incorporando nuevos microorganismos y el conjunto del proceso de biolixiviación se verá afectado, positiva o negativamente, en función de los nuevos microorganismos.

Para abordar este problema, se realizaron una serie de ensayos en los que, a partir de un inóculo inicial del cultivo puro de TMRT, se dieron pases sucesivos incorporando, en cada nuevo ensayo, mineral sin esterilizar. En estos ensayos, además de controlar la cantidad de metal extraída, se realizaron tomas de muestra periódicas para observar la presencia de nuevas especies bacterianas con la ayuda del microscopio electrónico.

Los concentrados minerales utilizados fueron los CCu, CCuL y CGRT. La densidad de pulpa fue del 3% y la cantidad de inóculo inicial del 5%.

En el primer pase realizado se observaron diferentes comportamientos en función del concentrado mineral ensayado. Así, sobre CCu, las curvas de disolución de metales tuvieron características muy similares a las obtenidas con el microorganismo aislado TMRT. Sin embargo, en los otros dos concentrados se observaron importantes diferencias pues las cantidades de cobre y cinc disueltas fueron claramente superiores, especialmente en el caso del concentrado CCuL. Así mismo, también destacó la disminución del pH en estos dos ensayos. Al microscopio electrónico, después de 20 días de experimentación, se observó un absoluto dominio de la población de TMRT en el ensayo sobre CCu, mientras que en los otros dos concentrados, especialmente en el de CCuL, se observaron otros tipos de bacterias, aunque TMRT siguió siendo la bacteria predominante en los cultivos.

En el concentrado CCu se pudo apreciar una disminución del número de células a lo largo del tiempo, habiéndose encontrado en el tercer pase un número bastante reducido de ellas en comparación con los ensayos sobre los otros concentrados minerales (figura 43), lo que podría explicar la disminución en la extracción metálica que se registró después de los

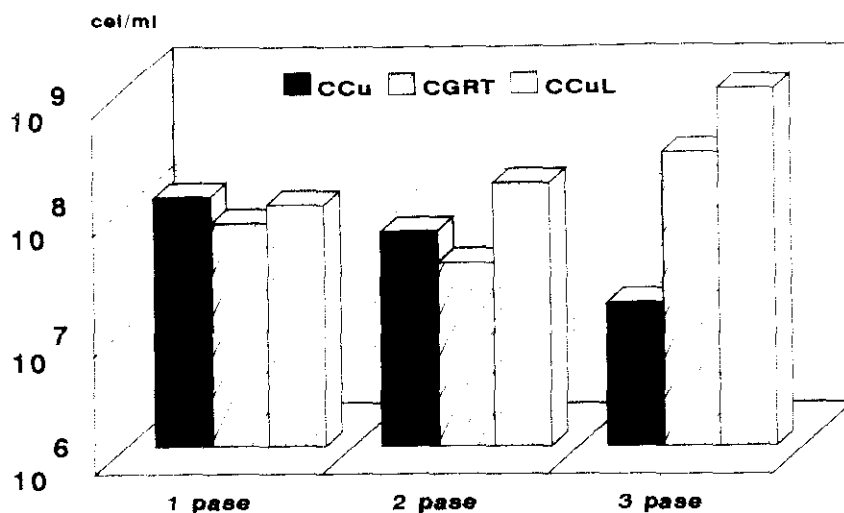


Figura 43: Número final de bacterias presentes en los cultivos de los ensayos de evolución de poblaciones bacterianas en cada uno de los concentrados minerales utilizados.

tres pases, especialmente en el caso del cobre (figura 44). La población bacteriana siguió siendo mayoritariamente de un sólo tipo, correspondiente morfológicamente a TMRT, aunque se pudieron observar otras bacterias y aparecieron hongos en las muestras.

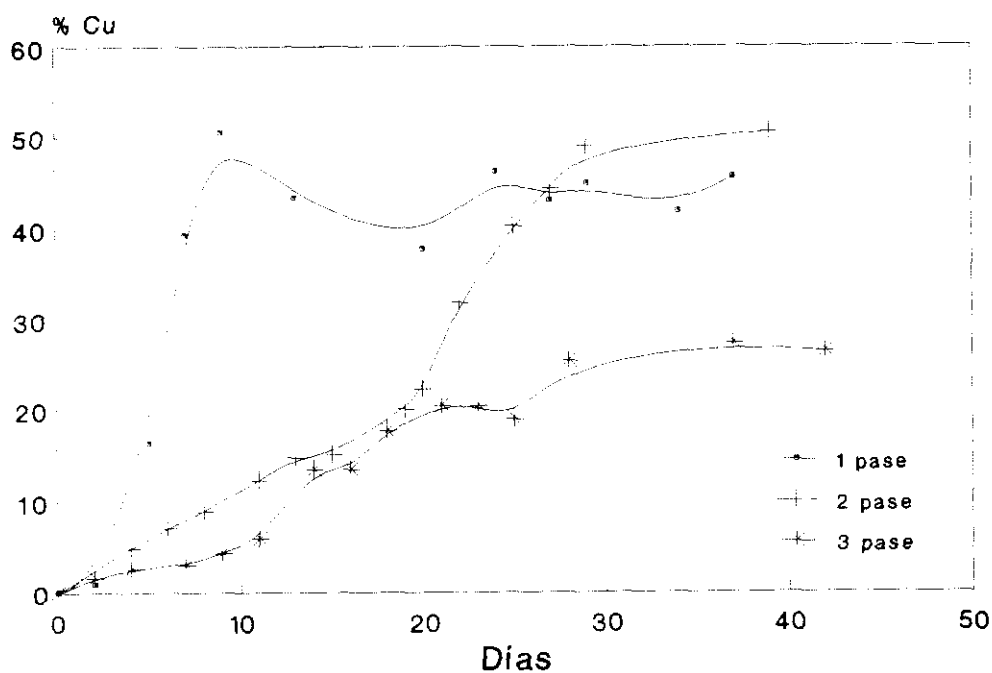


Figura 44: Disolución de cobre en los tres pases de evolución de poblaciones a partir del concentrado de cobre CCu.

El pH se mantuvo muy alto en los tres pases (figura 45), sin bajar de 2 en ninguno de ellos. Esto indica una escasa actividad bacteriana. Tanto la disolución de cinc como la de hierro siguen un comportamiento bastante similar en los tres pases (figuras 46 y 47).

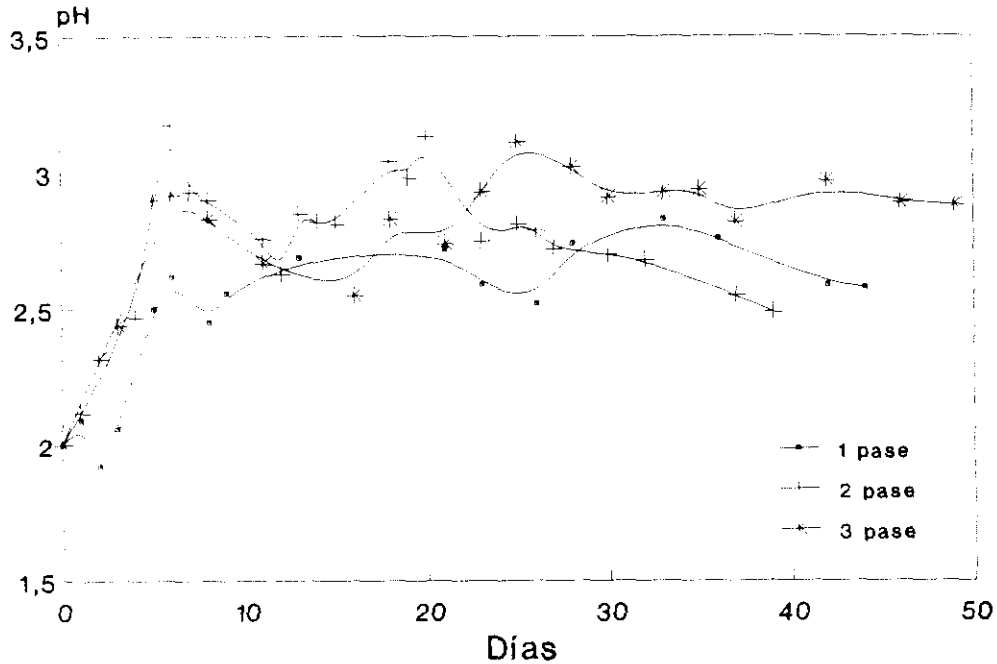


Figura 45: Evolución del pH en los tres pases realizados sobre el concentrado de cobre CCu.

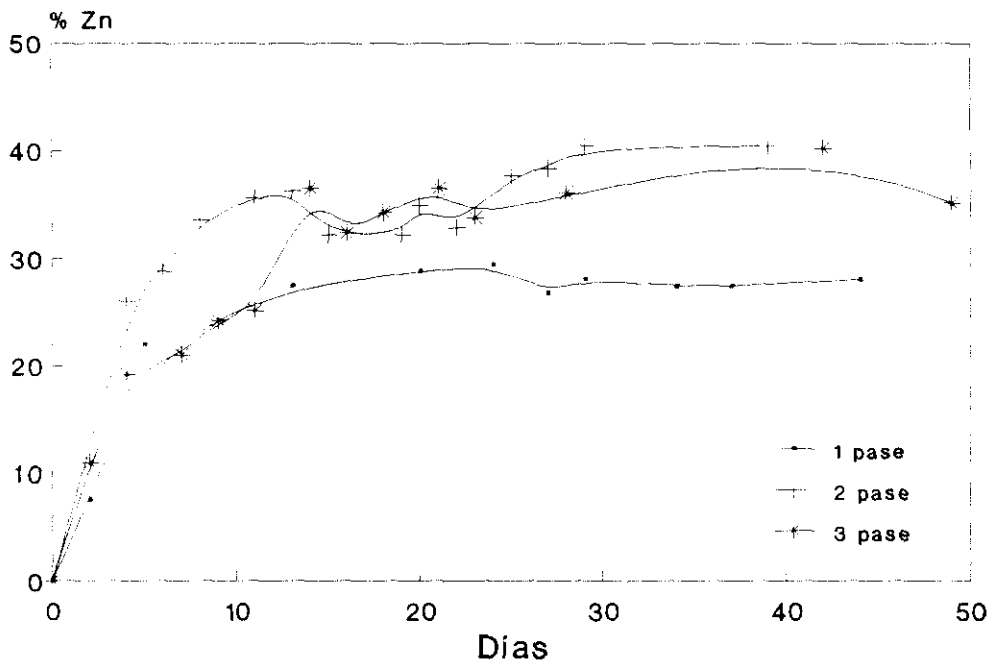


Figura 46: Disolución de cinc en los tres pases de evolución de poblaciones a partir del concentrado de cobre CCu.

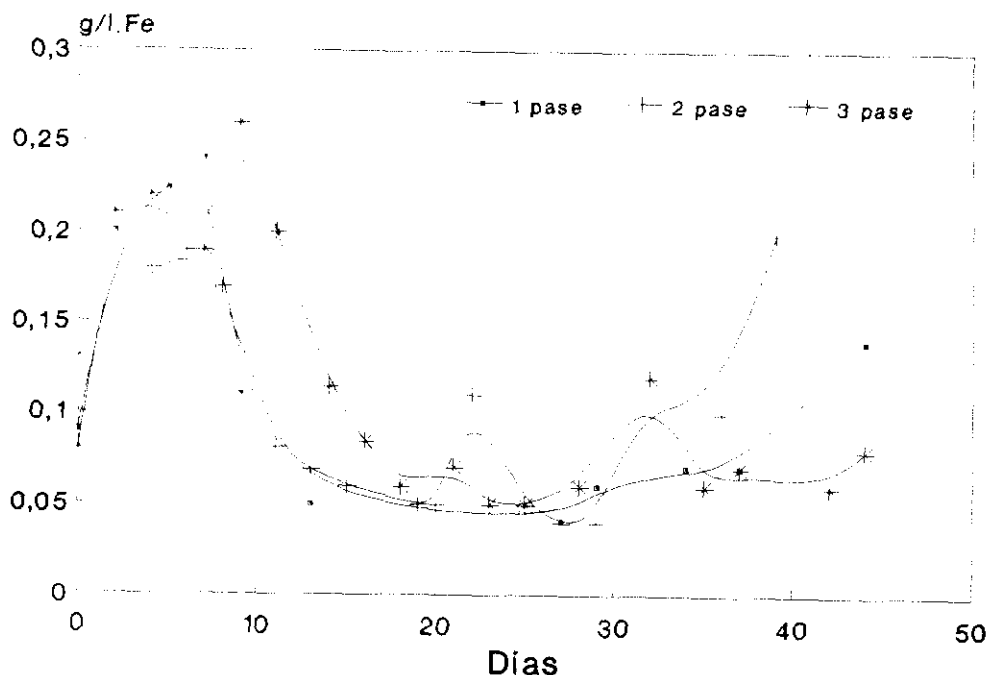


Figura 47: Disolución de hierro en los tres pases de evolución de poblaciones a partir del concentrado de cobre CCu.

En los ensayos con el concentrado mineral CGRT si se observó una colonización por parte de otros microorganismos distintos de TMRT después de los tres pases, especialmente en el último. En el segundo pase, el número de células (mayoritariamente TMRT) disminuyó, pero en el tercero volvió a aumentar la densidad de población microbiana, con una importante presencia de bacterias cocoides, mientras que las bacterias tipo TMRT descendieron en su importancia relativa. El pH subió inicialmente en los tres ensayos, debido al consumo de ácido por la ganga del mineral, pero a partir de los diez días de experimentación disminuyó, debido a la actividad de las bacterias presentes en el cultivo, hasta llegar a valores muy cercanos o por debajo de 2 (figura 48).

La extracción metálica no fue muy importante en el caso del cobre y del hierro (figuras 49 y 50). Hubo una fase de latencia muy prolongada, posiblemente, debida a que el pH del medio fue muy elevado para una actividad óptima por parte de las bacterias. A partir de los 25 días, con valores de pH en torno a 2,5, fue cuando se pudo apreciar un aumento de la disolución del cobre y del hierro. El cinc se disolvió con un comportamiento también

muy similar en los tres casos: hubo una rápida disolución inicial para luego aumentar lentamente la concentración de metal en solución. Esta primera parte correspondería a la disolución química mientras que la segunda sería una función de la acción de las bacterias presentes en el cultivo (figura 51).

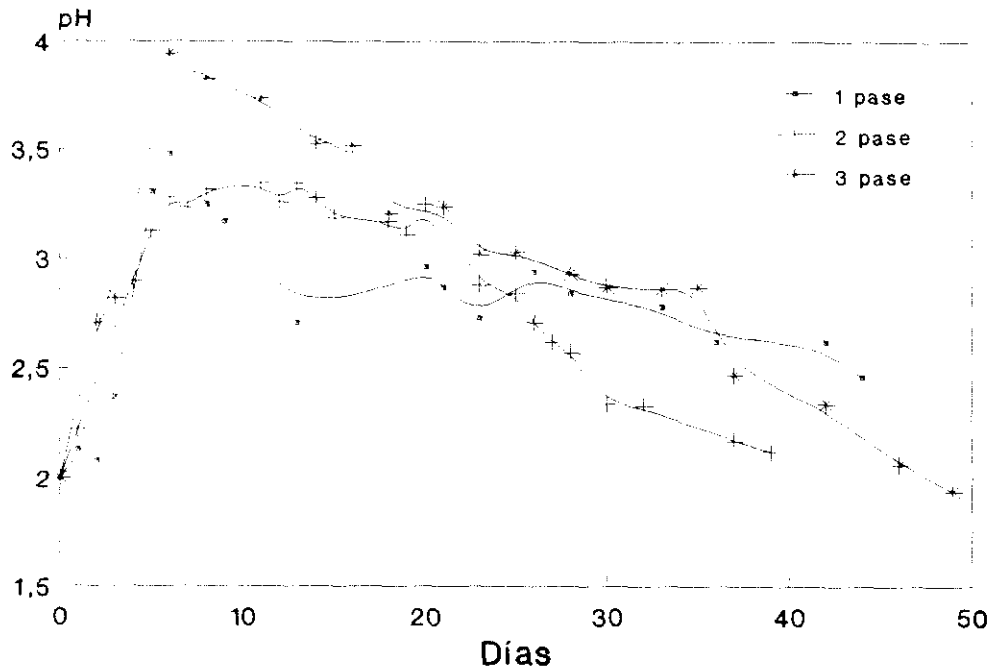


Figura 48: Evolución del pH en los tres pases de evolución de poblaciones a partir del concentrado global CGRT

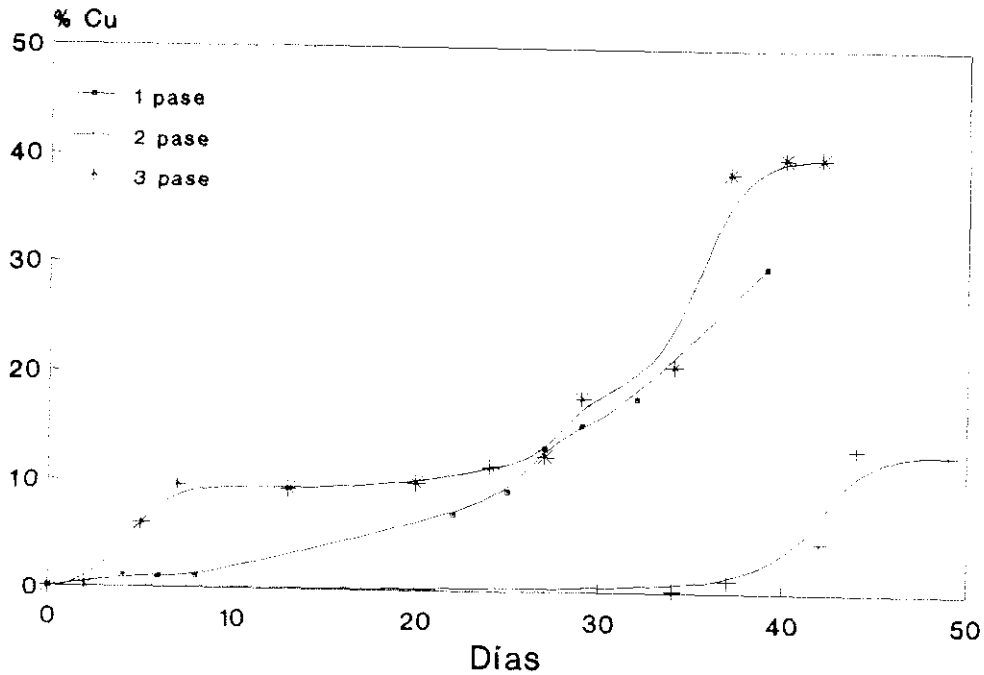


Figura 49: Disolución de cobre en los tres pases de evolución de poblaciones a partir del concentrado global CGRT.

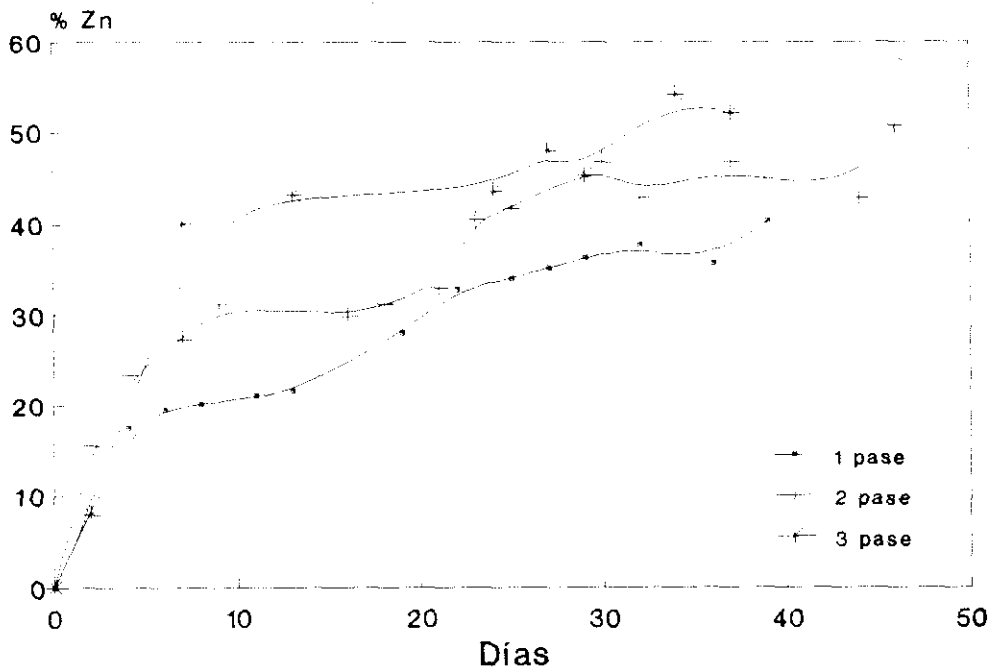


Figura 50: Disolución de cinc en los tres pases de evolución de poblaciones a partir del concentrado global CGRT.

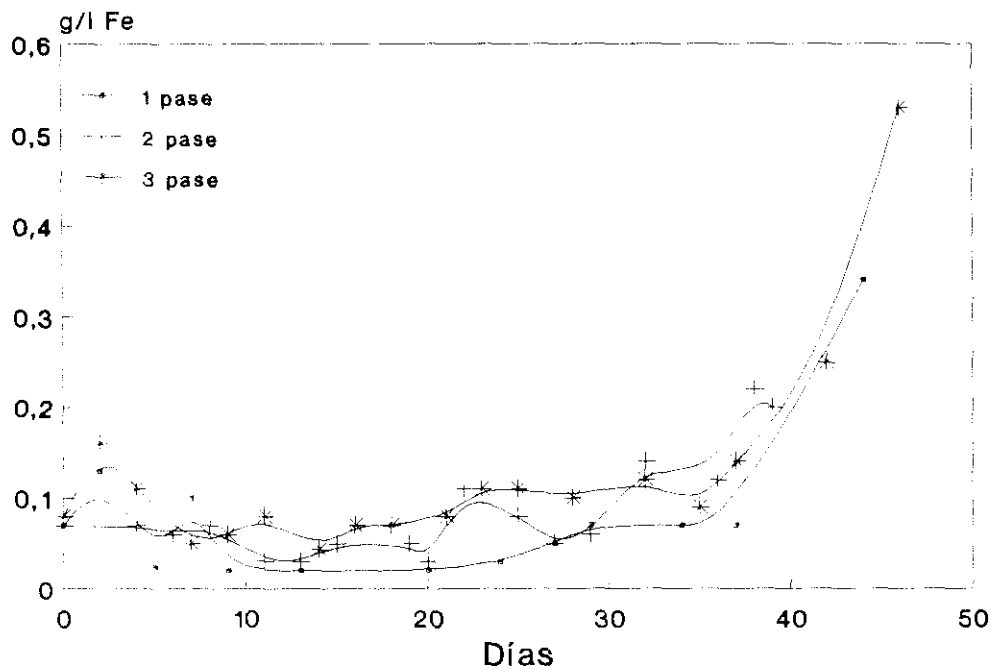


Figura 51: Disolución de hierro en los tres pases de evolución de poblaciones a partir del concentrado global CGRT.

En los ensayos con el concentrado CCuL fue donde más evolucionó la población inicial, compuesta únicamente del microorganismo termófilo moderado, llegando en el tercer pase a una población mixta pero con un claro predominio de bacterias cocoides. Estas bacterias ya estaban presentes, de forma importante, al final del primer pase y en los dos pases sucesivos aumentaron su importancia relativa hasta llegar a colonizar casi totalmente el cultivo bacteriano. Esto se tradujo en el trazado de las curvas de extracción metálica (figuras 52 a 54).

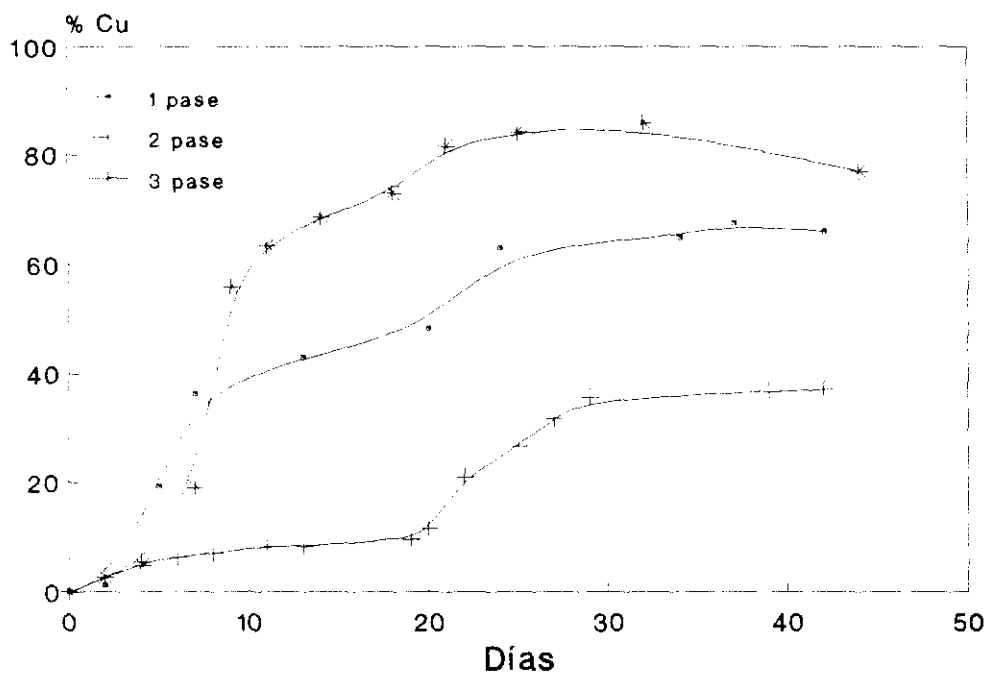


Figura 52: Disolución de cobre a partir del concentrado CCuL en los tres pases realizados para estudiar la evolución de la población de bacterias presentes en el cultivo.

En el primer pase hubo una importante disolución de cobre mientras que la del hierro fue bastante escasa. El cinc pareció seguir una curva de disolución esencialmente química. Esto confirmó los resultados obtenidos con TMRT, que en este pase fue el microorganismo predominante en el cultivo. En el segundo pase, donde la población estuvo más diversificada, se produjo una importante disminución de la extracción de cobre (el metal que más extrae TMRT), con una fase de latencia prolongada (en torno a los 20 días), donde los nuevos microorganismos se estaban adaptando al mineral, mientras que aumentó la cantidad de cinc

y, más ligeramente, la de hierro en solución. En el tercer pase, con estos microorganismos ya adaptados, hubo un gran aumento en la disolución de los tres metales, especialmente en el hierro y el cinc. El pH, que en los pases anteriores sólo disminuía por debajo de 2 en los últimos días del experimento, en el tercer pase descendió muy rápidamente al principio para luego mantenerse en valores por debajo de 1,5 (figura 55). El número de células en este tercer pase fue el más alto de todos los experimentos, lo que contribuyó al aumento espectacular en la lixiviación de metales.

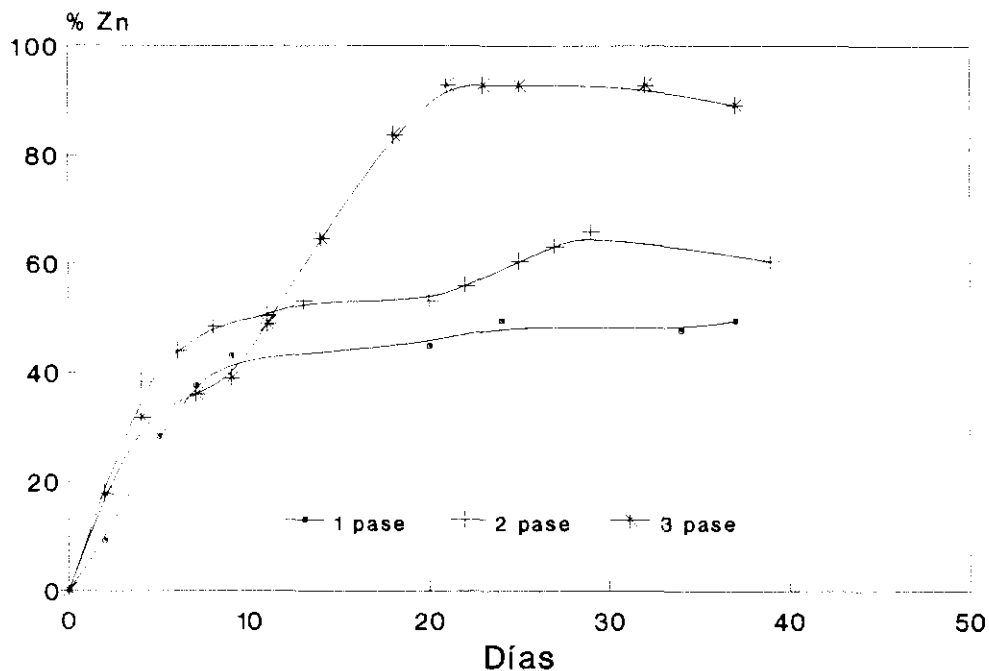


Figura 53: Disolución de cinc a partir del concentrado CCuL en los tres pases realizados para estudiar la evolución de la población de bacterias presentes en el cultivo.

Una de las razones que podrían explicar el desarrollo de nuevas especies bacterianas en este concentrado, y los altos rendimientos obtenidos, sería el hecho de que este concentrado fue lavado previamente para eliminar los reactivos procedentes del proceso de flotación al que había sido sometido. Además, mientras que los otros dos concentrados permanecieron durante un cierto tiempo almacenados en el laboratorio, el concentrado CCuL fue usado inmediatamente después de ser recibido de la mina de Río Tinto.

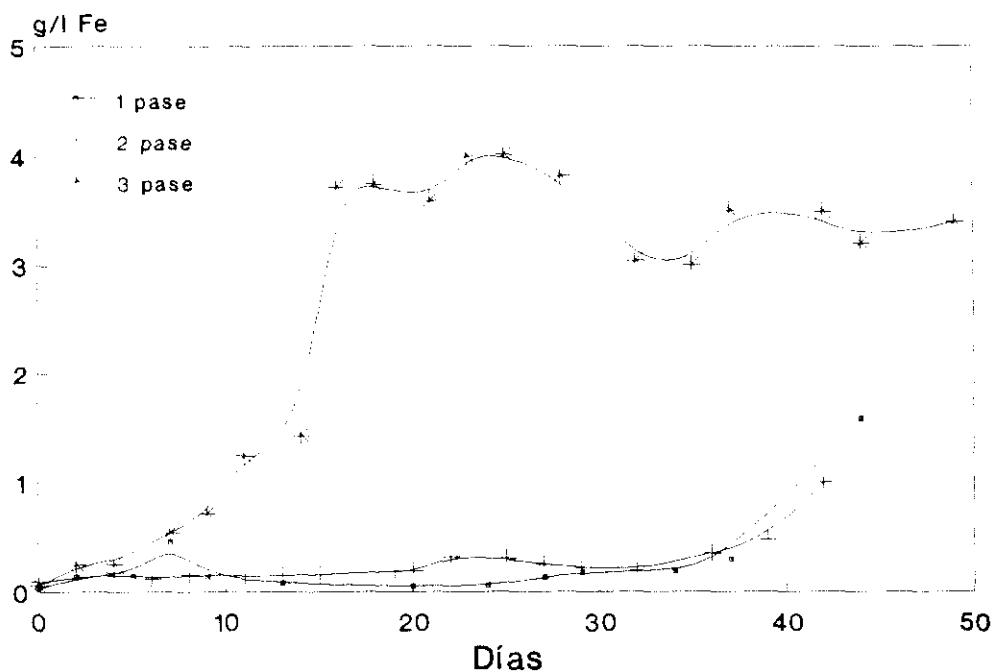


Figura 54: Disolución de hierro a partir del concentrado CCuL en los tres pases realizados para estudiar la evolución de la población de bacterias presentes en el cultivo.

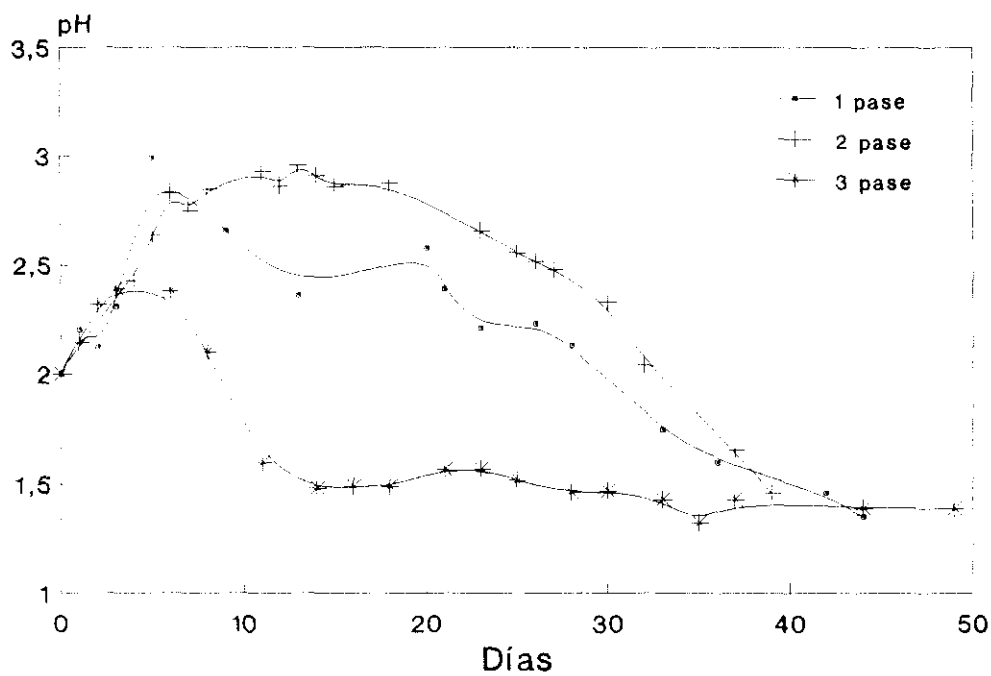


Figura 55: Evolución del pH en los tres pases de evolución de poblaciones de microorganismos sobre el concentrado CCuL

Estos experimentos dejaron constancia de la presencia en el mineral de diferentes microorganismos capaces de desarrollarse con éxito a temperaturas de 50°C. Microorganismos de este tipo ya se habían encontrado en montones de lixiviación de cobre (Brierley C.L., 1978) o en montones de carbón (Marsh y Norris, 1983). Como se vio claramente en el caso del concentrado CCuL, la presencia de un cultivo mixto puede suponer algunas ventajas con respecto a la aplicación de un cultivo puro. La cantidad de metales en solución fue sensiblemente más alta, algo que puede parecer lógico si se tiene en cuenta que las nuevas bacterias presentes en los cultivos estaban bien adaptadas a los minerales utilizados puesto que estaban asociadas a ellos. Sin embargo, en nuestro caso, se perdió en contrapartida la especificidad de extracción de cobre que se lograba al utilizar un cultivo puro de TMRT. Por otra parte, en los otros dos concentrados, la presencia de un cultivo mixto no favoreció la lixiviación metálica, es más, la presencia de nuevos microorganismos afectó de alguna forma el crecimiento de TMRT puesto que este no solo no aumentó, sino que, en el caso del concentrado CCu, prácticamente desapareció del cultivo sin que los microorganismos que lo sustituyeron aportasen ventajas en el proceso de biolixiviación.

En vista del resultado obtenido con estos ensayos y para poder diferenciar el efecto en la biolixiviación de las poblaciones bacterianas propias de cada concentrado mineral, se realizaron nuevos ensayos en los que nuevamente se utilizó mineral sin esterilizar, pero sin inóculo previo de ningún otro microorganismo. El resultado de estos ensayos está reflejado en las gráficas 56 a 60.

En la gráfica 56 se puede ver que fue en el concentrado CCuL donde primero aparecieron microorganismos y donde más se desarrollaron, lo que apoyó los resultados conseguidos anteriormente. La población bacteriana que se encontró en el ensayo con el concentrado CCu fue la más pequeña al finalizar el experimento. Este concentrado fue el que estuvo más tiempo almacenado en el laboratorio, lo que implicó una pérdida de la población autóctona con el paso del tiempo al carecer de las condiciones adecuadas para su mantenimiento.

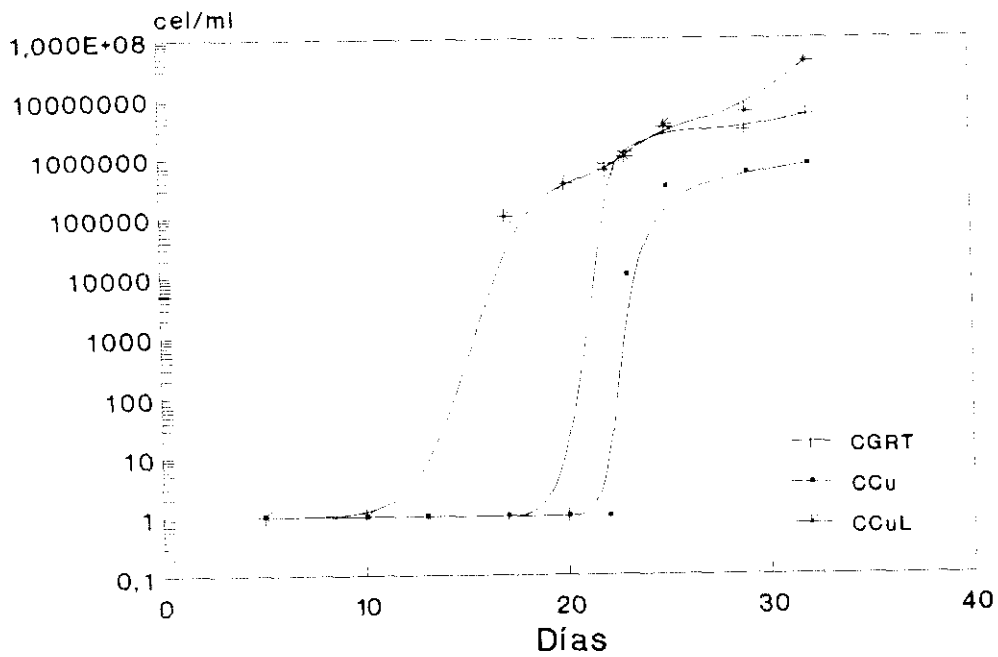


Figura 56: Desarrollo de la población de bacterias en los ensayos blancos (ensayos no inoculados y mineral sin esterilizar) de los tres concentrados minerales.

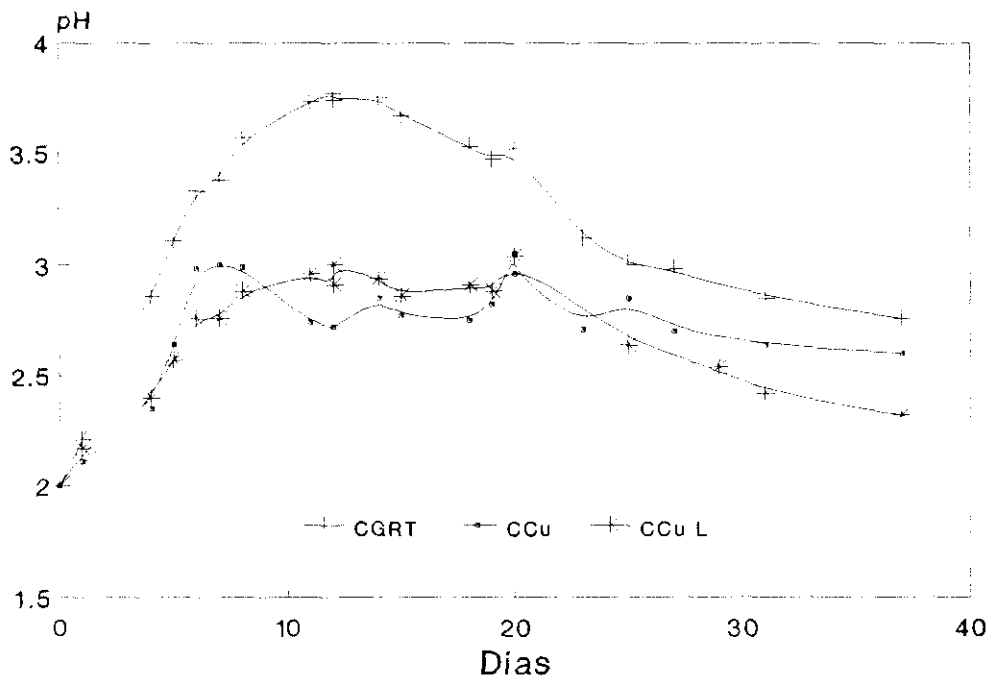


Figura 57: Evolución del pH en los ensayos blancos sobre los tres concentrados minerales.

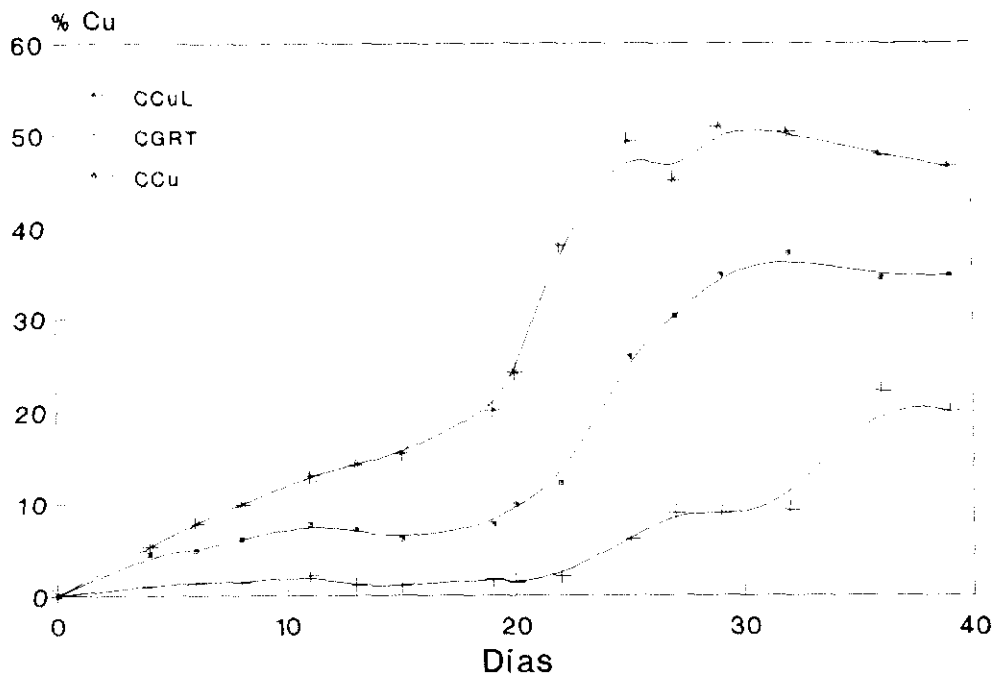


Figura 58: Disolución de cobre en los ensayos blancos.

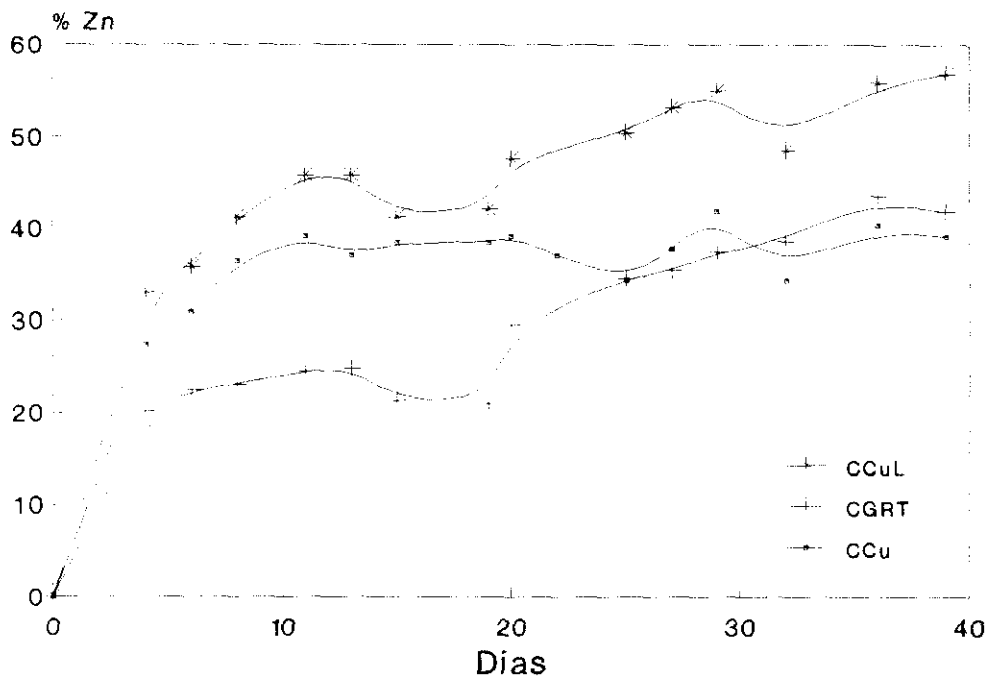


Figura 59: Disolución de cinc en los ensayos blancos.

En cuanto a la disolución de metales, se pudo comprobar que la población bacteriana más activa fue, en cuanto a todos los metales analizados, la que creció sobre el concentrado CCuL, si bien hay que indicar que las diferencias en cuanto a densidad de población y pH, ligeramente más bajo en este concentrado que en el resto, contribuyeron de forma importante a la mayor lixiviación de cationes metálicos.

Las bacterias presentes en estos cultivos correspondieron, en su mayor parte, a cocos móviles, aunque también aparecieron microorganismos, de gran tamaño, de forma bacilar o irregular.

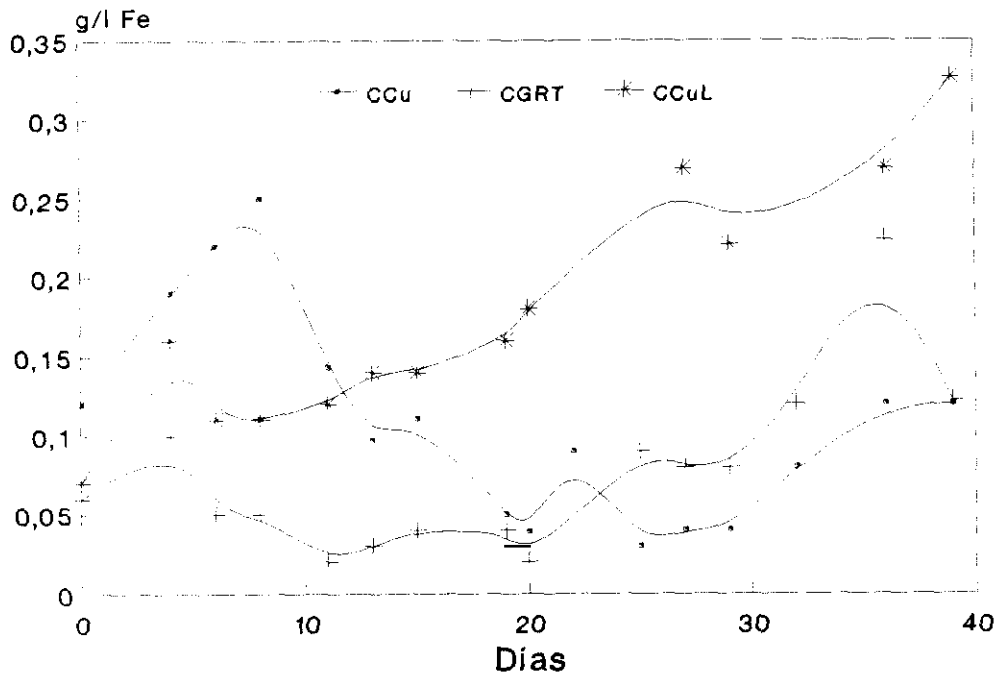


Figura 60: Disolución de hierro en los ensayos blancos.

La gran mayoría de estas bacterias fueron quimiolitótrofas, ya que se desarrollaron bien en el medio 9K sin hierro teniendo el mineral como única fuente de energía disponible.

En las gráficas 61 a 63 se puede ver que se produjo una oxidación de la mayor parte del Fe^{2+} a Fe^{3+} al final de los ensayos, cuando las poblaciones estuvieron más desarrolladas, mientras que al principio de los experimentos las cantidades de Fe^{2+} y Fe^{3+} estuvieron mucho

más equilibradas. Este comportamiento ferrooxidante contribuyó al proceso de lixiviación mediante el mecanismo indirecto.

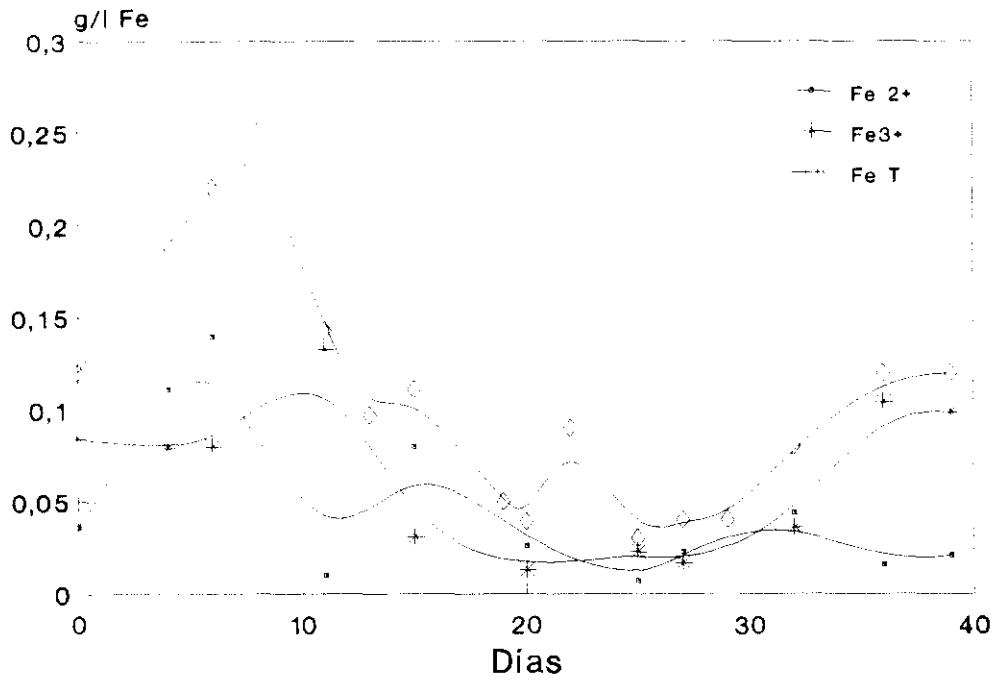


Figura 61: Estado del hierro en el ensayo blanco con el concentrado CCu

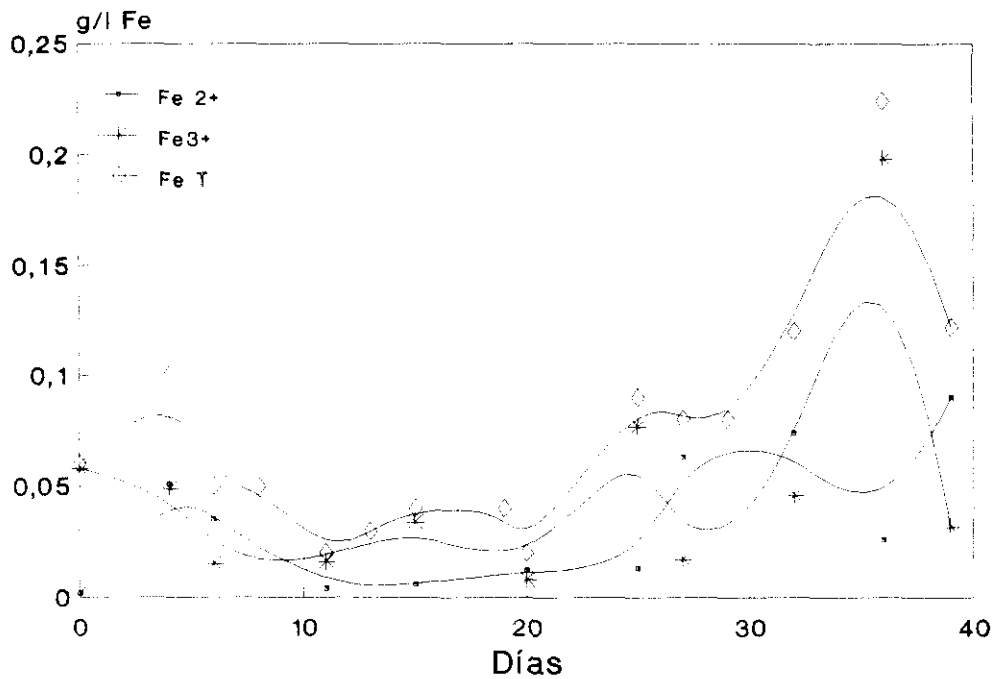


Figura 62: Estado del hierro en el ensayo blanco con el concentrado CGRT

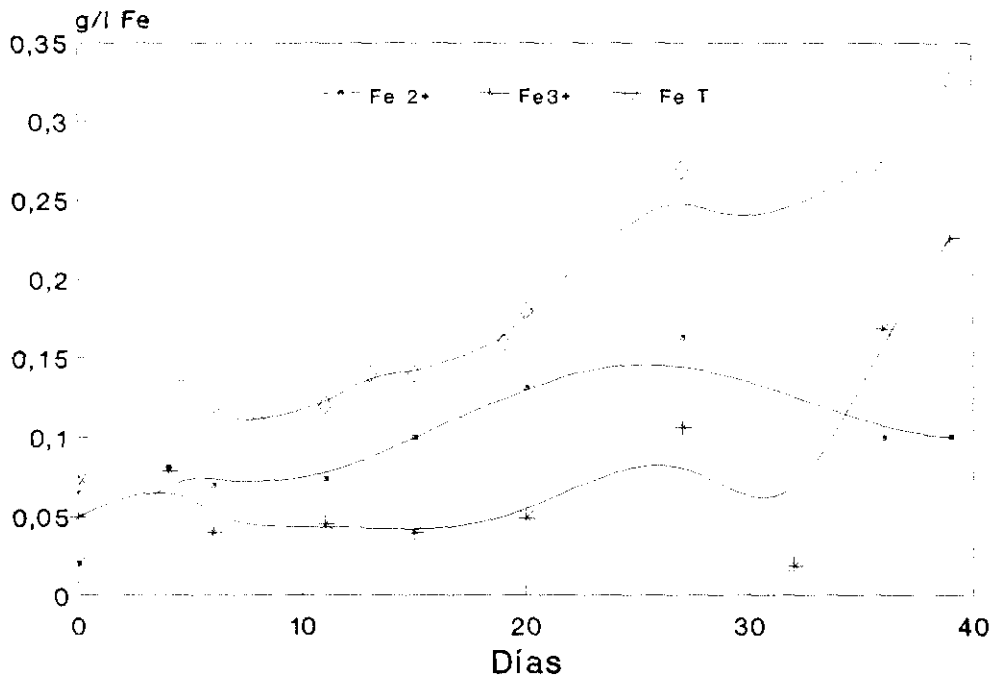


Figura 63: Estado del hierro en el ensayo blanco con el concentrado CCuL.

En todos los ensayos anteriores se observó como, inicialmente, el pH de las soluciones se elevaba considerablemente, con los posibles efectos negativos que ello conlleva tanto para las bacterias (cuyo pH óptimo de crecimiento estaba en torno a 2) como para el propio proceso de biolixiviación, ya que las soluciones ácidas favorecen el proceso a través de un ataque químico del mineral.

Para evitar estas subidas de pH, se planteó otra serie de experimentos en los que el pH de la solución se mantendría controlado mediante la adición de ácido sulfúrico, dejándolo fijado en el nivel óptimo de las bacterias (pH 2) hasta el momento en que ellas mismas, debido al efecto de oxidación de los sulfuros, fueran capaces de mantenerlo o bajarlo sin la ayuda de adiciones de ácido.

Las condiciones de experimentación fueron las mismas que en los ensayos anteriores, es decir, se inoculó con un cultivo puro del microorganismo TMRT y se utilizaron los tres

concentrados sin esterilizar (CCU, CGRT y CCuL). Como control se dispuso de otra serie de ensayos en las mismas condiciones pero sin inocular.

En los primeros días de experimentación hubo que añadir ácido en todos los ensayos, especialmente en los que tenían el concentrado CGRT. A partir de los 15 días, los cultivos con mineral CCuL empezaron a disminuir el pH, coincidiendo con la aparición de nuevos microorganismos, similares a los observados en los anteriores ensayos, principalmente cocos. El ensayo en el que más lentamente bajó el pH, fue el realizado con el concentrado CCu y que no estaba inoculado (figura 64).

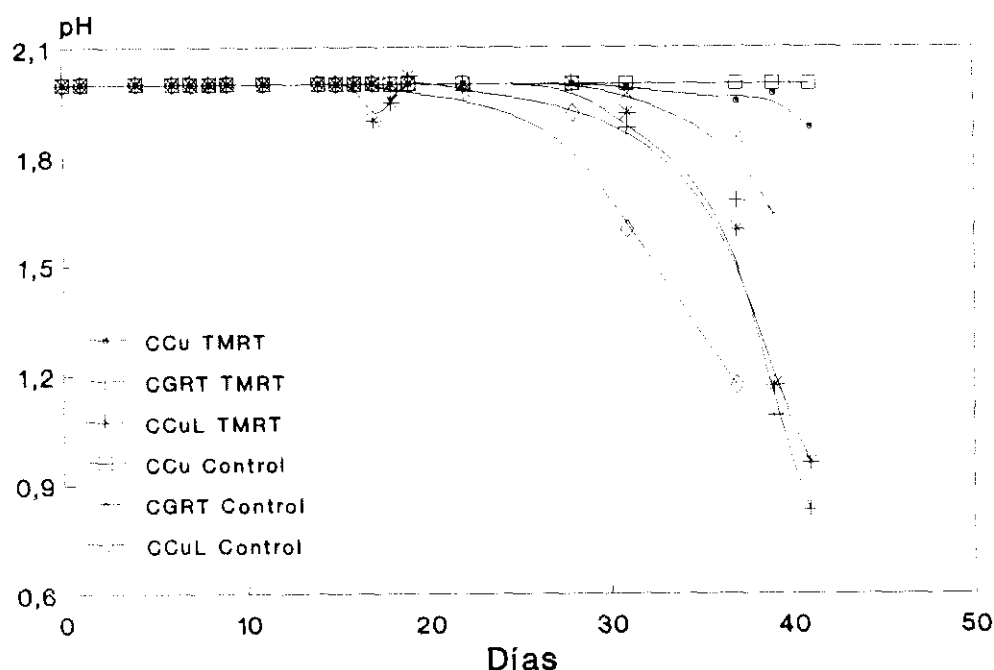


Figura 64: Evolución del pH en los ensayos con pH controlado sobre los tres concentrados minerales.

Como se mencionó anteriormente, sobre este concentrado mineral el número de bacterias que aparece fue mucho más pequeño que sobre los otros dos minerales.

El efecto conjunto de los microorganismos aislados TMRT y de las nuevas bacterias hizo que en los ensayos en los que se inocularon microorganismos, el pH bajase más

rápidamente. En los ensayos sobre los concentrados CGRT y CCuL sin inocular, el hecho de que existiera una mayor proliferación de nuevas bacterias facilitó la bajada del pH con respecto al ensayo con el concentrado CCu sin inocular.

En el proceso de extracción metálica podemos observar un fenómeno similar. En relación a la extracción de cobre (figura 65), la acción conjunta de los microorganismos nuevos y los inoculados, que como se ha mencionado anteriormente, tenían especificidad por los sulfuros de cobre, hizo que estos ensayos mostraran una mayor extracción de cobre que los ensayos control.

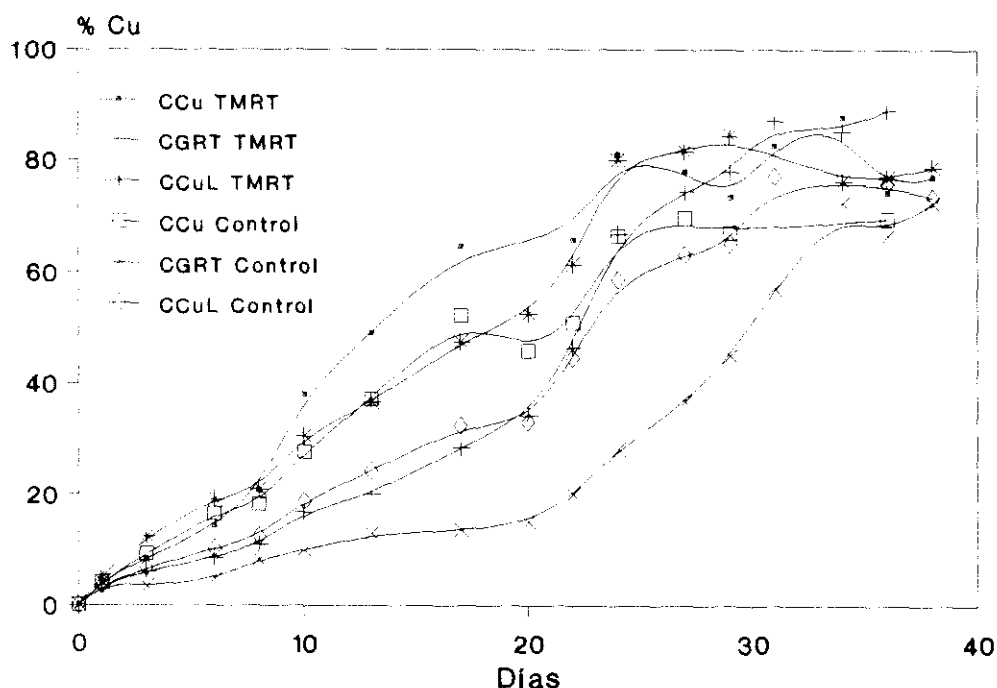


Figura 65: Disolución de cobre a partir de los diferentes concentrados en los ensayos con pH controlado.

Lo mismo ocurrió en el proceso de disolución de cinc (figura 66), si bien hay que destacar que en este caso, al final de la experimentación, se alcanzó una mayor concentración de cinc en solución en el control con CCuL que en el ensayo inoculado, ya que en este concentrado, como se ha dicho, fue donde aparecieron más tipos de microorganismos y donde las poblaciones autóctonas llegaron a ser más numerosas.

En la extracción de hierro (figura 67) fue donde se pudieron apreciar más diferencias ya que fue en los ensayos no inoculados donde la concentración de hierro en solución fue mayor. Una de las razones de este hecho debió de ser el carácter ferroxidante de las

bacterias que colonizaron el medio, mientras que en los cultivos inoculados con TMRT, al no ser capaz este microorganismo de oxidar el hierro y pese a la aparición de bacterias nuevas, la extracción de este catión no fue tan importante.

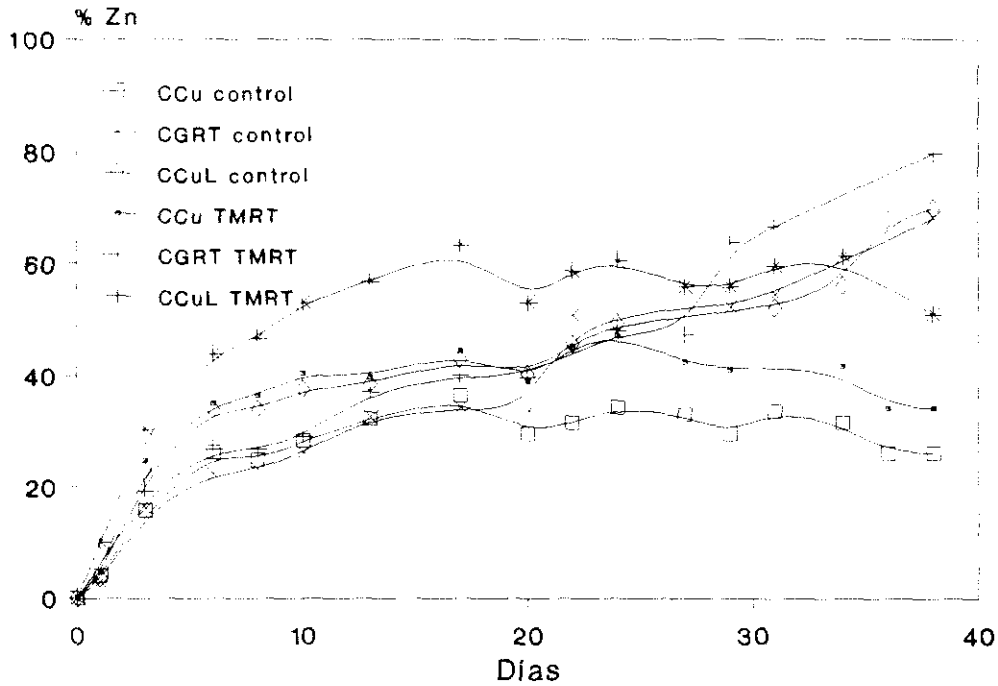


Figura 66: Disolución de cinc a partir de los diferentes concentrados en los ensayos con pH controlado.

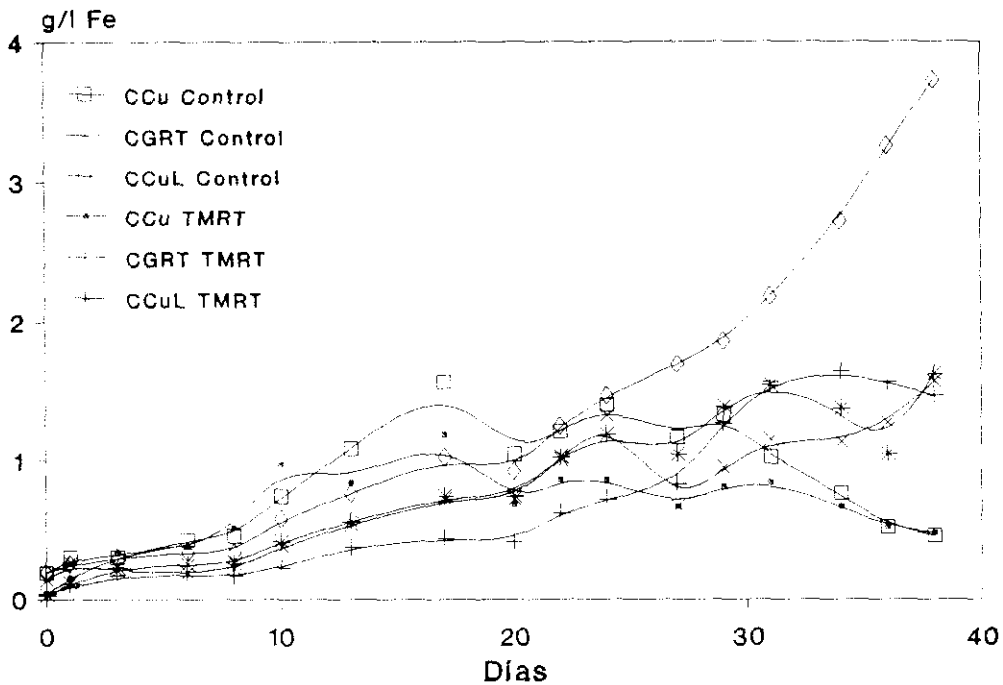


Figura 67: Disolución de hierro a partir de diferentes concentrados en los ensayos con pH controlado.

El carácter ferrooxidante de los nuevos microorganismos se puede comprobar estudiando los resultados de las gráficas 68 a 70. Inicialmente, el hierro que se extrajo del mineral estaba en forma de Fe^{2+} , sin embargo, al cabo de unos pocos días, y coincidiendo con la aparición de las bacterias en el medio, el Fe^{2+} comenzó a oxidarse a Fe^{3+} el cual es un fuerte oxidante que contribuyó de manera importante a la lixiviación química del mineral.

En los cultivos inoculados, el Fe^{2+} fue más abundante y solamente al final de los experimentos comenzó a oxidarse debido a la presencia de las otras bacterias (gráficas 71 a 73).

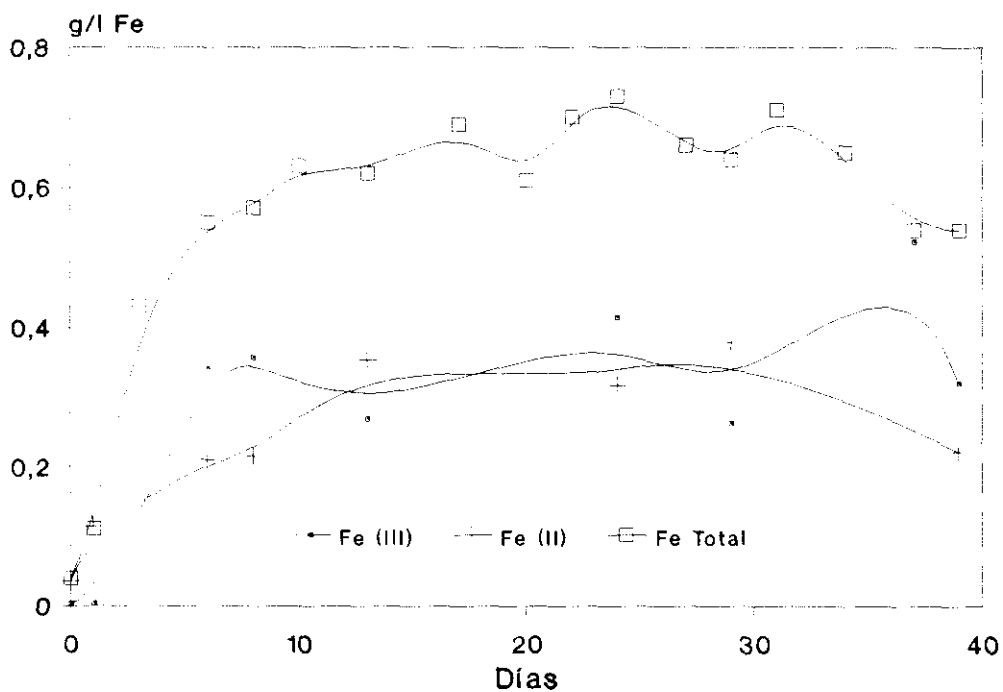


Figura 68: Estado de oxidación del hierro en solución en los ensayos con pH controlado. Ensayo con el concentrado CCu sin inocular.

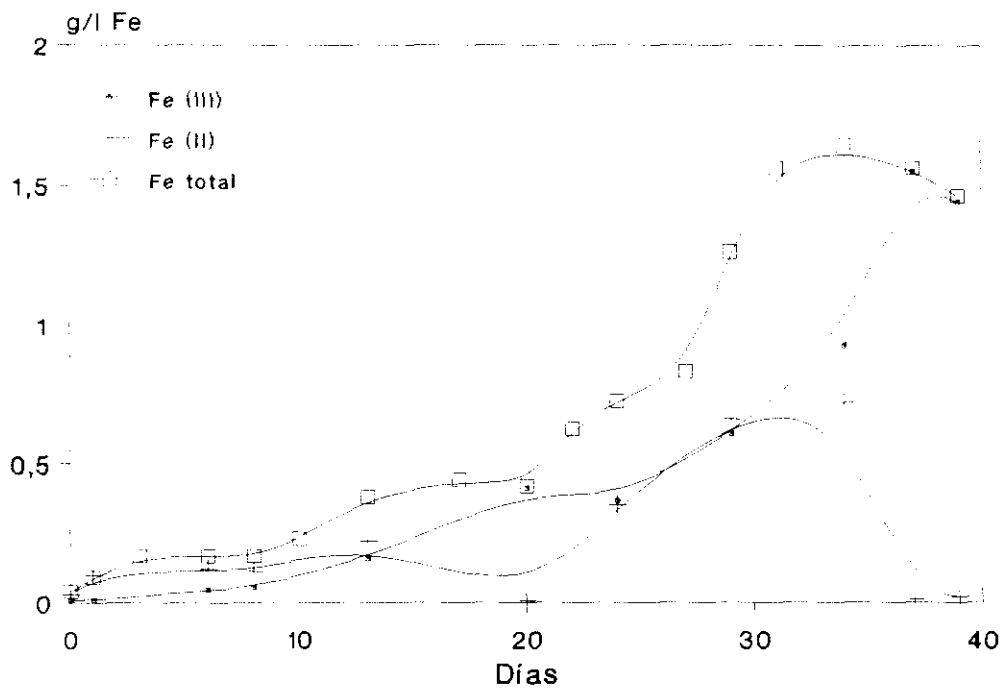


Figura 69: Estado de oxidación del hierro en solución en los ensayos con pH controlado. Ensayo con el concentrado CGRT sin inocular.

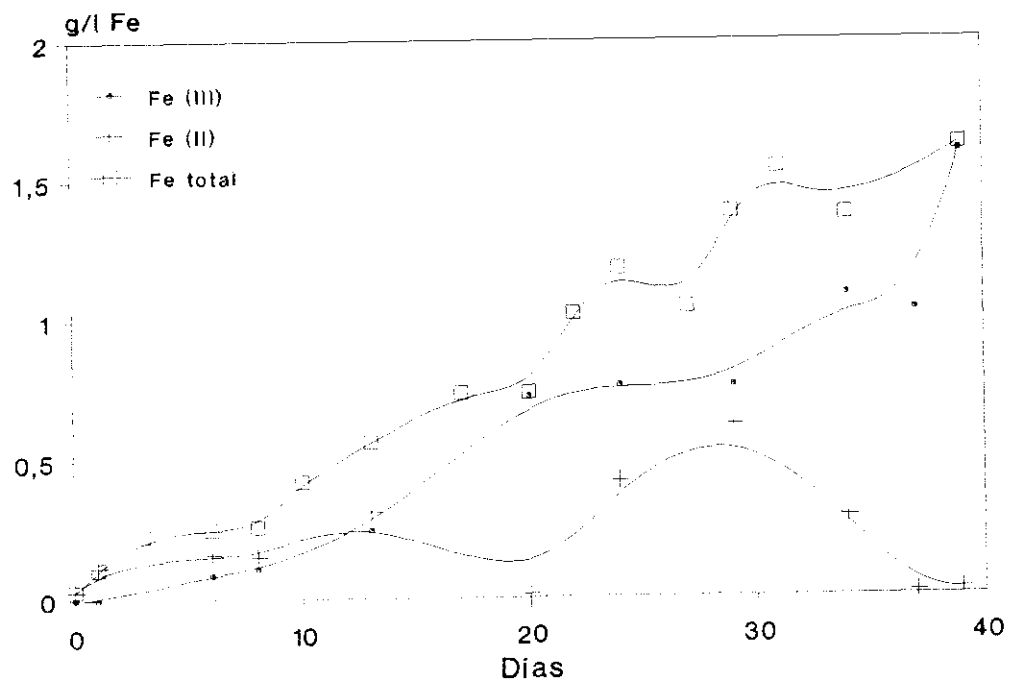


Figura 70: Estado de oxidación del hierro en solución en los ensayos con pH controlado. Ensayo con el concentrado CCuL sin inocular.

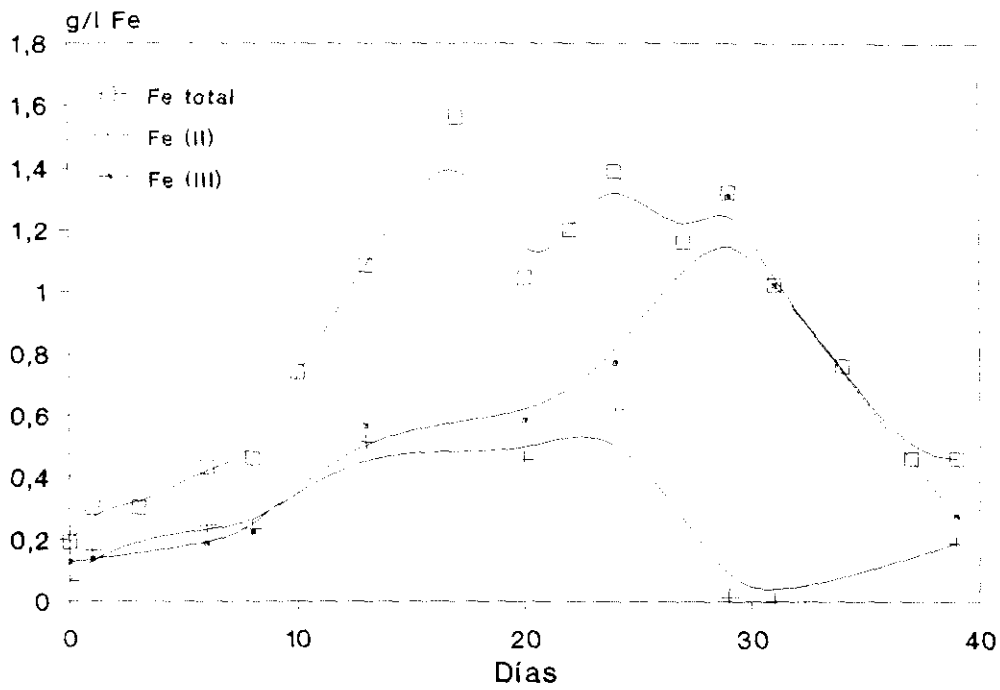


Figura 71: Estado de oxidación del hierro en solución en los ensayos con pH controlado. Ensayo con el concentrado CCu inoculado con un cultivo puro de TMRT.

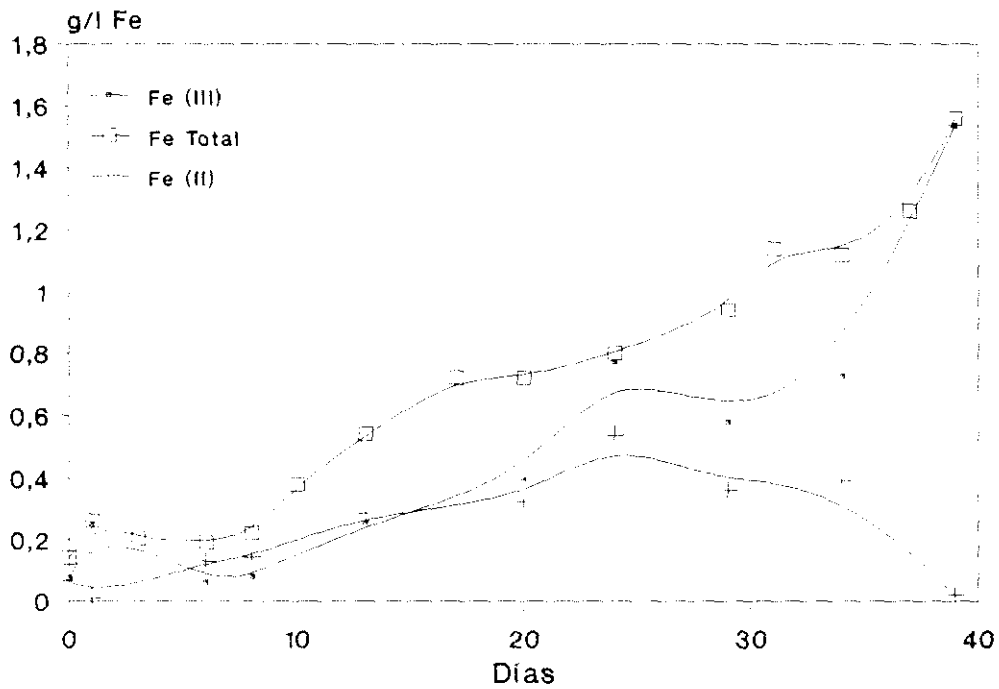


Figura 72: Estado de oxidación del hierro en solución en los ensayos con pH controlado. Ensayo con el concentrado CGRT inoculado con un cultivo puro de TMRT.

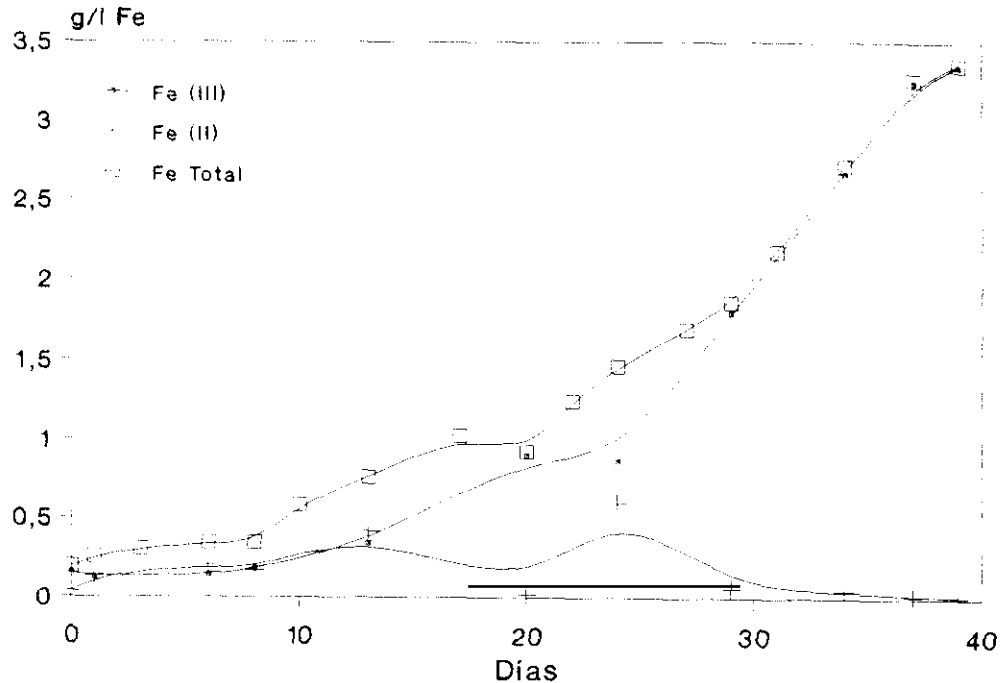


Figura 73: Estado de oxidación del hierro en solución en los ensayos con pH controlado. Ensayo con el concentrado CCuL inoculado con un cultivo puro de TMRT.

Una de las conclusiones obtenidas de estos experimentos fue que el control inicial del pH en los mismos favoreció el proceso de biolixiviación debido a que las bacterias pudieron actuar en condiciones óptimas. Sin embargo, esto tiene un contrapeso económico importante, especialmente cuando se considera una aplicación a gran escala: la adición de ácido encarece el proceso de una manera considerable.

Otra de las consecuencias importantes de estos ensayos fue conseguir unos cultivos mixtos procedentes del mineral de Río Tinto (CCuL). En estos cultivos había una población de bacterias tipo cocos que era predominante sobre otros tipos de bacterias también presentes en la muestra (figura 74). Este tipo de bacterias presentaba una gran similitud con las del género *Sulfolobus*, un género de arqueobacterias termófilas muy utilizadas en procesos experimentales de biolixiviación. A partir de estos cultivos se inició un proceso que culminó con el aislamiento del microorganismo TERT.

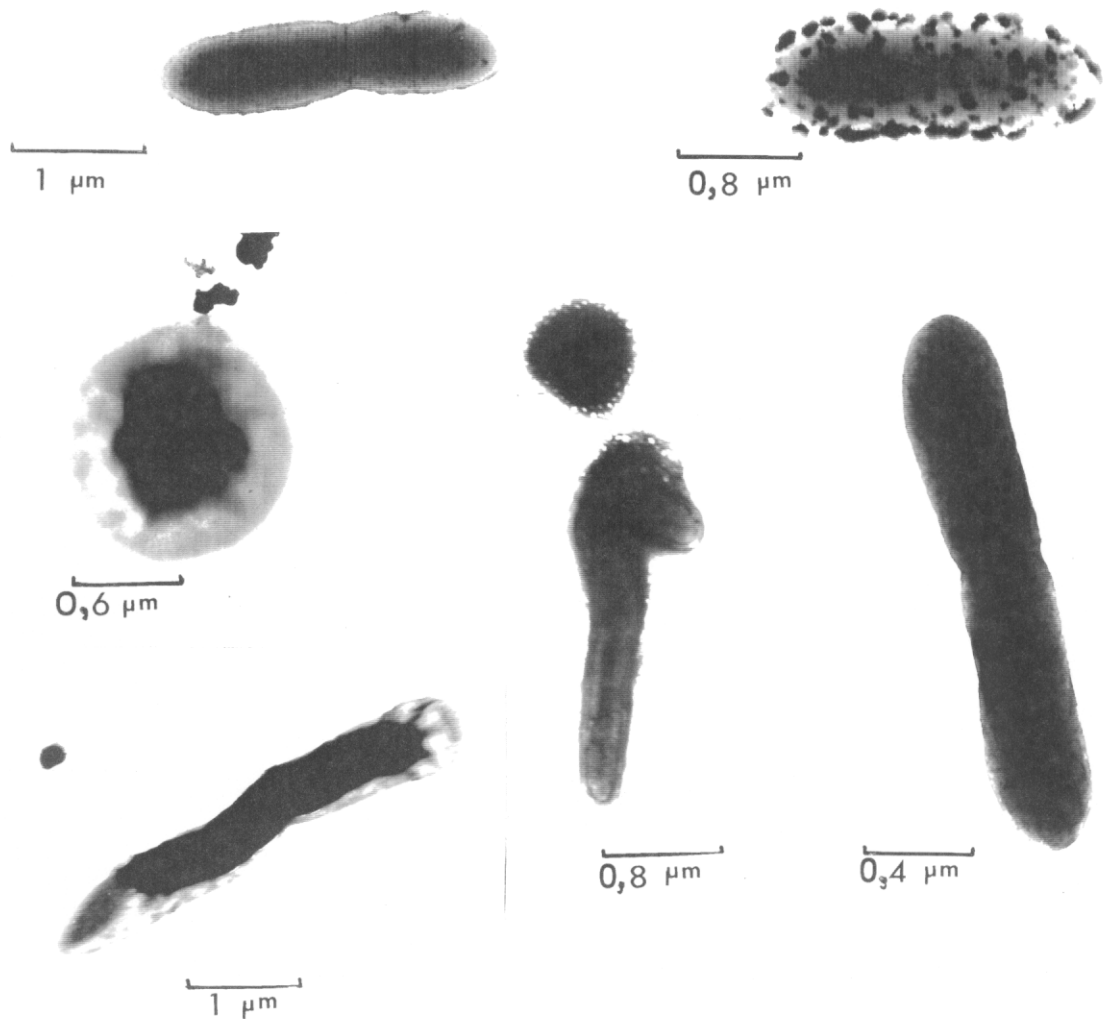


Figura 74: Fotografías tomadas con el microscopio electrónico de transmisión de los diferentes microorganismos aparecidos en los cultivos de evolución de poblaciones.

4.6.4. Cinética de la biolixiviación en presencia de TERT

Elección de la densidad de pulpa de trabajo.- Una vez aislado el microorganismo, se realizaron una serie de ensayos con la finalidad de elegir la densidad de pulpa adecuada para los posteriores ensayos de biolixiviación. Los microorganismos termófilos sólo pueden tolerar bajas densidades de pulpa debido a los problemas de atrición con las partículas de mineral, siendo este uno de los principales problemas para su aplicación (Lindström y col., 1992).

La utilización de bacterias del género *Sulfolobus* en procesos experimentales de biolixiviación se ha realizado normalmente a densidades de pulpa del 1% (Marsh y col., 1983), si bien, a través de períodos de adaptación más o menos largos, se puede elevar considerablemente la cantidad de mineral añadido a la pulpa. La cantidad de mineral también varía en función del tipo de reactor utilizado.

El mineral elegido para la determinación de la densidad de pulpa inicial óptima fue el concentrado CCuL, sobre el cual se había realizado el aislamiento y sobre el que mayores poblaciones celulares se detectaron en los ensayos previos de biolixiviación. Se prepararon matraces que contenían medio 9K sin hierro y mineral a distintas densidades de pulpa (1, 2, 3, 5, y 7%).

El resultado de estos ensayos está representado en la figura 75. Se puede ver que las

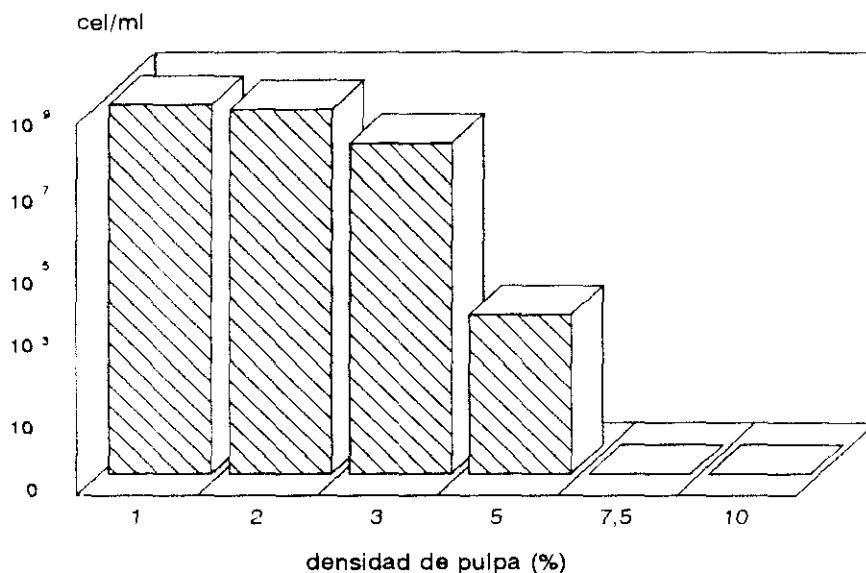


Figura 75: Crecimiento celular del microorganismo TERT a diferentes densidades de pulpa

cantidades de mineral a las que correspondió una mayor población celular fueron las del 1 y 2%, aunque la diferencia con el ensayo del 3% no fue muy grande, por lo que, como en el caso del microorganismo termófilo moderado, debido a la posibilidad de procesar una mayor cantidad de mineral, se decidió utilizar esta última proporción en los ensayos de lixiviación. Además, hay que tener en cuenta que el cultivo de mantenimiento crecía con un 1% de densidad de pulpa y, por lo tanto, el microorganismo estaba muy adaptado a esta concentración; no obstante, también es cierto que se puede realizar un proceso de adaptación

para mejorar los rendimientos a densidades de pulpa más altas. Por encima del 5% no hubo crecimiento celular, posiblemente, por fenómenos de atrición con el mineral.

Este microorganismo se mantuvo creciendo continuamente sobre mineral, de tal forma que no fue necesaria la realización de ensayos de adaptación como sucedió en el caso del microorganismo termófilo moderado.

Ensayos cinéticos con TERT.- Una vez que se comprobó la capacidad del microorganismo aislado TERT para utilizar mineral como fuente de energía y se determinó la densidad de pulpa óptima de trabajo, se realizaron una serie de ensayos cinéticos encaminados a verificar su rendimiento en procesos de biolixiviación.

Los concentrados minerales elegidos fueron CCu, CCuL y CGRT. Los ensayos se realizaron en matraces con 95 ml de medio 9K a pH 2 y 5 ml de inóculo. La temperatura fue de 68,5°C y la agitación de 100 rpm. Se realizaron controles en condiciones estériles para diferenciar la actividad bacteriana de la lixiviación química, que a temperaturas elevadas puede ser importante. Los resultados obtenidos en estos ensayos están representados en las gráficas 76 a 79.

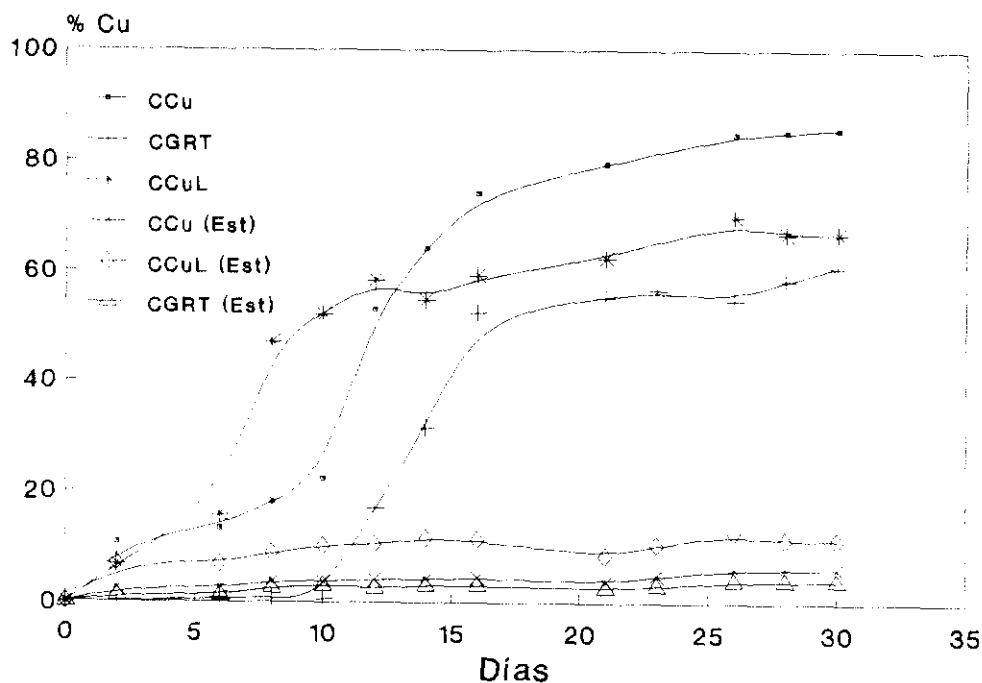


Figura 76: Disolución de cobre a partir de los diferentes concentrados por el microorganismo TERT

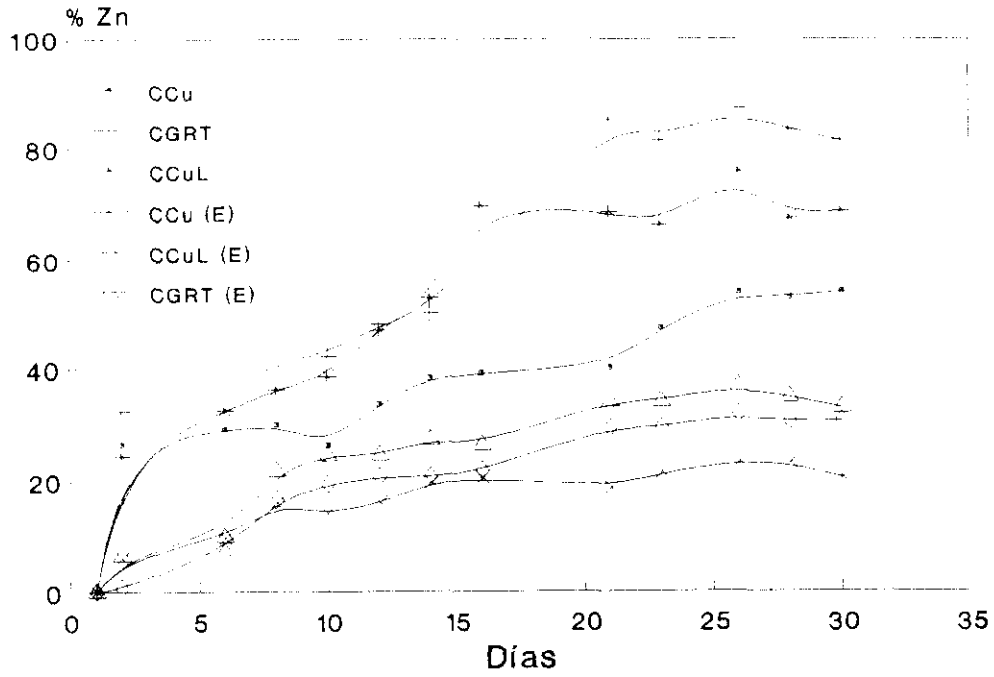


Figura 77: Disolución de cinc a partir de los diferentes concentrados por el microorganismo TERT

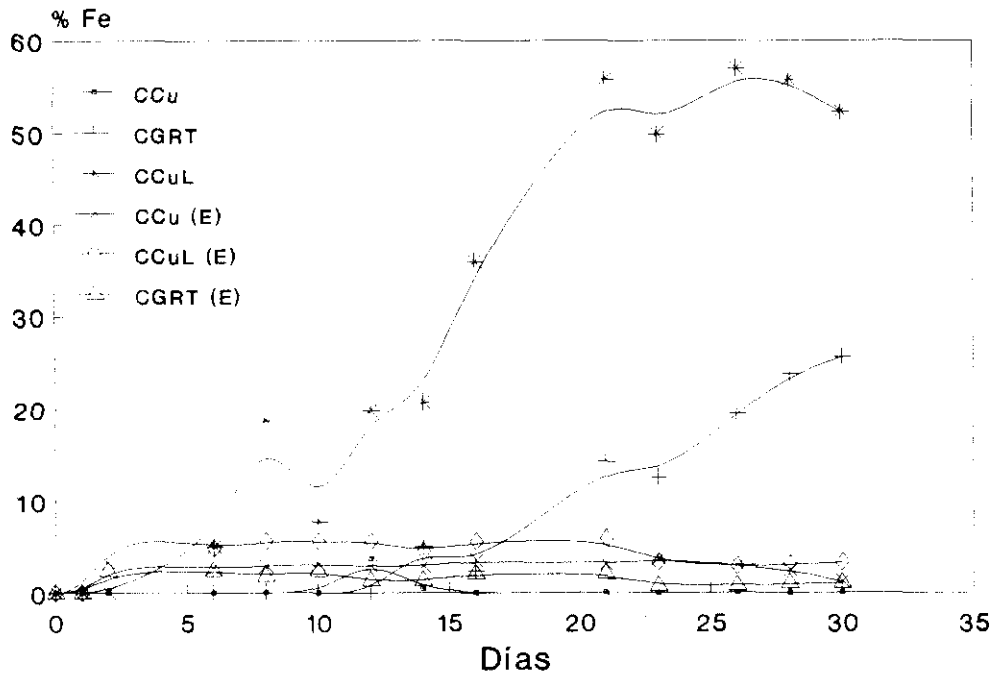


Figura 78: Disolución de hierro a partir de los diferentes concentrados por el microorganismo TERT

Se puede comprobar que a partir de todos los concentrados utilizados se produjo una alta extracción metálica, siempre con valores por encima de los ensayos estériles. Esto fue especialmente destacable en el caso del cobre. Las diferencias en las concentraciones de metal en solución se debieron al tipo de concentrado. En el concentrado CCuL fue donde se tuvieron los menores tiempos de adaptación del microorganismo al mineral, debido a que los cultivos de mantenimiento se habían realizado sobre este concentrado. Además, fue en este cultivo donde la población celular (figura 79) alcanzó su máxima densidad en un tiempo menor, al igual que el pH (figura 80) que descendió más rápidamente que en los otros concentrados. En el caso del concentrado CGRT el pH subió inicialmente mucho, debido al consumo de ácido por la ganga del mineral, para, sin embargo, al finalizar el experimento estar al mismo nivel que en el caso del concentrado CCuL.

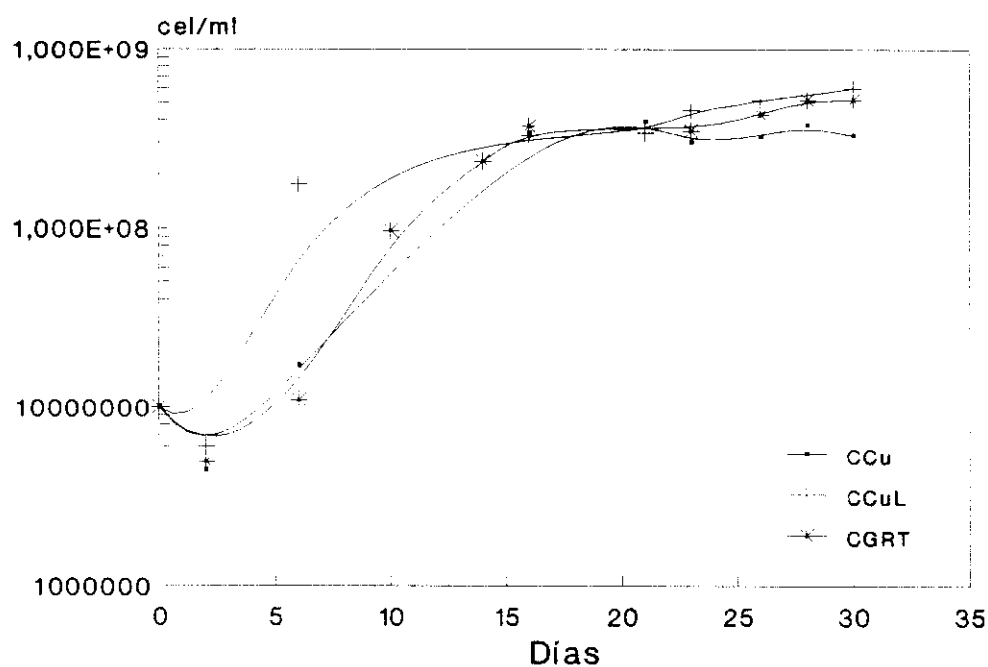


Figura 79: Evolución de las poblaciones bacterianas de TERT al crecer sobre los tres concentrados minerales.

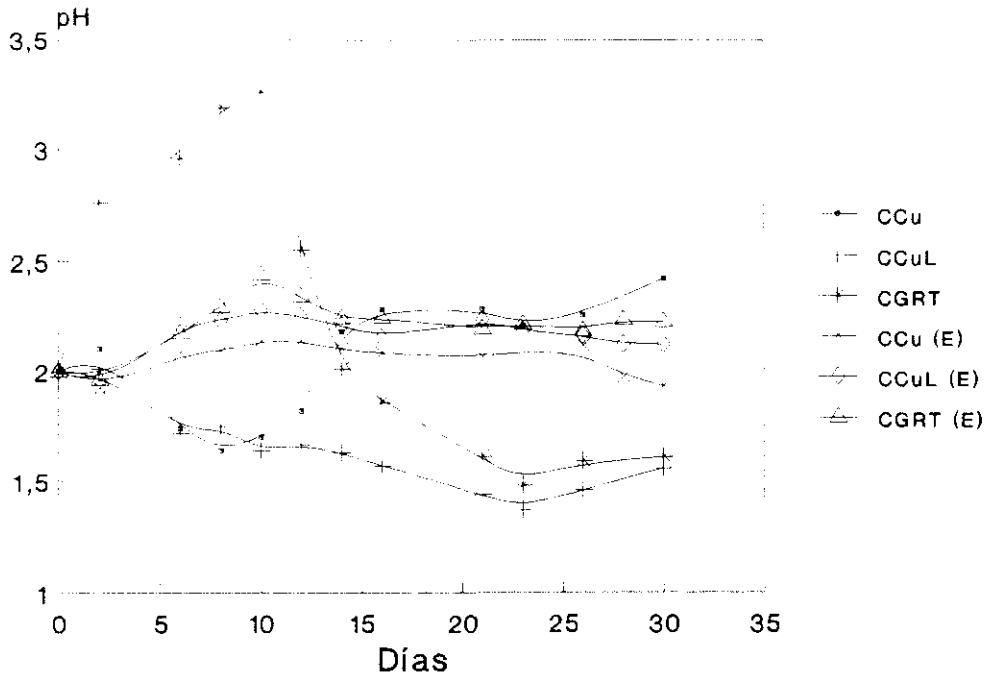


Figura 80: Evolución del pH en los ensayos realizados sobre los diferentes concentrados inoculados con el microorganismo TERT

Por otra parte, se puede ver claramente el comportamiento ferrooxidante del microorganismo al analizar la evolución del hierro en las gráficas 81 a 83. En ellas se observa que, desde un principio, el Fe^{3+} evolucionó paralelamente al Fe total, es decir, a medida que se produjo Fe, como consecuencia de la oxidación de los minerales, este se transformó de Fe^{2+} en Fe^{3+} . En los ensayos estériles (gráficas 84 a 86) se pudo observar un comportamiento contrario, es decir, el Fe^{2+} fue la principal forma iónica de hierro en solución debido a la falta de bacterias capaces de oxidarlo. La pequeña proporción de Fe^{3+} se debió a la oxidación química.

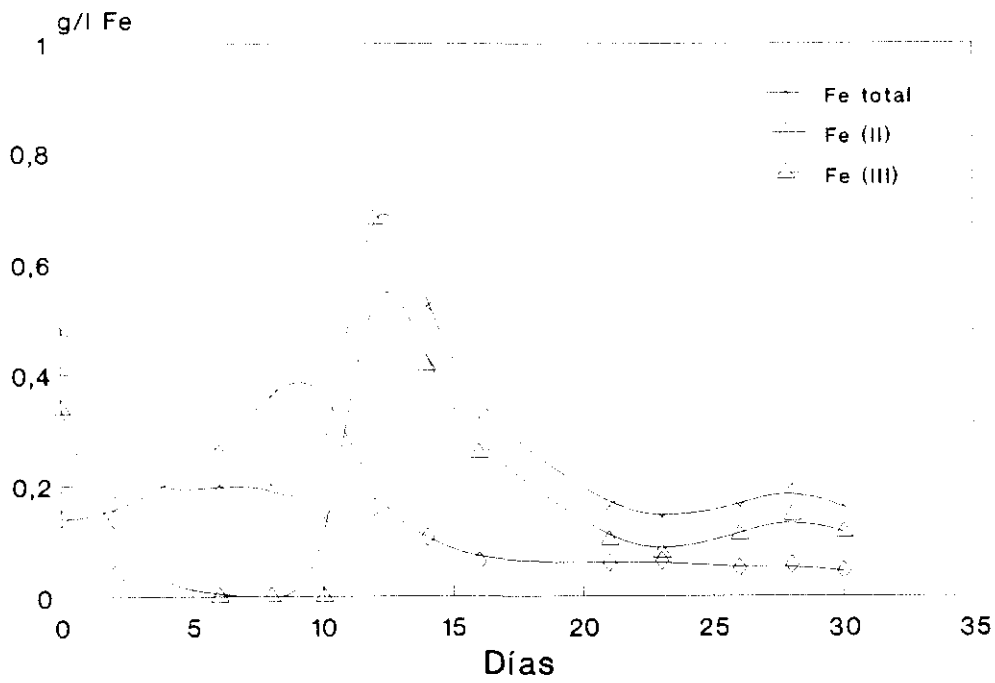


Figura 81: Estado de oxidación del hierro en el ensayo inoculado con TERT sobre el concentrado CCu

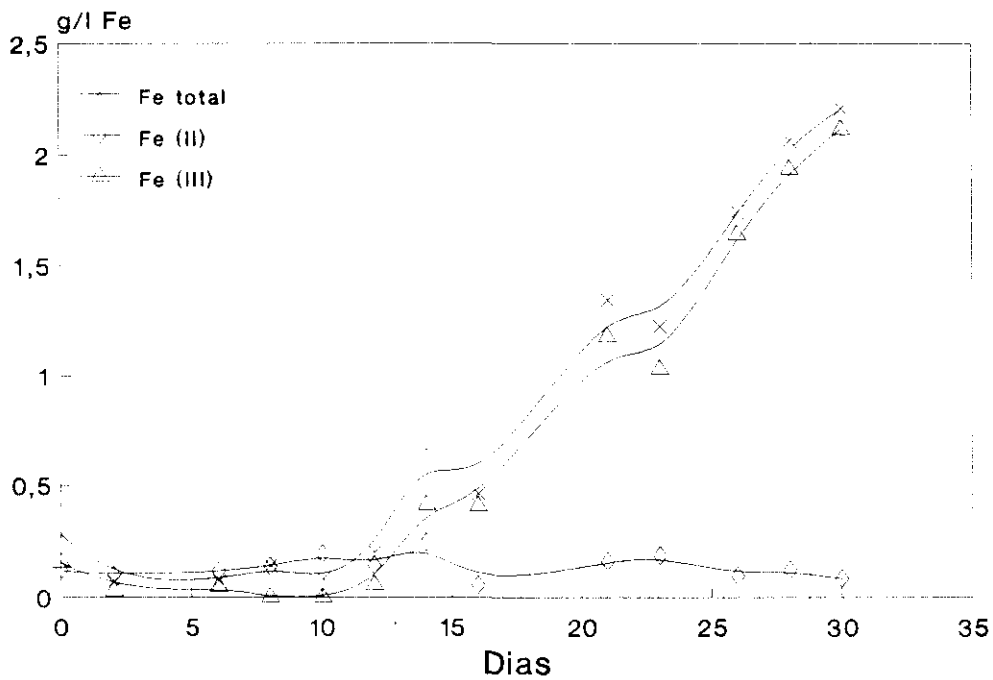


Figura 82: Estado de oxidación del hierro en el ensayo inoculado con TERT sobre el concentrado CGRT

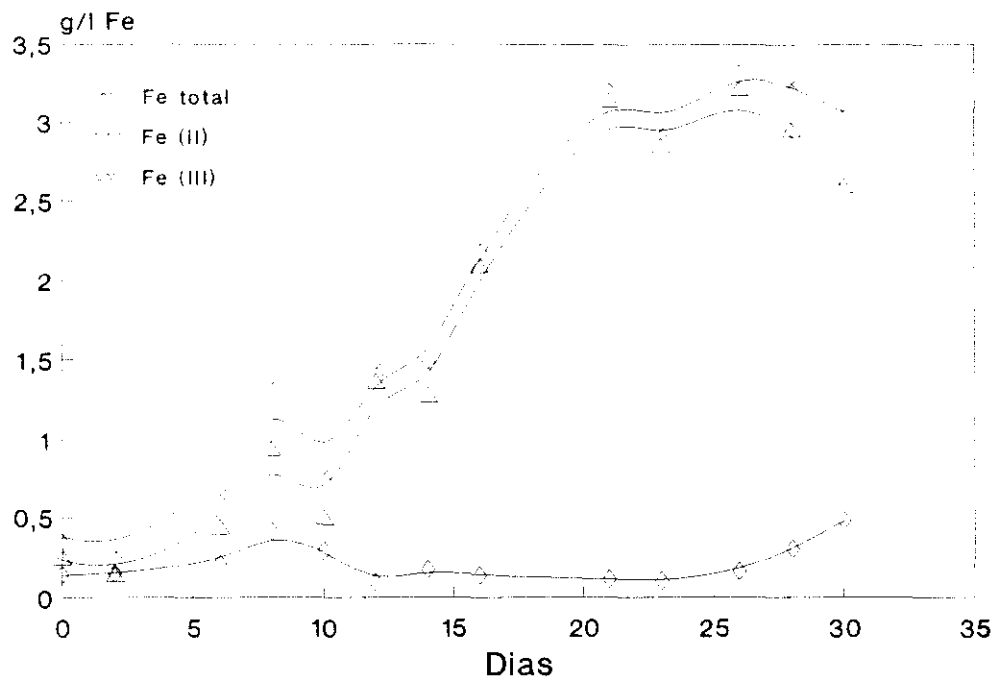


Figura 83: Estado de oxidación del hierro en el ensayo inoculado con TERT sobre el concentrado CCuL.

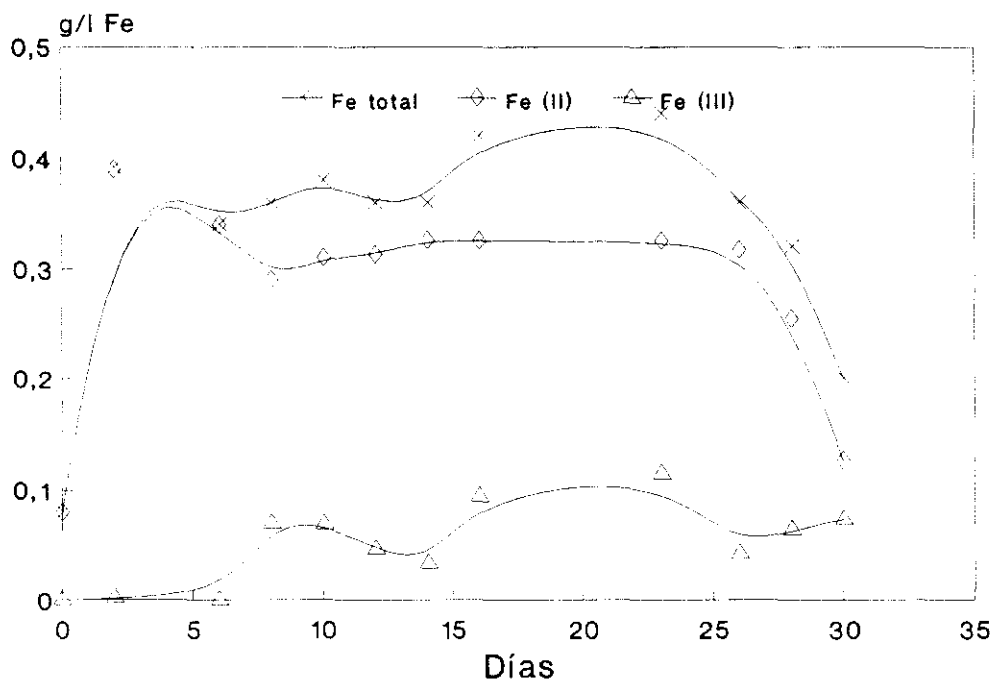


Figura 84: Estado de oxidación del hierro en el ensayo estéril sobre el concentrado CCu.

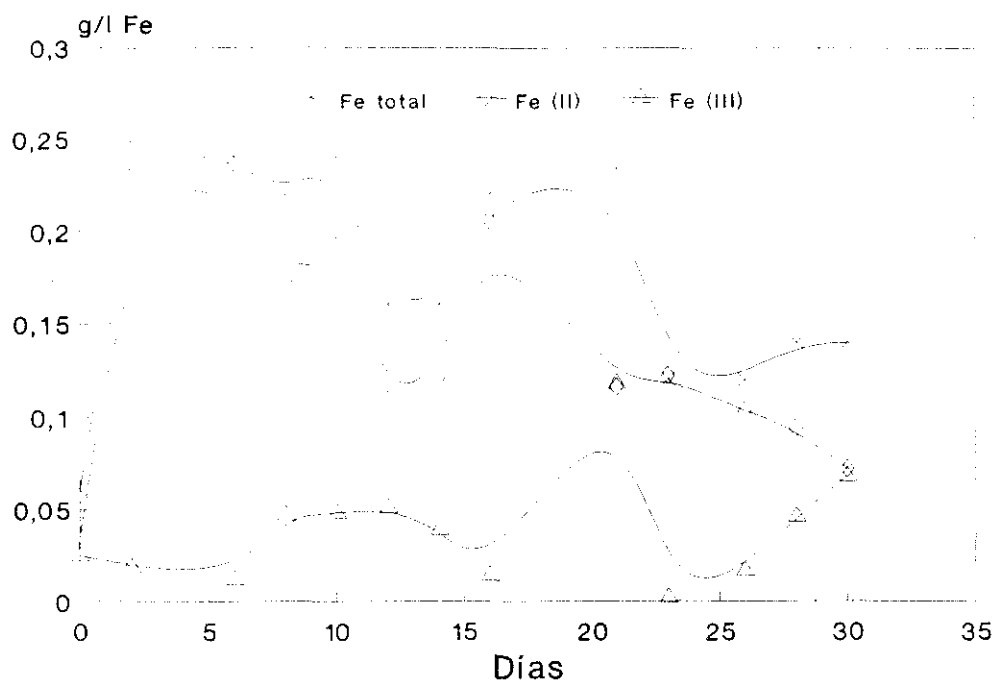


Figura 85: Estado de oxidación del hierro en el ensayo estéril sobre el concentrado CGRT.

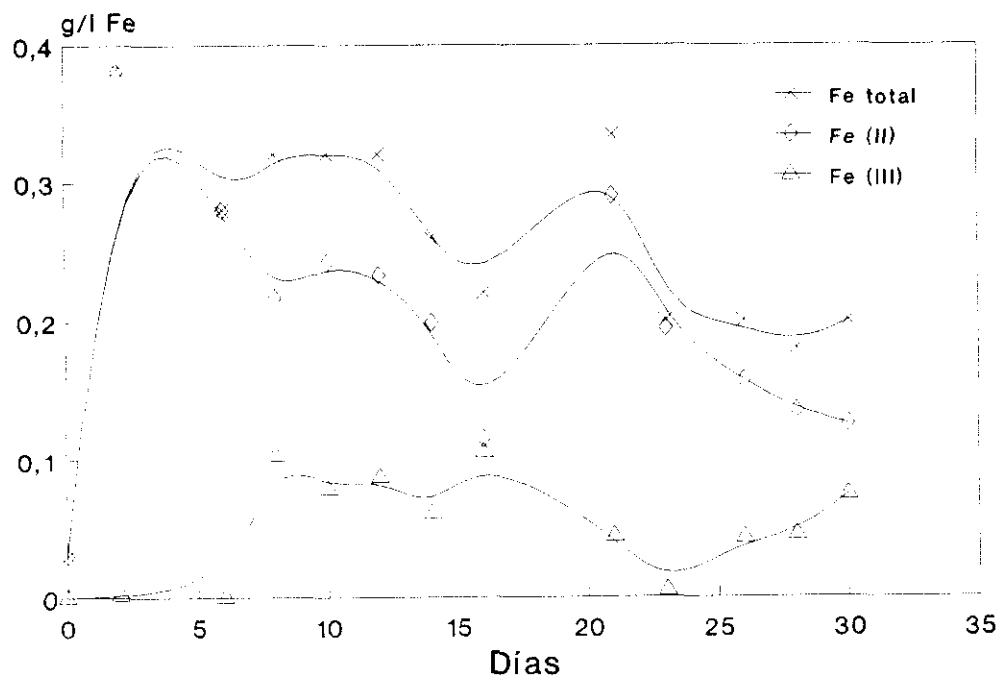


Figura 86: Estado de oxidación del hierro en el ensayo estéril sobre el concentrado CCuL.

4.6.5. Evolución de poblaciones a 68.5°C

Se realizaron los mismos ensayos que con el microorganismo termófilo moderado, es decir, se inoculó el microorganismo aislado TERT sobre minerales sin esterilizar para estudiar si algún microorganismo presente en estas muestras de sólido era capaz de alterar el desarrollo del proceso de lixiviación.

Las condiciones de experimentación fueron las óptimas de crecimiento del microorganismo aislado (68,5°C y pH 2), con una densidad de pulpa del 3%. Los concentrados minerales utilizados fueron CCu, CGRT y CCuL.

Los controles llevados a cabo, por microscopía óptica y electrónica, mostraron que en los tres pases realizados no apareció ningún otro nuevo tipo de bacterias en los cultivos. El proceso de lixiviación fue exclusivamente realizado por TERT. La permanencia del microorganismo supuso un importante paso de cara a la posibilidad de su aplicación industrial, puesto que no encontró competidores en el medio que pudieran perjudicar el proceso. Por otra parte, a través de los pases realizados, se pudo comprobar una adaptación progresiva del microorganismo al proceso, lo que se tradujo en una considerable reducción del tiempo necesario para la obtención de su máximo rendimiento.

En las gráficas 86 a 94 están representados los resultados obtenidos al biolixiviar los diferentes concentrados. La cantidad de metales en solución no aumentó de forma significativa tras los sucesivos pases, lo que puede significar que el microorganismo ya estaba bien adaptado al proceso de extracción metálica y lo que hizo fue adaptarse a los distintos concentrados de los que obtenía la fuente de energía. En todos los casos, la extracción de metales fue bastante importante, aunque no se observó ningún tipo de especificidad por ninguno de los metales.

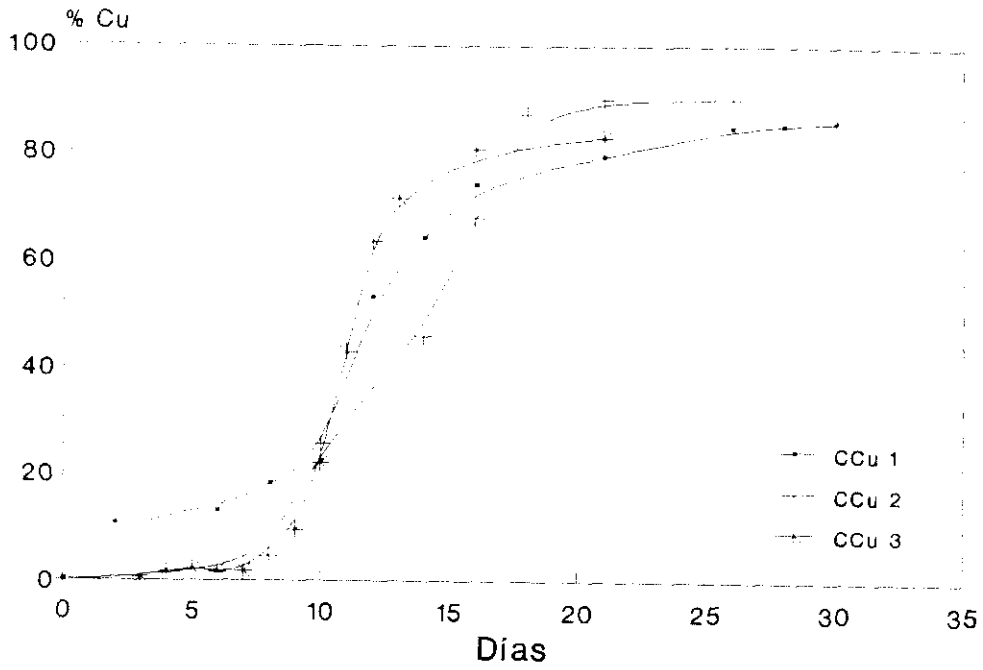


Figura 87: Disolución de cobre a partir del concentrado CCu en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

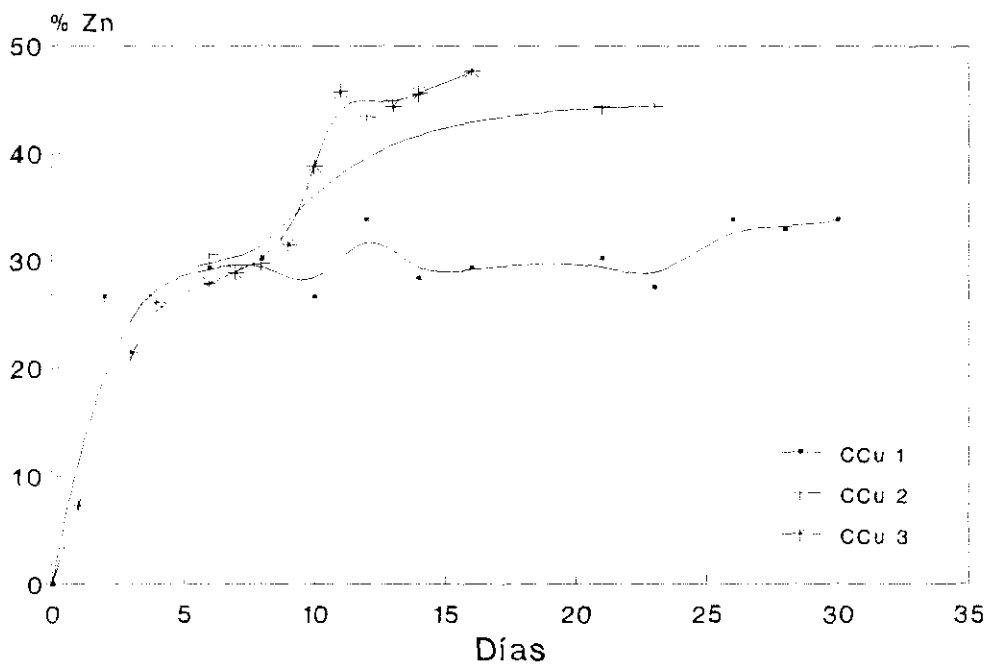


Figura 88: Disolución de cinc a partir del concentrado CCu en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

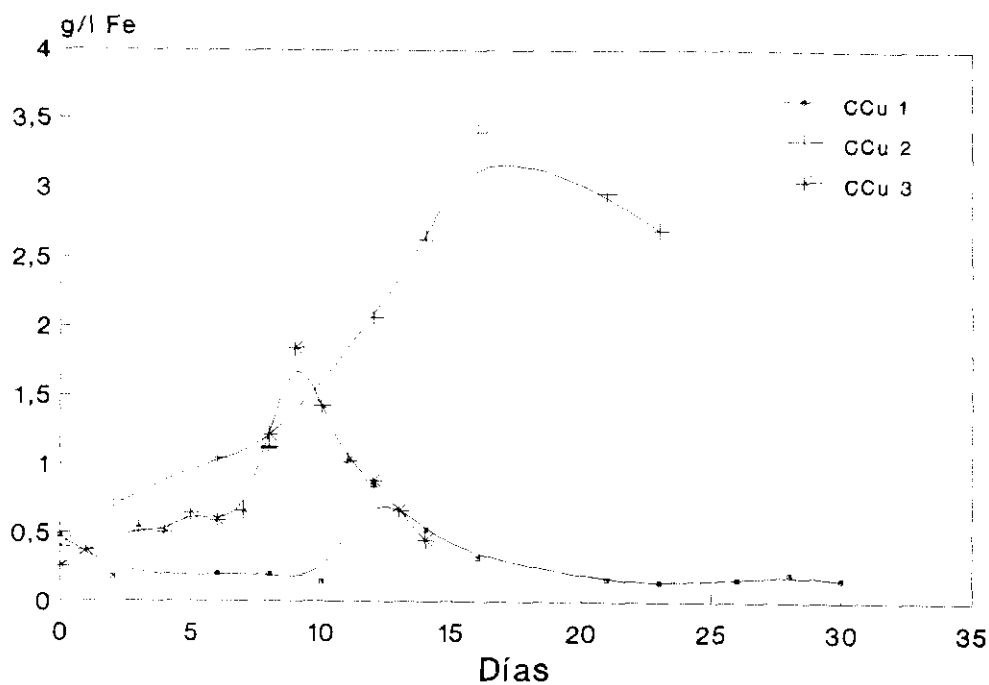


Figura 89: Disolución de hierro a partir del concentrado CCu en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

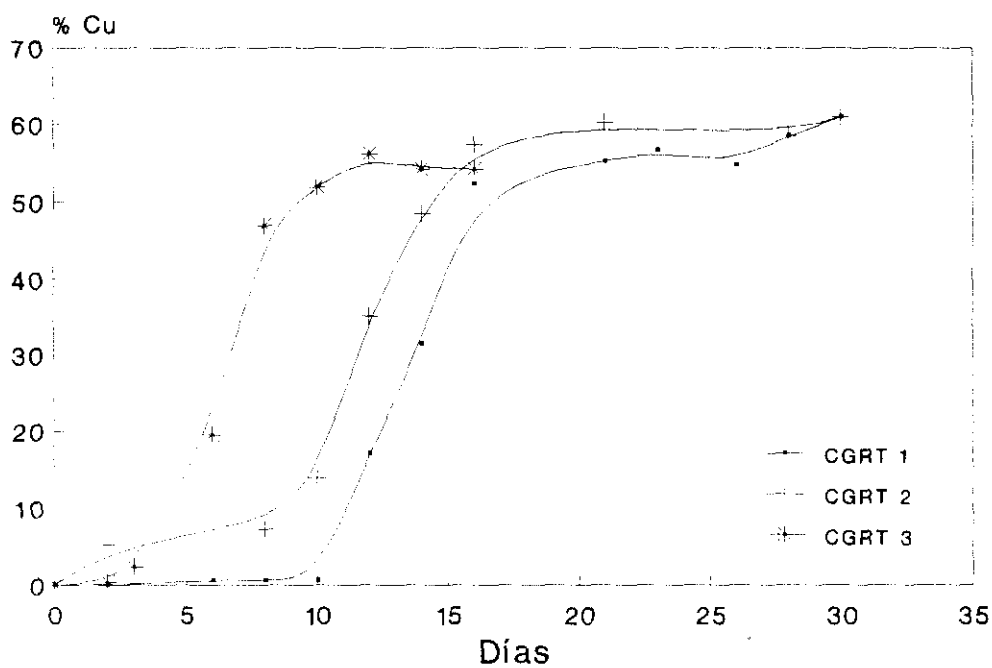


Figura 90: Disolución de cobre a partir del concentrado CGRT en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

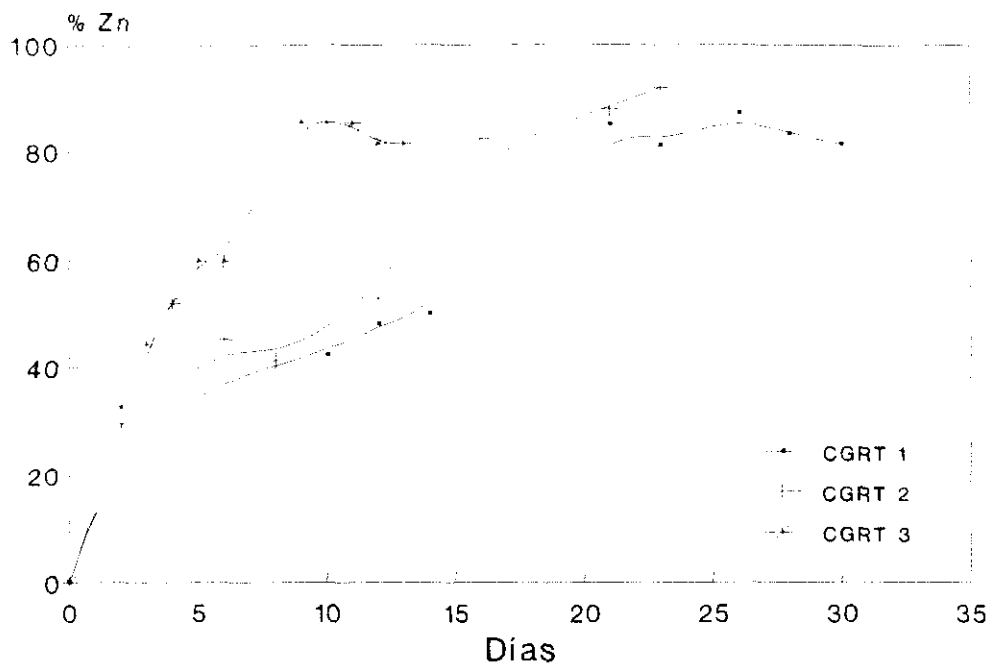


Figura 91: Disolución de cinc a partir del concentrado CGRT en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

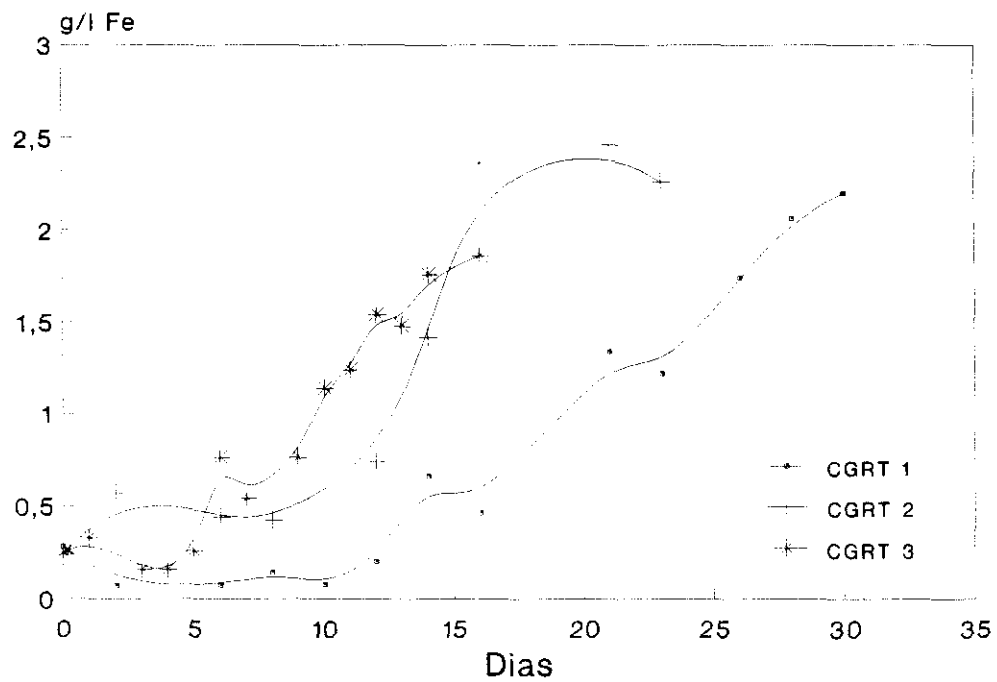


Figura 92: Disolución de hierro a partir del concentrado CGRT en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

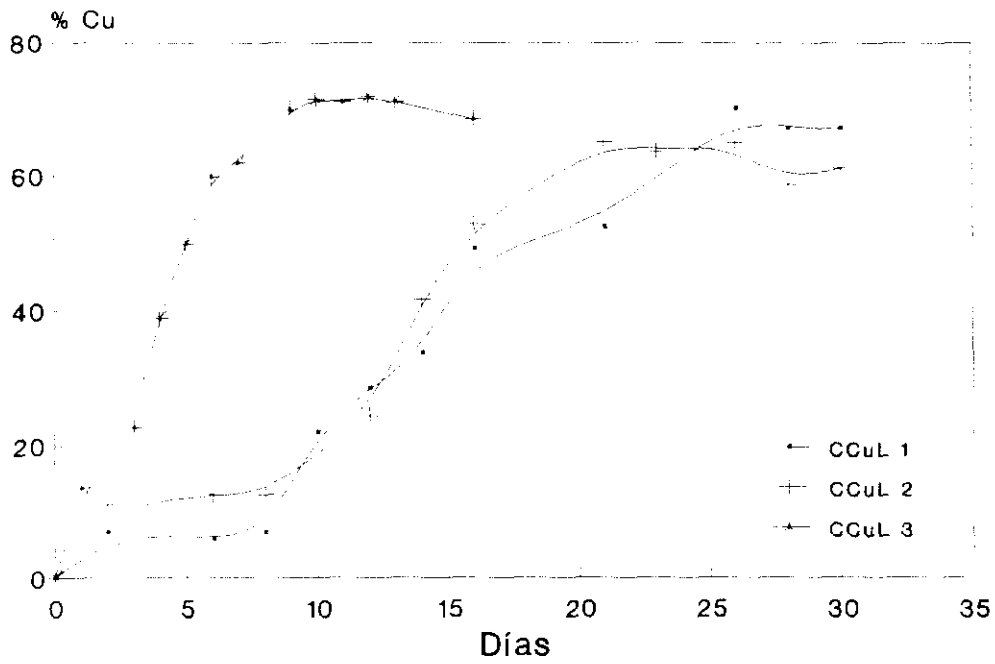


Figura 93: Disolución de cobre a partir del concentrado CCuL en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

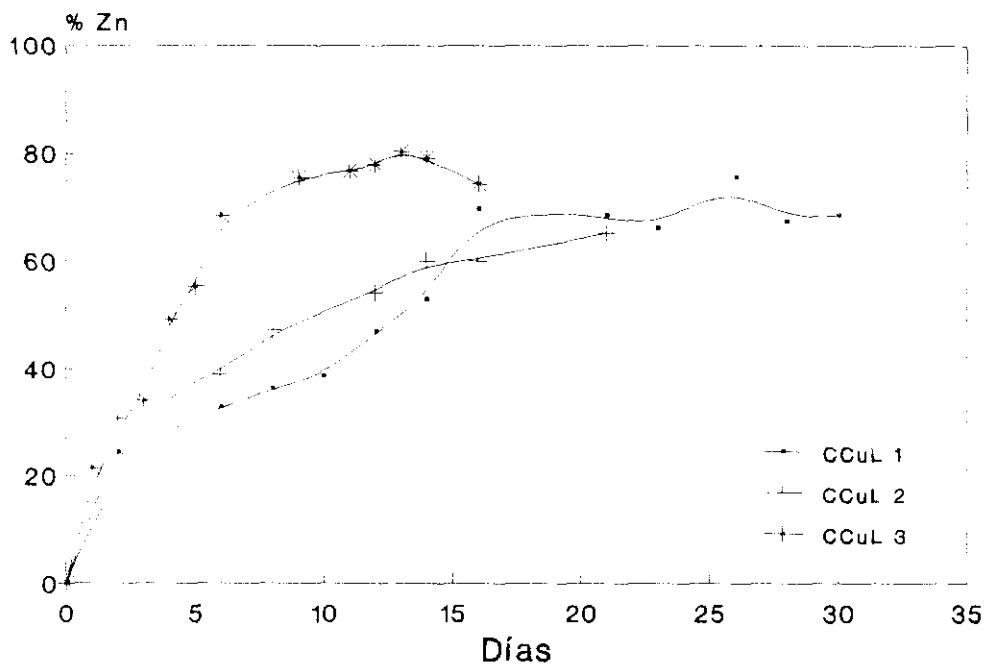


Figura 94: Disolución de zinc a partir del concentrado CCuL en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

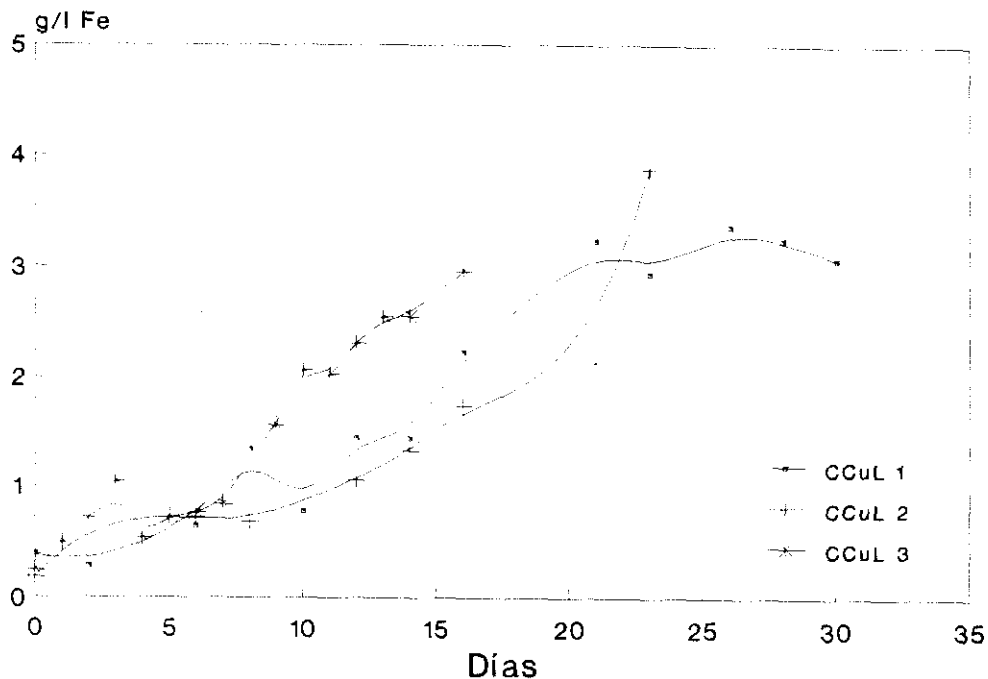


Figura 95: Disolución de hierro a partir del concentrado CCuL en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C.

El pH de los diferentes ensayos (figuras 96 a 98) descendió, por debajo del valor inicial, muy rápidamente y por esta razón no se realizaron ensayos a pH controlado como en el caso del microorganismo termófilo moderado. En el ensayo con el concentrado CCuL fue donde más disminuyó el pH por efecto de una mayor actividad bacteriana que en el resto de los ensayos. También, como consecuencia de la adaptación de los microorganismos a los diferentes minerales, se pudo apreciar que en los ensayos sobre el concentrado CGRT, el aumento de pH debido al consumo de ácido por la ganga del mineral fue menor en cada nuevo pase realizado.

Finalmente, se prepararon sendos matraces con cada uno de los tres concentrados minerales sin esterilizar y sin inóculo bacteriano. En ninguno de los casos se pudo apreciar la presencia de bacterias. Posiblemente, una temperatura tan elevada inicialmente no permitió el desarrollo de los microorganismos presentes en el mineral, mientras que, como se ha visto anteriormente, un primer paso con temperaturas de 50°C y una posterior elevación a 68.5°C sí que permitieron obtener microorganismos termófilos extremos a partir del mineral.

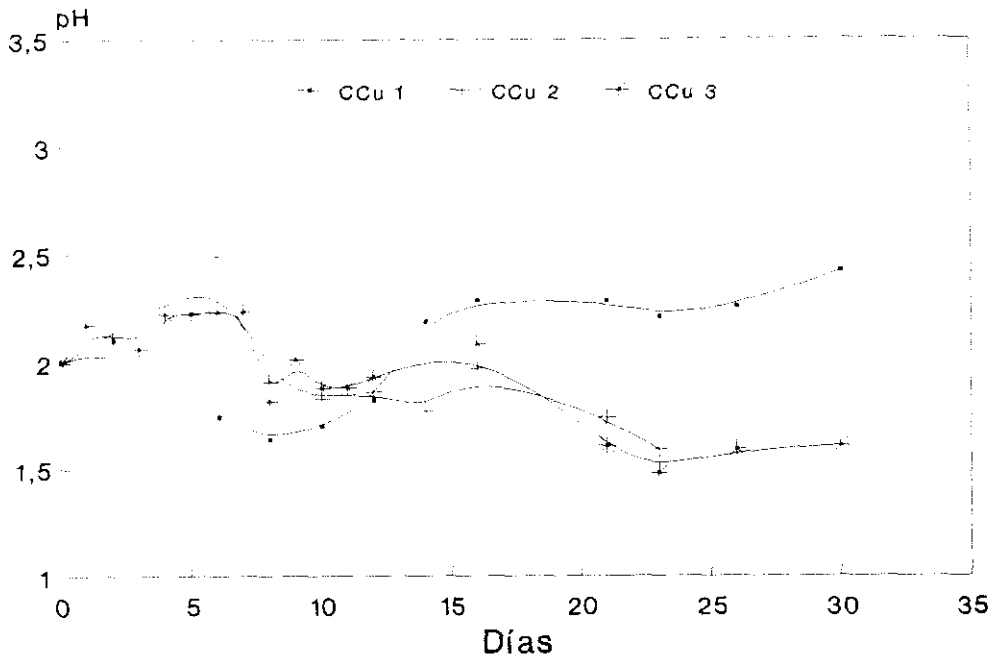


Figura 96: Evolución del pH en los ensayos de evolución de poblaciones al atacar el concentrado CCu a 68,5°C.

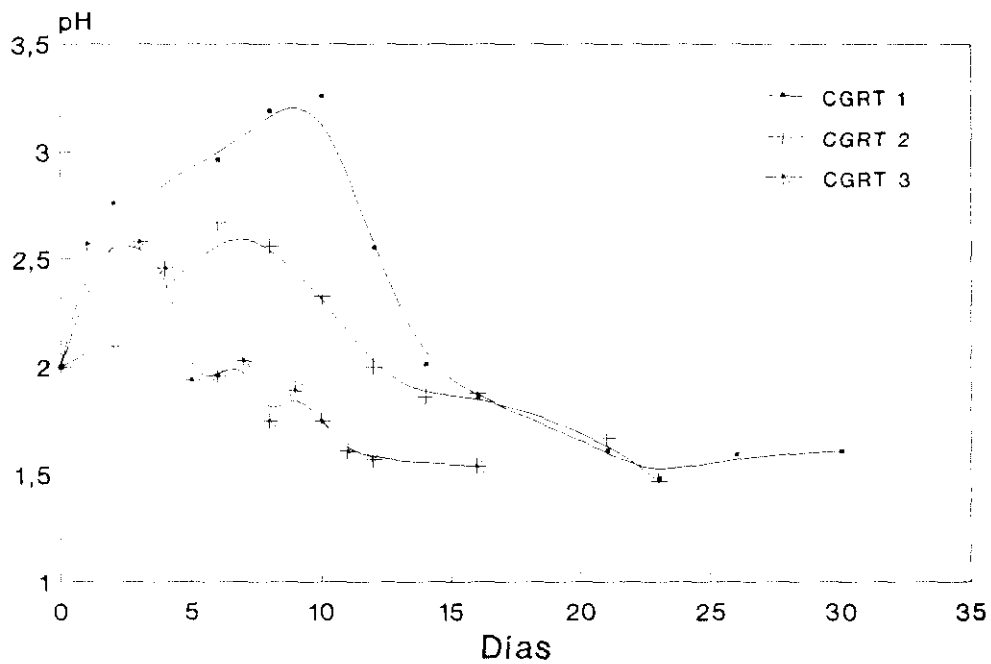


Figura 97: Evolución del pH en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C al atacar con el concentrado CGRT.

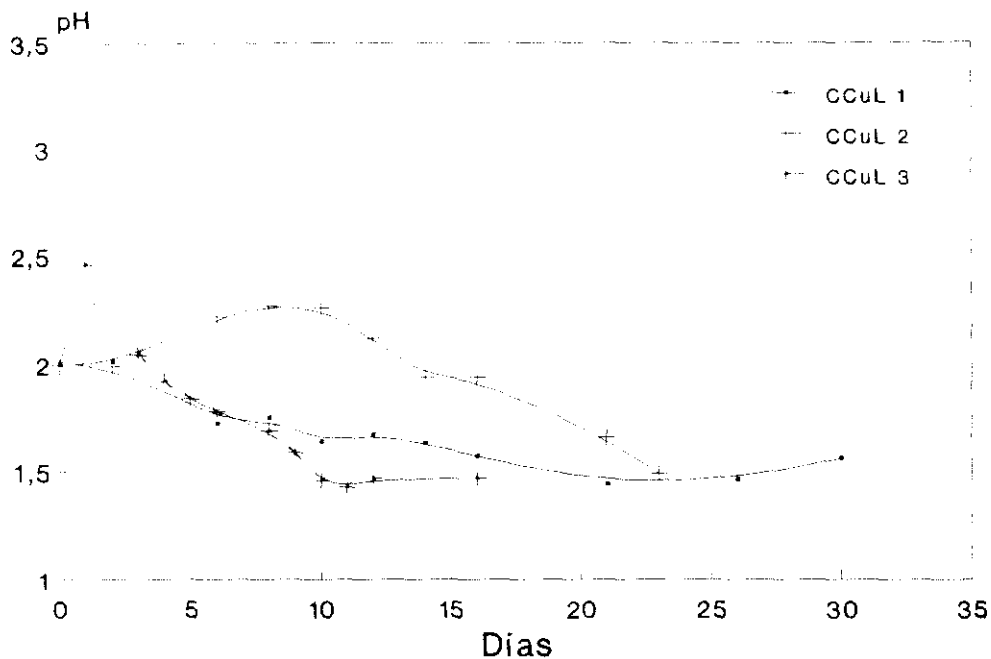


Figura 98: Evolución del pH en los ensayos de evolución de poblaciones a 68,5°C al atacar el concentrado CCuL.

4.6.6. Biolixiviación a diferentes temperaturas

Una vez caracterizado el comportamiento lixivante de los distintos microorganismos aislados, se comparó su eficacia al actuar sobre un mismo concentrado mineral y en las condiciones óptimas de crecimiento de cada uno. Se utilizó el concentrado CCu debido a que las tres especies bacterianas crecían bien sobre él.

Los resultados de los ensayos están representados en las gráficas 99 a 101. Se pudo comprobar que, con respecto a los tres cationes analizados, fue el microorganismo termófilo extremo el que logró los mejores resultados. Los tres microorganismos mostraron una clara actividad biolixivante cuando se les comparó con los ensayos estériles y se pudo comprobar que a mayor temperatura, la eficacia de lixiviación aumentó. Esto confirmó la tendencia que se apunta como solución a los procesos de biolixiviación: el empleo de microorganismos termófilos.

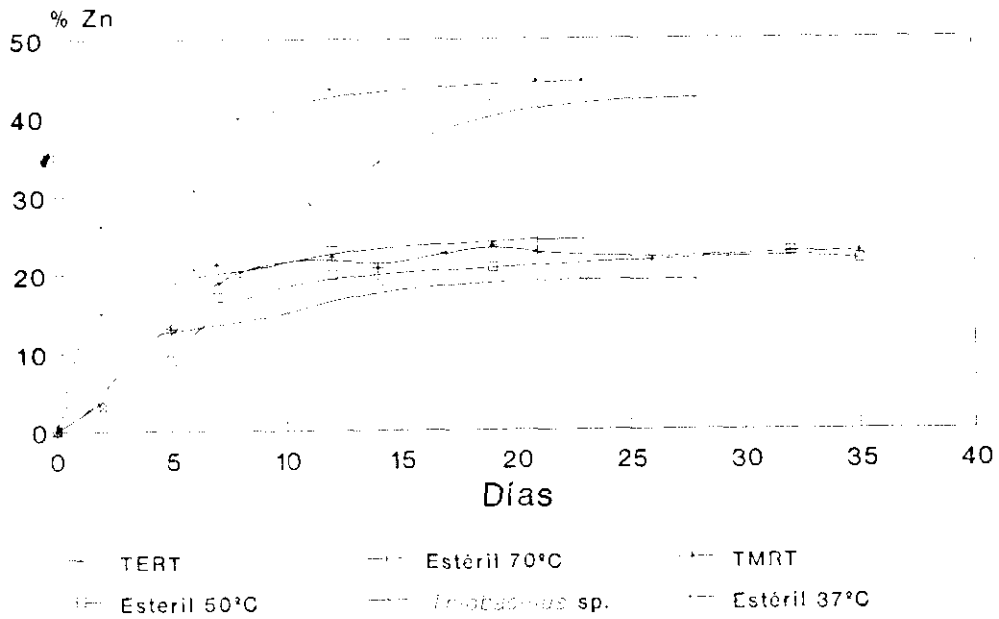


Figura 99: Disolución de cinc a partir del concentrado CCu por los tres microorganismos aislados.

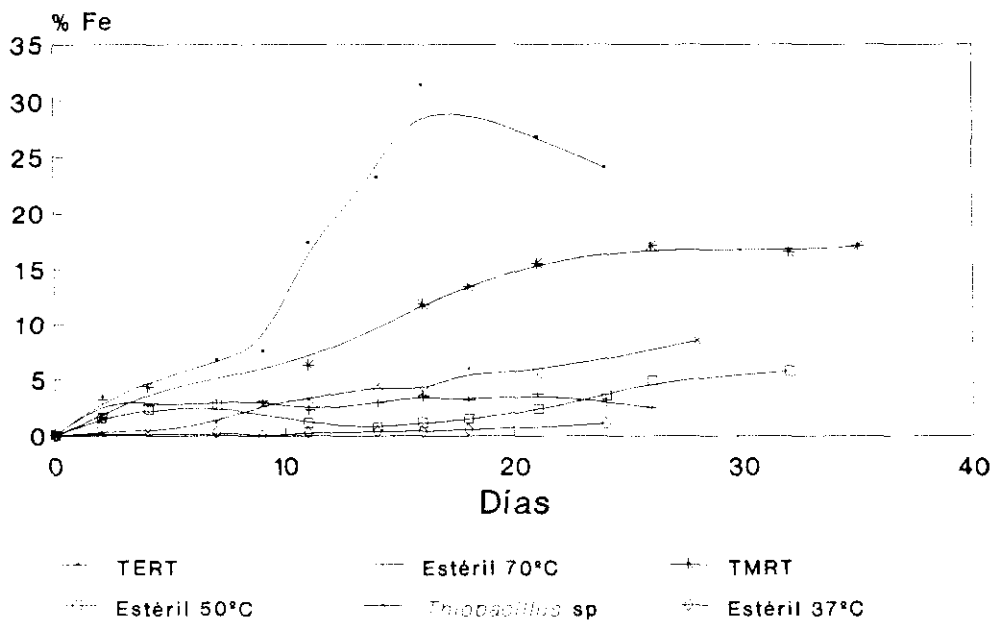


Figura 100: Disolución de hierro a partir del concentrado CCu por los tres microorganismos aislados.

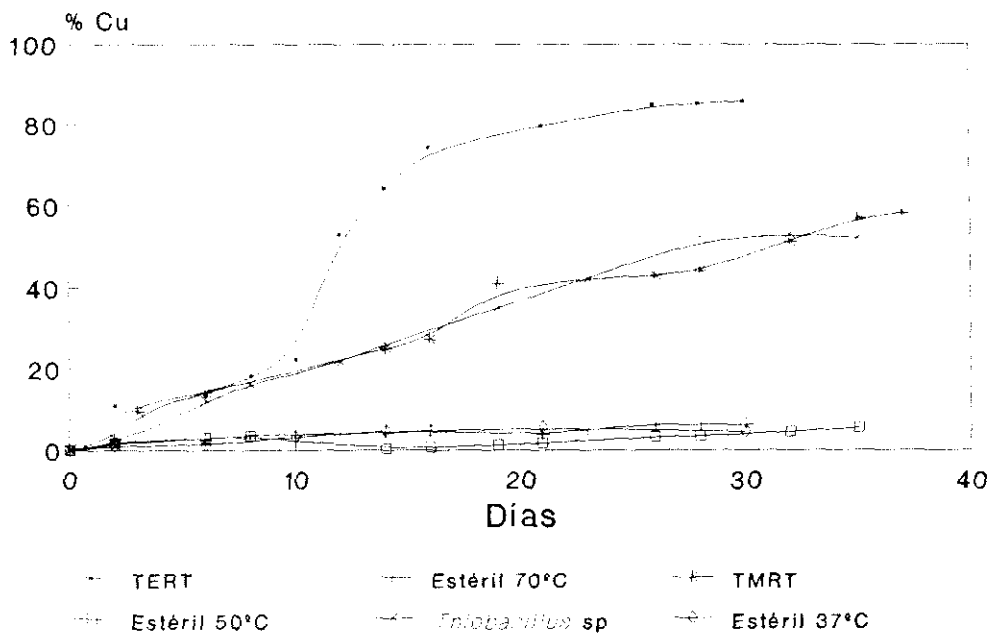


Figura 101: Disolución de cobre a partir del concentrado CCu por los tres microorganismos aislados.

Las diferencias en la cantidad de metales en disolución entre los distintos cultivos bacterianos no pudieron deberse al número de bacterias presentes en cada ensayo puesto que en todos los casos la densidad de población fue del orden de 5×10^8 cel/ml.

En los ensayos estériles, aunque con pequeñas diferencias, los de mayor temperatura fueron también los que liberaron una mayor cantidad de metales a la solución.

Hay que destacar, como hecho especialmente importante, la especificidad del microorganismo termófilo moderado hacia los sulfuros de cobre, un aspecto que hace esta bacteria ciertamente atractiva para uso en procesos de biolixiviación. Sin embargo, la ventaja de la especificidad tiene su contrapunto en los tiempos especialmente largos que necesita para alcanzar sus máximos rendimientos y en la posibilidad de contaminación de los cultivos con otros microorganismos aportados por el propio mineral. Desde estos punto de vista, el microorganismo TERT parece más interesante, pues a un menor tiempo de procesamiento del mineral, une unos rendimientos más altos. Sin embargo, este microorganismo tiene la

desventaja de necesitar una mayor temperatura para poder desarrollarse, lo que económicamente podría resultar un freno a su aplicación a nivel industrial. En todas las consideraciones efectuadas, estos dos microorganismos resultan ventajosos frente al *Thiobacillus* sp.

CONCLUSIONES

1.- Se aislaron tres microorganismos procedentes de las minas de Aznalcollar y Río Tinto: una bacteria mesófila (*Thiobacillus* sp.), otra termófila moderada (TMRT) y una última termófila extrema (TERT).

2.- La caracterización morfológica y fisiológica y los estudios genéticos con electroforesis de campo pulsado de los tres microorganismos mostró que la bacteria mesófila *Thiobacillus* sp. correspondía a una cepa de *Thiobacillus ferrooxidans*, mientras que los otros dos microorganismos aislados eran especies no descritas.

3.- Las diferentes pruebas realizadas indicaron que *Thiobacillus* sp. y TMRT eran Eubacterias, mientras que TERT pertenecía al reino de las Arqueobacterias.

4.- Las tres bacterias aisladas eran quimiolitótrofas estrictas. El medio óptimo de crecimiento para los tres microorganismos fue el 9K suplementado con: Fe^{2+} , para *Thiobacillus* sp., azufre elemental, para TMRT y mineral de sulfuros complejos, para TERT.

5.- Las tres bacterias aisladas tenían un pH óptimo de crecimiento por debajo de 2,5, por lo que hubo que clasificarlas como acidófilas extremas.

6.- Los microorganismos pudieron permanecer almacenados durante largos períodos de tiempo a temperatura ambiente, sin perder su viabilidad. Su conservación en frío les produjo la pérdida de sus capacidades de crecimiento y de biolixiviación.

7.- Los microorganismos aislados perdían la capacidad lixivante después de períodos prolongados de tiempo creciendo en medios sin mineral, por lo que fue preciso mantenerlos con mineral como única fuente de energía.

8.- Los estudios genéticos revelaron la presencia de un cromosoma circular en los tres casos y la ausencia de plásmidos en los tres microorganismos aislados.

9.- Se desarrolló un método de detección y cuantificación de microorganismos basado en la obtención de anticuerpos específicos contra células enteras del microorganismo TMRT. La especificidad de los anticuerpos, permitirá en un futuro el seguimiento y la cuantificación de este microorganismo en estudios ecológicos.

10.- Se desarrolló un procedimiento para determinar la adhesión de las células al mineral, y se puso de manifiesto que ésta era dependiente del tipo de microorganismo y no del concentrado mineral utilizado.

11.- La adhesión de las células al mineral fue dependiente del grado de ataque del mismo, así, las bacterias se unían inicialmente al mineral, siendo su número mayor que el de células libres. Al finalizar el proceso de lixiviación, después de un alto grado de ataque, el número de células libres es claramente más alto.

12.- Los tres microorganismos fueron capaces de utilizar sulfuros complejos polimetálicos como fuente de energía, resistiendo altas concentraciones de cationes metálicos en el medio. Estos hechos los convierten en microorganismos potencialmente útiles para su utilización en procesos de biolixiviación.

13.- Tanto los ensayos de caracterización como los de biolixiviación pusieron de manifiesto la influencia positiva de la agitación en el crecimiento de los cultivos bacterianos de los tres microorganismos.

14.- La capacidad de biolixiviación de los tres microorganismos mejora claramente el proceso de lixiviación química.

15.- El microorganismo TERT fue el mas sensible a los aumentos de densidad de pulpa. Este hecho, debido a problemas de atrición, obligó, por otra parte, a realizar los ensayos de biolixiviación con menor agitación que en el caso de los otros dos microorganismos.

16.- El microorganismo TMRT presentó cierta especificidad por los sulfuros de cobre frente a otros sulfuros metálicos presentes en el mismo concentrado mineral. El crecimiento de este microorganismo en presencia de sulfuros complejos con pequeñas proporciones de sulfuros de cobre fue prácticamente nulo. La recuperación de cobre en los ensayos realizados superó el 50% del cobre presente en el mineral y fue mayor que la del resto de los metales.

17.- La capacidad de oxidar sulfuros, junto con la incapacidad de utilizar el Fe^{2+} como fuente de energía, unido a las altas tasas de adhesión de las células al mineral, indicaron que el microorganismo TMRT realizaba el proceso de lixiviación, básicamente, a través del mecanismo directo.

18.- Los otros dos microorganismos aislados, *Thiobacillus* sp. y TERT, no demostraron ningún tipo de especificidad por los cationes analizados. En ambos casos, las tasas de extracción fueron muy superiores a las de los ensayos estériles para todos los metales controlados. Los dos microorganismos oxidaron el Fe^{2+} a Fe^{3+} , por lo que el proceso de lixiviación se realizó tanto a través del mecanismo directo como indirecto.

19.- La cinética del proceso de biolixiviación fue más rápida en los ensayos realizados con el microorganismo TERT que con las otras bacterias aisladas. La cinética más lenta se obtuvo en los ensayos con TMRT.

20.- En los ensayos de lixiviación para determinar la evolución de las poblaciones bacterianas puras en presencia de mineral sin esterilizar, se comprobó la persistencia del microorganismo termófilo extremo TERT, mientras que la presencia del termófilo moderado TMRT disminuyó progresivamente y las poblaciones autóctonas del mineral llegaron a dominar el medio. En el caso de TERT, las condiciones ambientales junto con su propia adaptación al mineral, hicieron difícil la colonización del medio por otras bacterias.

21.- La lixiviación de sulfuros complejos con cultivos mixtos naturales fue más ventajosa que la realizada por especies puras de *Thiobacillus* sp. o de TMRT.

22.- El estudio comparativo del proceso de biolixiviación de un mismo concentrado de sulfuros complejos, llevado a cabo por los tres microorganismos, muestra mayores recuperaciones metálicas, en todos los cationes analizados, por parte del microorganismo termófilo extremo.

BIBLIOGRAFÍA

- AHMAD A., NOBAR A.M., HUGHES M.N., POOLE R.K.** (1987) Isolation and characterization of metal and antibiotic resistant *Pseudomonas* from mining areas. En "Biohydrometallurgy 87". Norris P.R and Kelly D.P. eds. University of Warwick. Coventry. 550.
- ALEXANDER B., LEACH S., INGLEDEW W.J.** (1987). The relationship between chemiosmotic parameters and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Gen. Microbiol. 133:1171-1179.
- APEL W.A., DUGAN P.R., FILIPPI J.A., RHEINS M.S.** (1976). Detection of *Thiobacillus ferrooxidans* in acid mine environments by indirect fluorescent antibody staining. Appl. Environment. Microbiol. 32:159-165.
- ARREDONDO R., JEREZ C.A.**(1989). Specific Dot-Immunobinding Assay for Detection and Enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Enviroment. Microbiol. 55: 2025-2029.
- BAGDIGIAN R.M., MYERSON A.S.** (1986). The Adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on Coal Surfaces. Biotech. Bioengin. 28:467-479.
- BALCH W. E., FOX G. E., MAGRUM L. J., WOESE C. R., WOLFE R. S.** (1979). Metanogens: Reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43: 260-296.
- BALLESTER A., BLÁZQUEZ M.L., GONZÁLEZ F., MUÑOZ J.A.** (1989). The influence of different variables on the bioleaching of sphalerite. Biorecovery. 8:127-144.
- BALLESTER A., BLÁZQUEZ M.L., GONZÁLEZ F., MIER J.L.** (1990). Bacterial leaching of copper and zinc from a spanish complex sulphide concentrate. An. Quim. 86:500-505.
- BALLESTER A., GONZÁLEZ F., BLÁZQUEZ M.L.** (1988). Biolixiviación de menas naturales. Posibilidades actuales de utilización. Rev. Metal. Madrid. 24:91-102.
- BARR D.W., INGLEDEW W.J., NORRIS P.R.** (1990). Respiratory chain components of iron-oxidizing acidophilic bacteria. FEMS Microbiol. Letts. 70:85-90.
- BEFFA T., BERCZY M., ARAGNO M.** (1991). Chemolithoautotrophic growth on elemental sulfur (S⁰) and respiratory oxidation of S⁰ by *Thiobacillus versatus* and another sulfur-oxidizing bacterium. FEMS Microbiol. Letts. 84:285-290.
- BENNETT F.F., TRIBUTSCH H.** (1978). Bacterial leaching patterns on pyrite crystal surfaces. J. Bacteriol. 134: 310-317.
- BERRY V.K., MURR L.E.** (1976). Observations of selective attachment of bacteria low-grade ore: evidence for direct-contact bacterial leaching of sulfide minerals. En "34th Ann. Proc. Electron Microscopy", G.W. Bailey Ed. Miami Beach, Florida. pp:132.

- BERRY V.K., MURR L.E.** (1978). Direct observations of bacteria and quantitative studies of their catalytic role in the leaching of low-grade copper bearing waste. En "Metallurgical Applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena". (Murr L.E., Torma A.E., Brierley J.A. Eds.). Academic Press, New York. pp: 103-136.
- BHURAT M.C., DWIVEDY K.K., JARAYAM K.M.L. DAR K.K.** (1973). Some results of microbial leaching of uranium ore samples from Narwapahar, Bhatin and Keruandri, Singhbhum Distric, Bihar. NML Tech. J. 15:47-51.
- BLANCARTE-ZURITA M., BRANION R.M.R. and LAWRENCE R.W.** (1987). Microbiological Leaching of Chalcopyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*, A Comparative Study of a Conventional Process. En "Biohydrometallurgy 87". Norris P.R and Kelly D.P. eds. University of Warwick. Coventry. 273. 1987.
- BÖCK A., KANDLER O.** (1985). Antibiotic Sensivity of Archaeobacteria. En "The Bacteria" vol. VIII pp: 525-544.
- BORDONADA M.L., Y LOPEZ A.R.** (1988). Control del impacto ambiental producido por actividades mineras de naturaleza radiactiva. En "Congreso Internacional de Minería y Metalurgia. Area VII. Medio Ambiente". Oviedo, 16-22 de Octubre de 1988. Asociación Nacional de Ingenieros de Minas de España. pp: 50-71.
- BOSECKER K.** (1984). Biodegradation of sulfur minerals and its applications for metal recovery. Studies in Inorganic Chemistry. 5: 331-348.
- BRIERLEY C.L.** (1977). Thermophilic Microorganisms in Extraction of Metal from Ores. Dev. Ind. Microbiol. 18: 273.
- BRIERLEY C.L.** (1978). Bacterial leaching. CRC Crit. Rev. Microbiol. 6: 207-262.
- BRIERLEY C.L.** (1984). Microbiological mining: Technology status and commercial opportunities. World Biotech. Rep. 1: 599-609.
- BRIERLEY C.L., BRIERLEY J.A.** (1973) A Chemolithoautotrophic and Thermophilic Microorganism Isolated From an Acid Hot Spring. Can. J. Microbiol. 19: 183-188.
- BRIERLEY C.L., MURR L.E.** (1973). Leaching: Use of a Thermophilic and Chemoautotrophic Microbe. Science. 179: 488.
- BRIERLEY J.A.** (1978). Thermophilic Iron-Oxidizing Bacteria Found in Copper Leaching Dumps. Appl. Envirom. Microbiol. 36: 523-525.
- BRIERLEY J.A.** (1990). Biotechnology for the extractive metals industries. JOM. pp:28-30.
- BRIERLEY J.A., BRIERLEY C.L.** (1978). Microbial Leaching of Copper at Ambient and Elevated Temperatures. En "Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related

Microbiological Phenomena". Murr L.E., Torma A.E. and Brierley J.A. eds.). Academic Press. New York. 476.

BRIERLEY J.A., LE ROUX N.W. (1978). A facultive thermophilic *Thiobacillus*-like bacterium: Oxidation of iron and pyrite. En "Conference Bacterial Leaching 1977", Schwartz W. Ed. Verlag Chemie, Weinheim. pp:55.

BRIERLEY J.A., LOCKWOOD S.J. (1977). The Occurrence of Thermophilic Iron-Oxidizing Bacteria in a Copper Leaching System. FEMS. Microbiol. Lett. 2:163.

BROCK T.D., BROCK K.M., BELLY R.T., WEISS R.L. (1972). *Sulfolobus*; a New Genus of Sulfur-Oxidizing Bacteria Living at Low pH and High Temperature. Arch. Mikrobiol. 84:54-68.

BRYANT R.D., McGROARTY M., COSTERTON J.W., LAISHLEY E.J. (1983). Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). Can. J. Microbiol. 29:1159

COLMER A.R., HINCKLE M.E. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. Science. 106:253-256.

COTO O., FERNÁNDEZ A.I., LEÓN T., RODRÍGUEZ D. (1992). *Thiobacillus ferrooxidans* detection using immunoelectron microscopy. Microbiologia SEM. 8:76-81.

CHEN C.C.Y., SKIDMORE D.R. (1988). Kinetic elements in thermophilic-microbial leaching of sulfur from coal. Prepr. Pap. Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem. 33: 639-646.

DAS A., MISHRA A.K., ROY P. (1992). Anaerobic growth on elemental sulfur using dissimilar iron reduction by autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Letts. 97:167-172.

DAVE S.R., NATARAJAN K.A., BHAT J.V. (1981). Effect of 9K nutrient constituents in the bacterial leaching of sphalerite concentrates. Transaction of the Indian Institute of Metals. 34:319-323.

DE ROSA M. GAMBACORTA A., BULLOCK. (1975). Extremely Thermophilic Acidophilic Bacteria Convergent with *Sulfolobus acidocaldarius*. J. Gen. Microbiol. 86:156.

DECKER R.F. (1986). Biotechnology/Materials: The Growing Interface. Metall. Trans. 17A:5-14.

DISPIRITO A. A., DUGAN P. R., TOUVINEN O. H. (1983). Sorption of *Thiobacillus ferrooxidans* to particulate material. Biotech. Bioeng. 25:1163-1168.

DISPIRITO A. A., DUGAN P. R., TOUVINEN O. H. (1981). Inhibitory effects of particulate materials in growing cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*. Biotech. Bioeng. 23:2761-2769.

- DUGAN P.R.** (1984). Desulfuration of coal by mixed microbial cultures. En "Microbial Chemoautotrophy". Eds.: W.R. Sohl & O.H. Tuovinen. Ohio State University Press, Columbus. pp:3-10.
- DUTRIZAC J. E., MacDONALD R.J.C.** (1974). Ferric ion as a leaching medium. *Miner. Sci. Eng.* 6:59-100.
- DZIURLA M.A., MONROY M., LAMB B.T., PICQUOT S., BERTHELIN J.** (1992). A method to estimate the acidophilic bacteria (*T. ferrooxidans*) attached to pyrite and their comparison to non-adhering bacteria on solid media. Abstracts del International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6), Barcelona 1992.
- EHRlich H.L.** (1963). Microorganisms in acid drainage from a copper mine. *J. Bacteriol.* 86:350-352.
- EHRlich H.L.** (1988). Recent advances in microbial leaching of ores. *Minerals and Metallurgical Processing.* 5:57-60.
- EHRlich H.L.** (1991). Microbes for Biohydrometallurgy. En "Engineering Foundation Conference, Mineral Bioprocessing". Eds. R.W. Smith & M. Misra. Reno, Nevada. pp:57-78.
- ESPEJO T.R., RUIZ P.** (1987). Growth of free and attached *Thiobacillus ferrooxidans* in ore suspension. *Biotech. Bioeng.* 30:586-592.
- GOLOVACHEVA R.S, KARAVAIKO G.I.** (1978). A New Genus of Thermophilic Spore-Forming Bacteria. *Sulfobacillus*. *Mikrobiologiya.* 47:815.
- GOMEZ E.** (1990). Biolixiviación de sulfuros complejos con cultivos puros y mixtos. Memoria de Licenciatura. Univ. Complutense. Madrid.
- GOMEZ E., GONZALEZ F., BLAZQUEZ M.L., BALLESTER A.** (1991). Bioleaching of complex sulphides with different cultures of mesophilic microorganisms. En "EMC '91: Non-Ferrous Metallurgy, Present and Future. Elsevier Applied Science. London and New York. pp: 97-108.
- GROGAN D.W.** (1988). Phenotypic Characterization of the Archaeobacterial Genus *Sulfolobus*: Comparison of Five Wild-Type Strains. *J. Bacteriol.* 171:6713-6719.
- GROUDEV S.N.** (1986). Continuous Bacterial Leaching of Copper Sulfide Concentrates. En "Fundamental Applied Biohydrometallurgy". Lawrence R.W., Branion R.M.R and Ebner H.G.eds. Elsevier. Amsterdam. 43.
- GROUDEV S.N., GENCHEV F.N., GAIDARJEV S.S.** (1978). Observation of the Microflora in an Industrial Copper Dump Leaching Operation. En "Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena". Murr L.E., Torma A.E. and Brierlery J.A. Eds.). Academic Press. New York. 253.

GROUDEVA V.I., GROUDEV S.N., VASSILEV D.V. (1990) Microflora of two industrial copper dump leaching operations. En "Proceedings of the International Seminar: Dump and Underground Bacterial Leaching" Eds. G.I. Karavaiko, G. Rossi & Z.A. Avakyan. Moscu, 1990. pp: 210-217.

HARRISON Jr. A.P. (1978). Microbial sucession and mineral leaching in an artificial coal spoil. Appl. Enviroment. Microbiol. 36:861-869.

HARRISON Jr. A.P. (1984). The acidophilic *thiobacilli* and other acidophilic bacteria that share their habitat. Ann. Rev. Microbiol. 38:265-292.

HARRISON Jr. A.P. (1986). Characteristics of *Thiobacillus ferrooxidans* and other iron-oxidizing bacteria, with emphasis on nucleic acid analyses. Biotech. Appl. Biochem. 8:249-257.

HARRISON Jr. A.P., JARVIS B.W., JOHNSON J.L. (1980). Heterotrophic bacteria from cultures of autotrophic *Thiobacillus ferrooxidans*. Relationship and studies by means of Deoxyribonucleic Acid homology. J. Bacteriol. 143:448-454.

HARRISON Jr. A.P., NORRIS P.R. (1985). *Leptospirillum ferrooxidans* and similar bacteria: some characteristics and genomic diversity. FEMS Microbiol. Lett. 30:99-102.

HART A., MURRELL J.C., POOLE R.K., NORRIS P.R. (1991). An acid- stable cytochrome in iron-oxidizing *Leptospirillum ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Letts. 81:89-94.

HAZEU W., BATENBURG-Van der VEGTE W.H., BOS P., Van der PAS R.K., KUENEN J.G. (1988). The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. Arch. Microbiol. 150:574-579.

HERRERA L., RUIZ P., AGUILLON J.C., FEHRMANN A. (1989). A new spectrophotometric method for the determination of ferrous iron in the presence of ferric iron. J. Chem. Tech. Biotechnol. 44:171-181

HOLMES D.S., DEBUS K.A. (1991). Opportunities for biological metal recovery. En " Engineering Foundation Conference, Mineral Bioprocessing" Eds. R.W. Smith & M. Misra. Reno, Nevada. pp:57-78.

HOLMES D.S., LOBOS J.H., BOPP L.H., WELCH G.C. (1984) Cloning of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 157:324-326.

HUBER G., HUBER H., STETTER K.O. (1986). Isolation and characterization of new metal mobilizing bacteria. Biotech. Bioeng. Symp. 16:239-251.

HUBER G., SPINNLER C., GAMBACORTA A., STETTER K.O. (1989). *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. Represents a New Genus of Aerobic, Metal-Mobilizing, Thermoacidophilic Archaeobacteria. System. Appl. Microbiol. 12:38-47.

- HUBER G., STETTER K.O.** (1990). *Thiobacillus cuprinus* sp. nov., a novel facultatively organotrophic metal-mobilizing bacterium. Appl. Environment. Microbiol. 56:315-322.
- HUBER G., STETTER K.O.** (1991). *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a Novel Strictly Chemolithoautotrophic Thermophilic Archaeal Species of Metal-Mobilizers. System. Appl. Microbiol. 14:372-378.
- HUBER H., HUBER G., STETTER K.O.** (1985). A Modified DAPI Fluorescence Staining Procedure Suitable for the Visualization of Lithotrophic Bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 6:105-106.
- HUTCHINS S. R., DAVIDSON M. S., BRIERLEY J.A., BRIERLEY C. L.** (1986). Microorganisms in reclamation of metals. Ann. Rev Microbiol. 40:311-336.
- IMAI K.** (1976). Effect of Heavy Metal Ions on the Activity of an Iron-Oxidizing Chemoautotroph. World Min. and Metals Technology. Am. Inst. Min. Met. Petrol. Engin. New York. Vol 1. 321-332.
- INGLEDEW J. W.** (1982). *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. Biochimica et Biophysica Acta. 683:89-117.
- JEFFERS T.H., FERGUSON C.R.** (1991). Biosorption of metal contaminants from acidic mine waters. En "Engineering Foundation Conference, Mineral Bioprocessing". Eds. R.W. Smith & M. Mishra. pp:289-298
- JEREZ C.A., ARREDONDO R.** (1989). Dot-Immunobinding Assay for Specific and Fast Detection and Enumeration of different bioleaching microorganisms. En "Bioleaching: From Molecular Biology to Industrial Applications". Eds. R. Badilla-Ohlbaum, T. Vargas & L. Herrera. 89-94.
- JEREZ C.A., ARREDONDO R.** (1991). A sensitive immunological method to enumerate *Leptospirillum ferrooxidans* in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Letts. 78:99-101.
- JEREZ C.A., PEIRANO I., CHAMORRO D., CAMPOS G.** (1986). Immunological and electrophoretical differentiation of *Thiobacillus ferrooxidans* strains. En "Fundamental Applied Biohydrometallurgy". Lawrence R.W., Branion R.M.R and Ebner H.G.eds.) Elsevier. Amsterdam. pp:443-456.
- JOHNSON D.B., KELSO W.I.** (1983). Detection of heterotrophic contaminants in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans* and their elimination by subculturing in media containing copper sulphate. J. Gen. Microbiol. 129: 2969-2972.
- KARAVAIKO G.I., BULYGINA E.S., TSAPLINA I.A., BOGDANOVA T.I., CHUMAKOV K.M.** (1990). *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: a new lineage of bacterial evolution?. FEBS 261:8-10.

- KARAVAIKO G.I., GOLACHEVA R.S., PIVOVAROVA T.A., TZAPLINA I.A., VARTANJAN N.S.** (1987). Thermophilic bacteria of the genus *Sulfobacillus*. En "Biohydrometallurgy 87". Eds. Norris P.R and Kelly D.P. University of Warwick. Coventry. pp:29-41.
- KARGI F., ROBINSON J.M.** (1982). Removal of sulfur compounds from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. Appl. Environment. Microbiol. 44:878-883.
- KARGI F., ROBINSON J.M.** (1985). Biological removal of pyritic sulfur from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius*. Biotech. Bioeng. 27:41-49.
- KELLY D.P.** (1981). Introduction to the chemolithotrophic bacteria. En "The prokaryotes", capitulo 79. (Starr m.p., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G., eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp:997-1004.
- KELLY D.P.** (1987). Evolution of the understanding of the microbiology and biochemistry of the mineral leaching habitat. En "Biohydrometallurgy 87". Norris P.R and Kelly D.P. eds. University of Warwick. Coventry. pp:3-14.
- KELLY D.P., HARRISON Jr. A.P.** (1989). Genus *Thiobacillus*. En "Bergey's Manual of systematic bacteriology". Williams & Wilkins. Baltimore, USA. Vol. 3 pp: 1842-1859.
- KELLY D.P., NORRIS P.R., BRIERLEY C.L.** (1979). Microbiological methods for the extraction and recovery of metals. En "Microbial technology: Current state, future prospects". (Bull A.T., Ellwood D.C., Ratledge C., eds.) pp: 263-308. Cambridge University Press. Cambridge.
- KELLY D.P., TUOVINEN O.H.** (1972) Recommendation that the names *Ferrobacillus ferrooxidans*, Leathen and Braley, and *Ferrobacillus sulfooxidans*, Kinsel, be recognized as synonyms of *Thiobacillus ferrooxidans*, Temple and Colmer. Int. J. Syst. Bacteriol. 22:170
- KIEL H., SCHWARTZ W.** (1980). Leaching of a silicate and carbonate copper ore with heterotrophic fungi and bacteria producing organic acids. Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie. 20:627-636.
- KINSEL N.** (1960). New sulfur oxidizing iron bacterium: *Ferrobacillus ferrooxidans* sp.nov. J. Bacteriol. 80:268.
- KLEIN J., BEYER M., AFFERDEN M., HODER W., PFERFFER F., SEWARD H., WOLF-FISHER E., JÜNTGEN H.** (1989). Coal in Biotechnology. En "Biotechnology. Special Microbial Processes." Ed. H.J. Rehm. VHC, Weinheim, R.F.A., Vol. 6b, cap. 16, pp:497-567.
- KUENEN J. G., TOUVINEN O. H.** (1981). The genera *Thiobacillus* and *Thiomicrospira*. En "The prokaryotes". (Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G., eds.) Capitulo 81. pp: 1023-1036. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- KUENEN J.G., PRONK J.T., HAZEAU W., MEULEMBERG R., BOS P.** (1993). A review of bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by acidophilic thiobacilli. En "Biohidrometallurgical technologies". Eds. A.E. Torma, M.L. Apel, C.L. Brierley. Proceedings of an International Biohidrometallurgy Symposium, Jackson Hole, Wyoming, USA. Publicado por TMS. Vol. II. pp: 487-494.
- LAWRENCE R.W., BRUYNESTEYN A.** (1983). Biological pre-oxidation to enhance gold and silver recovery from refractory pyritic ores and concentrates. CIM Bull. 76:107-110.
- LE ROUX N.W., WARKELEY D.S and HUNT S.D.** (1977). Thermophilic *Thiobacillus-Type* Bacteria from Islander Thermal Areas. J. Gen. Microbiol. 100:197-201.
- LEATHEN W.W., BRALEY S.A.** (1954). A new iron-oxidizing bacterium: *Ferrobacillus ferrooxidans*. Bacteriol. Proc. 44.
- LEATHEN W.W., BRALEY S.A. McINTYRE L.D.** (1953). The role of bacteria in the formation of acid from certain sulfuric constituents associated with bituminous coal. II. Ferrous iron oxidizing bacteria. Appl. Bacteriol. 1:65.
- LENNOX, E.S.** (1955). Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology, 1:190.
- LIDSTRÖM E. B. Y SEHLIN H. M.** (1989). High Efficiency of Plating of the Thermophilic Sulfur-Dependent Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Appl. Environ. Microbiol., pp: 3020-3021.
- LIDSTRÖM E. B., GUNNERIUSSON E., TUOVINEN O.H.** (1992) Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. Critical Reviews in Biotechnology. 12:133-155.
- LIDSTRÖM E.B. and SEHLIN H.M.** (1990). Toxicity of Arsenic Compounds to the Sulfur-dependent Archaeobacterium *Sulfolobus*. En "Biohidrometallurgy". Salley J., McCready J. and Wichlacz P.L. Eds. Canada Centre for Mineral and Energy Technology. Ottawa. Ontario. 59.
- LUNDGREN D. G., SILVER M.** (1980). Ore leaching by bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 34:263-283.
- MACKINTOSH M.E.** (1978). Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Gen. Microbiol. 105:215-218.
- MAMUR J., DOTI P.** (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5:109-118.
- MARGNI R.A.** (1989). Inmunología e Inmunoquímica. 4ª Edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires.

MARIN I. (1989). Asignación filogenética y estudio del genoma de H65, un nuevo microorganismo lixivador. Tesis doctoral. Dto. Biología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid.

MARKOSYAN G.E. (1972). A new Iron-Oxidizing Bacteria: *Leptospirillum ferrooxidans* gen. et sp.. Biol. Zh. Armenii. 25:26.

MARSH R.M., NORRIS P.R. (1983). Mineral Sulphide Oxidation by Moderately Thermophilic Acidophilic Bacteria. Biotechnol. Lett. 5: 585.

MARSH R.M., NORRIS P.R. (1983). The Isolation of Some Thermophilic, Autotropic, Iron-and-Sulphur-Oxidizing Bacteria. FEMS. Microbiol. Lett. 17: 311-315.

MARSH R.M., NORRIS P.R., LE ROUX N.W. (1983). Growth and Mineral Oxidation Studies with *Sulfolobus*. En "Progress in Biohydrometallurgy", Rossi and Torma A.E. eds. Assoc. Miner. Sarda. Iglesias. pp:71-81.

MEULENBERG R., PRONK J.T., FRANK J., HAZEU W., BOS P., KUENEN J.G. (1992^b). Purification and partial characterization of a thermostable trithionate hydrolase from the acidophilic sulphur oxidizer *Thiobacillus acidophilus*. Eur. J. Biochem. 209: 367-374

MEULENBERG R., PRONK J.T., HAZEU W., BOS P., KUENEN J.G. (1992^a). Oxidation of reduced sulphur compounds by intact cells of *Thiobacillus acidophilus*. Arch. Microbiol. 157:161-168.

MILLER K.W., RISANICO S.S., RISATTI J.B. (1992). Differential Tolerance of *Sulfolobus* Strains to Transition Metals. FEMS Microbiol. Letts. 93:69-74

MITOV K.L., MIKHAILOV M.Z., KESTAJOV I.K., DOBREV K.D., ALEKSANDROVA T.I. (1990). Assessing the possibilities for biotechnological extraction of metals from raw materials. En "Proceedings on the International Seminar: Dump and Underground Bacterial Leaching" Eds. G.I. Karavaiko, G. Rossi & Z.A. Avakyan. Moscu, 1990. pp: 74-85.

MUÑOZ J.A. (1992). Estudio de la biolixiviación de un mineral de uranio español. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense, Madrid 1992.

MURR L.E., BRIERLEY J.A. (1978). The use of a large scale testing facilities in studies of the role of microorganisms in commercial leaching operations En "Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena". Murr L.E., Torma A.E. and Brierley J.A. Eds.). Academic Press. New York. pp: 491-520.

MUYZER G., De BRUYN A.C., SCHMEDDING D.J.M., BOS P., WESTBROEK P., KUENEN G.J. (1987). A combined immunofluorescence-DNA-fluorescence staining technique for enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* in a population of acidophilic bacteria. Appl. Environment. Microbiol. 53:660-664.

- NATHANSOHN A.** (1902). Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. Mitt. Zool. Stn. Neapel. 15:655.
- NORRIS P.R.** (1983). Iron an Mineral Oxidation with *Leptospirillum ferrooxidans*. En "Recent Progress in Biohydrometallurgy". Rossi G. and Torma A.E. Eds. Assoc. Miner. Sarde. Iglesias. 83.
- NORRIS P.R.** (1988). Bacterial diversity in reactor mineral leaching. 8th. International Biotechnology Symposium. Paris, Julio de 1988.
- NORRIS P.R.** (1989). Mineral-Oxidizing Bacteria: Metal-Organism Interactions. En "Metal-Microbe Interactions". Poole R.K. and Gadd G.M. Eds. Oxford. U.K. Cap. 7. 104-105.
- NORRIS P.R., BARR D.W.** (1985). Growth and Iron Oxidation by Acidophilic Moderate Thermophiles. FEMS Microbiol. Letts. 28:221-224.
- NORRIS P.R., BARR D.W., HINSON D.** (1987). Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite. En "Biohydrometallurgy 87". Norris P.R and Kelly D.P. eds. University of Warwick. Coventry. pp:43-59.
- NORRIS P.R., BRIERLEY J.A., KELLY D.P.** (1980). Physiological characteristics of two facultatively thermophilic mineral-oxidizing bacteria. FEMS Microbiol. Letts. 7:119-122.
- NORRIS P.R., KELLY D.P.** (1978). Disolution of pyrite (FeS₂) by pure and mixed cultures of some acidophilic bacteria. FEMS Microbiol. Letts. 4:143-146.
- NORRIS P.R., KELLY D.P.** (1982). The Use of Mixed Microbial Cultures in Metal Recovery. En "Microbial Interactions and Communities". Vol 1. Bull A.T. and Slater J.H. (Eds.). Academic Press. London. pp:443-474.
- NORRIS P.R., KELLY D.P.** (1983). Iron and Mineral Oxidation with *Leptospirillum-like* Bacteria. En "Recent Progress in Biohydrometallurgy". Rossi G. and Torma A.E. eds. Assoc. Miner. Sarda. Iglesias. 83.
- NORRIS P.R., NIXON A., LINDSTROM E.B.** (1986). Growth of mesophilic and thermophilic acidophilic bacteria on sulfur and tetrathionate. Biotechnol. Appl. Biochem. 8:318.
- NORRIS P.R., PARROT L.** (1986). High Temperature, Mineral Concentrate Dissolution with *Sulfolobus*. En "Fundamental and Applied Biohydrometallurgy". Eds.: Lawrence R.W. Branion R.M.R. and Ebner H.G. Elsevier. Amsterdam. pp: 355-365.
- NORRIS P.R., PARROT L., MARSH R.M.** (1986). Moderately Thermophilic Mineral-Oxidizing bacteria. In Workshop on Biotechnology for the Mining, Metal Refining and Fossil Fuel Processing Industries. Ehrlich H.L. and Holmer D.S. eds.). Biotechnol. Bioeng. Symp. 16:253-262.

- OLSON G.J., PORTER F.D., RUBENSTEIN J., SILVER S.** (1982). Mercury Reductase Enzyme from a Mercury-Volatizing Strain of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 151: 1230.
- PICHUANTES S., COFRE G., VENEGAS A., RODRIGUEZ M.** (1986). Studies on native strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Growth characteristics and antibiotic susceptibility. (1,2). Biotechnology and Applied Biochemistry. 8:276-283
- RAO G.S., BERGER L.R.** (1970). Basis of pyruvate inhibition in *Thiobacillus thiooxidans*. J. Bacteriol. 102:462-466.
- SCHWARTZ D. C., CANTOR C. R.** (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 37:67-75.
- SEGERER A., NEUNER A., KRISTJANSSON J.K., STETTER K.O.** (1986). *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov. and *Acidianus brierleyi* comb. nov.: Facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulphur-metabolizing archaeobacteria. Int. J. System. Bacteriology. 36:559-564.
- SHIVERS D.W., BROCK T.D.** (1973). Oxidation of Elemental Sulfur by *Sulfolobus acidocaldarius*. J. Bacteriol. 114: 706-710.
- SILONIZ M. I., LORENZO P., PEREDA J.** (1991). Distribution of oxidizing bacterial activities and characterization of bioleaching-related microorganisms in a uranium mineral heap. Microbiologia SEM. 7:82-89.
- SILVER M., LUNGREN D.G.** (1986). Sulfur-Oxidizing Enzyme of *Thiobacillus ferrooxidans*. Can. J. Biochem. 46:457.
- SILVERMAN M. P., LUNDGREN D. G.** (1959). Studies on the Chemoautotrophic Iron Bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans* I. An Improved Medium and a Harvesting Procedure for Securing High Cell Yields. J. Bacteriol. 77:642.
- SMITH C.L., CANTOR C.R.** (1987). Purification specific fragmentation and separation of large DNA molecules. En "Methods in Enzymology, Recombinant DNA". R. Wu Ed. Academic Press. New York, 155:449-467.
- SMITH C.L., KELCO S.R., CANTOR C.R.** (1988). Pulsed field gel electrophoresis and the technology of large DNA molecules. En "Genome Analysis: A Practical Approach". K. Davies Ed. IRL Press, Oxford, England. 41-72.
- SOLARI, J.A.** (1986). Bacterial attachment to non-biological solid surfaces. En "Bioleaching: From Molecular Biology to Industrial Applications." Eds. R. Badilla-Ohlbaum, T. Vargas & L. Herrera. pp: 63-78.
- STANIER R.Y., ADELBERG E.A., INGRANHAM J.L.** (1984). Microbiología. Ed. Reverté S.A. Barcelona.

- SUGIO T., WHITE K.J., SHUTE E., CHOATE D., BLAKE II R.C.** (1992). Existence of a Hydrogen Sulfide:Ferric Ion Oxidoreductase in Iron-Oxidizing Bacteria. *Appl. Environment. Microbiol.* 58:431-433.
- SUZUKI I., CHAN C.W., TAKEUCHI T.L.** (1992). Oxidation of Elemental Sulfur to Sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* Cells. *Appl. Environment. Microbiol.* 58:3767-3769.
- TEMPLE K.L., COLMER A.R.** (1951). The Autotrophic Oxidation of Iron by a New Bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 62:605.
- TORMA A.E.** (1977). The role of *Thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. *Adv. Biochem. Eng.* 3:1-37.
- TORMA A.E.** (1991). New trends in biohydrometallurgy. En "Engineering Foundation Conference, Mineral Bioprocessing" Eds. R.W. Smith & M. Misra. Reno, Nevada. pp: 43-56.
- TORMA A.E.** (1989). The Microbial Extraction of Less Common Metals. *JOM*, 41:32-35.
- TORMA A.E., WADDEN C.C., BRANION R.M.R.** (1970). Microbiological Leaching of Zinc Sulfide Concentrate. *Biotechnol. Bioeng.* 12:501.
- TUOVINEN O.H., SILVER M., MARTIN P.A.W., DUGAN P.R.** (1982). The Agnew Lake uranium mine leach liquors: chemical examinations, bacterial enumeration and composition of plasmid DNA of iron-oxidizing *thiobacilli*. *Use Microorg. Hydrometallurgy.* pp:59-69.
- VAN DER AUWERA P., LABBE M., MAYBERRY W.R., FERGUSON K.P., LAMBE Jr. D.W.** (1986). Identification of *Bacteroides* by cellular fatty acid profiles: application to the routine microbiological laboratory. *Journal of Microbiological Methods.* 4:267-275.
- WEISS R.L.** (1973). Attachment of bacteria to sulphur in extreme environments. *J. Gen. Microbiol.* 77:501-507.
- WOOD A.P., KELLY D.P.** (1983). Autotrophic and Mixotrophic Growth of Three Thermoacidophilic and Acidophilic Iron-Oxidizing Bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 107-112.
- WOOD A.P., KELLY D.P., NORRIS P.R.** (1986). Autotrophic growth of four strains on tetrathionate and the effect of organic nutrients. *Arch. Microbiol.* 146:382.
- ZILLIG W., STETTER K.O., WUNDERL S., SCHULZ W., PRIESS H., SCHOLZ I.** (1980). The *Sulfolobus-Calderiella* group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Arch. Microbiol.* 125:259-269