



Tecnológico Nacional de México
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

**INFORME TECNICO
DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

INGENIERIA QUIMICA

Presenta:

Isela Rodríguez Pozos

Nombre del proyecto:

Tratamiento de Residuos No ferrosos por *Acidithiobacillus thiooxidans*.

Periodo de realización:

Enero-Junio 2017

Asesores:

Ing. Leonardo Gómez Gutiérrez
Ing. Luis Alberto Jiménez Zebadua
Dra. Claudia Ivette Ruiz Suárez

2017

CONTENIDO

1.- INTRODUCCIÓN	1
2 JUSTIFICACION	4
3 OBJETIVO	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS	5
4 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ	6
5 PROBLEMAS A RESOLVER.....	8
6 ALCANCES Y LIMITACIONES.....	9
7 FUNDAMENTO TEORICO.....	10
7.1 Generación de residuos a nivel nacional.	10
a) Residuos sólidos urbanos (RSU).....	10
b) Residuos de manejo especial (RME)	11
7.2 Problemática ambiental ocasionada por residuos contaminados por metales	11
1.2.1 Clasificación de los metales	12
7.3 Legislación	13
7.4 Tratamiento de materiales contaminados con metales.	14
7.5 Métodos Biológicos empleados para el tratamiento de metales No ferrosos	14
7.6 Reportes de trabajos con cultivos sulfooxidantes.....	17
8 METODOLOGIA.....	20
8.1 Microorganismo utilizado.	20
8.2 Medio de cultivo Starkey.....	20
8.3 Preparación y ajuste de inóculo.....	20
8.4 Efecto del tamaño de inóculo y temperatura sobre la actividad sulfooxidante de Acidithiobacillus thiooxidans DSM 26636.	21
8.5 Determinación del ion sulfato.....	21
8.5.1 Solución Acondicionadora.	22
8. 5.2 Curva de calibración.	22
8.6 Lectura de pH.	23
8.7 Determinación de la concentración de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄).	23
8.8 Evaluación de la habilidad de Acidithiobacillus thiooxidans DSM 26636 de crecer en presencia de residuos NO ferrosos.	24
8.9 Digestión de muestras y cuantificación de metales mediante ICP-OES.	24

9 RESULTADOS	27
9.1 Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636.	27
9.2 Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM 26636 de crecer en presencia de residuos NO ferrosos bajo las condiciones óptimas de temperatura y tamaño de inóculo.	34
9.3 Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en residuos NO ferrosos mediante la cuantificación de metales por ICP-OES.	53
10 CONCLUSION	61
11 BIBLIOGRAFÍA	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de los microorganismos	17
Tabla 2. Condiciones de digestión ácida Microwave Pro (Digestión líquida)	25
Tabla 3. Condiciones de digestión ácida Microwave Pro (Digestión sólida).....	25

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 a 20°C	28
Figura 2 Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 a 25°C	29
Figura 3. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 a 30°C	30
Figura 4. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 a 35°C.	31
Figura 5. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 a 40°C	33
Figura 6 Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636..	34
Figura 7. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-1 (Residuo de Torno).....	36
Figura 8. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-2 (Residuo fabricación de rines de automóvil).....	37
Figura 9. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-3 M1 (Jal de mina).....	39
Figura 10. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-3 M2 (Jal de mina).....	40
Figura 11. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-4 (Interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado)	42
Figura 12. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-5 (Interior del contenido de un filtro de agua-resina)	43
Figura 13. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-6 (Catalizador-IMP “HDS2R”).....	45
Figura 14. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-7 (Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”)	46
Figura 15. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-8 (Catalizador-IMP “CAT_US”)	48
Figura 16. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-9 (Escorias fundidora de Aluminio)	49
Figura 17. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1)	51

Figura 18. Evaluación de la actividad sulfooxidante de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 en presencia del Residuo-11 (Residuo regeneración metal liquido-lote 2)	53
Figura 19. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R3 M1 (Jal de mina).	54
Figura 20. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R3 M2 (Jal de mina).	55
Figura 21. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R4 (Interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado).	56
Figura 22. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R5 (Interior del contenido de un filtro de agua-resina).	57
Figura 23. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-7 (Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”).	57
Figura 24. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-8 (Catalizador-IMP “CAT_US”).	58
Figura 25. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R9 (Escorias fundidora de Aluminio).	59
Figura 26. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1).	60
Figura 27. Evaluación de la habilidad de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-11 (Residuo regeneración metal liquido-lote 2).	60

1.- INTRODUCCIÓN

Debido al mal manejo y control de los metales, esto constituye un crecimiento en la contaminación ambiental lo cual se ha convertido en una problemática mundial. Estos metales representan una amenaza biológica ya que no son biodegradables. Existen microorganismos que cuentan con un sistema genético que les ayudan a contrarrestar los efectos tóxicos de los metales ya que pueden sobrevivir a grandes concentraciones de estos. La resistencia al metal puede ser natural o adquirida. La resistencia natural es propia de cada especie o grupo bacteriano. El determinante genético de resistencia a metales pesados representa una gran importancia desde el punto de vista de la biotecnología ambiental o biorremediación.

Las aplicaciones industriales de las bacterias resistentes a metales incluyen el uso de biosensores para el control y seguimiento de la concentración en una gran variedad de sustratos (Revista CENIC Ciencias Biológicas, 2016, Díaz et al.).

Existen trabajos en los que se ha empleado las bacterias *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans*. Se estudió la biolixiviación de pirita por un cultivo puro de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y por un consorcio de cepas nativas provenientes de la solución lixivante de pilas de biolixiviación de Minera Escondida (PLS). El estudio se efectuó con una muestra de pirita purificada y de fina granulometría, la cual fue lixiviada en reactores de frascos agitados (Stavelot, 2009). Se han realizado estudios sobre el aislamiento e identificación de bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes del área minera de Riotinto para determinar su participación en el mantenimiento de las condiciones de acidez y concentración de metales, que le dan a este hábitat el calificativo de "ambiente extremo" y del que, en gran medida, las bacterias quimiolitotróficas identificadas en este trabajo son responsables directas (Segura Pachón, 1998). Se han realizado estudios sobre la secuencia del genoma de *A. thiooxidans*, encontrando que el genoma de *A. thiooxidans* A01 contiene enzimas claves para la oxidación de azufre elemental y RISCs (Compuestos inorgánicos de azufre reducidos) como: dioxigenasa de azufre (SDO), quinona sulfuro reductasa (SQR), tiosulfato: quinona oxidoreductasa (TQO), Tetrionato hidrolasa (TET), Proteínas del sistema de oxidación de azufre y sus componentes asociados al transporte de electrones (SOx). Además, se detectó el gen oxigenasa de azufre reductasa (sor) así como

otra vía putativa que se encuentra en el citoplasma de *A. thiooxidans* y que cataliza la oxidación de sulfito a sulfato por la fosfo-adenosina fosfosulfato reductasa (PAPS) y adenil-sulfato quinasa (APS). Otro estudio evaluó las condiciones físico-químicas y de operación en el crecimiento y la actividad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Govender et al., 2015). Los factores estudiados incluyen el tamaño del inóculo, condiciones de cultivo de inóculo, la disponibilidad de hierro ferroso en solución y la concentración de cobre en la solución. Una comparación de las pruebas con diferentes tamaños de inóculo mostró que un tamaño de inóculo más pequeño resultó en un aumento del retraso en el crecimiento microbiano y la oxidación de hierro ferroso. En el cultivo crecido mediante pirita, hubo poca actividad microbiana con respecto al cultivo crecido en el hierro ferroso. Este estudio destaca que la concentración de inóculo que se emplea es importante ya que dependiendo del tamaño de inóculo se aumenta o disminuye la actividad microbiana. Se han realizado estudios de biolixiviación de minerales sulfurosos de bajo grado proveniente de una mina aurífera (que contiene oro), localizada en el municipio de Marmato en Caldas, antes y después de un proceso de biolixiviación en el que se empleó un cultivo bacteriano de la mina (compatible con *Thiobacillus ferrooxidans*) para medir la efectividad del mismo. Para los ensayos realizados se empleó un biorreactor y se consideraron diferentes relaciones líquido/sólido, para estimar variables como población bacteriana, pH, agitación, potencial de oxidorreducción, temperatura y tiempo. Los resultados demostraron una eficiencia máxima del 95%, lo que significa un incremento del 8% de recuperación en relación con el tratamiento único por cianuración.

Para la recuperación de metales no ferrosos el potencial de usar *Acidithiobacillus thiooxidans* es que de acuerdo a los estudios realizados esta bacteria puede crecer o desarrollarse en condiciones de acidez alta y en concentraciones de metales, además de que se alcanza una mayor actividad microbiana en tamaños de inóculos más grandes. Otros estudios llevados a cabo sobre la biolixiviación con bacterias compatibles demuestran que se puede alcanzar una eficiencia de 95% de lixiviación de metales.

Lo que se evaluará en este proyecto de investigación es el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 26636 para poder establecer las condiciones óptimas para su crecimiento o desarrollo, por lo que se hará determinaciones de la concentración de ácido sulfúrico

(H₂SO₄), producción de sulfatos (SO₄) y disminución de pH. También se evaluará la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de crecer en presencia de residuos no ferrosos una vez establecidas las condiciones óptimas de crecimiento, esto se llevara a cabo mediante la concentración de ácido sulfúrico (H₂SO₄), producción de sulfatos (SO₄) y nivel de pH. Y finalmente se evaluará la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* de lixiviar metales contenidos en los residuos no ferrosos.

2 JUSTIFICACION

En Nuestro país se ha dado un crecimiento en el desarrollo de muchas actividades como es la industrial, ya sea para satisfacer las necesidades de las personas o para el mejoramiento de ciertas tecnologías. Pero estas actividades generan residuos y si no hay un manejo adecuado de ellos ocasionara problemas ambientales y daños a la salud de los seres humanos y al ecosistema.

El presente proyecto de investigación conlleva al tratamiento de residuos con presencia de metales no ferrosos, para ello se realizó experimentos para establecer las condiciones óptimas de temperatura y densidad poblacional para mejorar su actividad sulfooxidante y con ello incrementar la producción de ácido sulfúrico que es el agente lixivante empleado en la movilización de metales. Hay diversas estrategias que se emplean para el tratamiento de residuos contaminados por metales, pero algunas de ellas tienen un alto valor económico y además no son tan amigables con el medio ambiente ya que al emplear reactivos como son los ácidos se producen efluentes residuales tóxicos o contaminación gaseosa, los residuos generados por algunos métodos pueden ser lodos residuales, escorias, polvos metalúrgicos y residuos constituidos por la mena tratada. Es por eso que se ha desarrollado el uso de tratamientos biológicos mediante el empleo de ciertas bacterias como *Acidithiobacillus thiooxidans*, bacteria quimiolitótrofa sulfooxidante que utiliza el azufre como fuente de energía y durante su metabolismo lo oxida a ácido sulfúrico (agente biolixivante), dicha estrategia se considera una alternativa biotecnológica para el mejoramiento en el proceso de recuperación de metales y con ello contrarrestar la contaminación al medio ambiente además de que es una opción que puede llegar a ser rentable y eficiente.

3 OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 y su posterior evaluación en el tratamiento de residuos contaminado con metales No ferrosos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636, mediante la producción de sulfatos (SO_4), concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y reducción de pH.
2. Evaluar la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de crecer bajo condiciones de temperatura y tamaño de inóculo óptimas en presencia de residuos no ferrosos, mediante la producción de sulfatos (SO_4), concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y pH.
3. Evaluar la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en residuos NO ferrosos mediante la cuantificación de metales por ICP-OES.

4 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada unidad Querétaro

El Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (CICATA Querétaro), se ubica en la Ciudad de Querétaro en el Estado de Querétaro, México. Pertenece al Instituto Politécnico Nacional, es un centro de investigación científico y tecnológico, concebido para servir de enlace entre la comunidad científica y los sectores productivos de bienes y servicios, para atenderlos y ofrecerles soluciones a sus problemas de desarrollo.

El centro de investigación esta creado por el IPN para fortalecer su impacto a nivel nacional, que atiende necesidades de formación de recursos humanos y de desarrollo tecnológico de la región, a través de proyectos de investigación que contribuyen al desarrollo social y a la competitividad de los sectores productivo y de servicios, con el respaldo de las capacidades del Instituto, con un enfoque multidisciplinario, innovador y de excelencia, en un marco de sustentabilidad.

CICATA Querétaro desarrolla programas de investigación científica y tecnológica con un enfoque interdisciplinario y, de igual forma, atiende la formación de recursos humanos de alto nivel contribuyendo al fortalecimiento de la calidad y la competitividad nacional e internacional del aparato productivo en México.

El espacio físico del CICATA Querétaro (CQ) del IPN consta de un edificio de aproximadamente 4,000m² ubicados en 2 plantas. Se cuenta con nueve laboratorios de investigación, cuatro laboratorios de uso pesado y dos talleres mecánicos para prototipos.

El área en que se participó fue en el de biotecnología, dicha área realiza una tarea de investigación, en diferentes campos como son de biología molecular, bioquímica, biofísica, microbiología, química de alimentos y toxicología.

Los proyectos pretenden resolver problemáticas que se presentan en nuestro entorno social y comercial, como son la detección y evaluación de la contaminación química de diferentes ambientes y métodos de su remediación, la evaluación del efecto de los contaminantes nocivos sobre el estado de salud de la población local, el desarrollo de procedimientos para

realzar y asegurar la calidad de los insumos alimenticios del consumidor, el desarrollo de diagnósticos moleculares para la detección de organismos infecciosos y la optimización de procesos enzimáticos con potencial para aplicaciones bioindustriales.

CICATA cuenta con laboratorios, los cuales permiten realizar las distintas prácticas y experimentos que se requieren en las diferentes líneas de investigación con las que cuenta el Centro. El laboratorio en que se participó fue en el de Caracterización de materiales el cual se encuentra a cargo de la Dra. Marlenne Gómez Ramírez. Dicho laboratorio cuenta con diferentes equipos de trabajo como son balanza analítica, incubadora, espectrofotómetro, potenciómetro, vortex de laboratorio, micropipetas, hornos, microscopio, centrifugadora para tubos eppendorf, material de laboratorio y diferentes reactivos.

Otro de los laboratorios en que se trabajó fue en el de Bioquímica que está a cargo del Dr. Reynaldo Carlos PlessElling, en este laboratorio podemos encontrar equipos como centrifugadoras para tubos falcón, campana de extracción, autoclaves, purificador para agua destilada, material de laboratorio, equipos de seguridad, hornos, balanza analítica y digestor de microondas.

5 PROBLEMAS A RESOLVER

Determinar las condiciones óptimas de temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636.

Evaluar la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de crecer en presencia de residuos NO ferrosos bajo las condiciones óptimas de temperatura y tamaño de inóculo, y con ello determinar los residuos en los que la bacteria puede lixiviar metales.

Evaluar la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en residuos NO ferrosos y determinar en qué residuos se obtienen mejores resultados en el tratamiento de biolixiviación por *Acidithiobacillus thiooxidans*.

6 ALCANCES Y LIMITACIONES

ALCANCES

El proyecto realizado tiene como alcance evaluar el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante, de acuerdo con la parte experimental desarrollada se realizaron experimentos a temperaturas de 20, 25, 30, 35 y 40 °C y densidad poblacional de 3×10^7 UFC/ml y 2×10^8 UFC/ml y de las cuales se llevaron a cabo determinaciones de la cantidad de sulfatos, concentración de ácido sulfúrico y nivel de pH. Estudiando los resultados que se obtuvieron se llegó a la selección de que la temperatura más idónea es a 30 °C y una densidad poblacional de 2×10^8 UFC/ml ya que se tiene una mayor cantidad de sulfatos (SO_4), un nivel de pH más bajo por lo que la bacteria crece a esas condiciones y la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) que se obtuvo fue la más alta por lo que un aumento en la concentración impulsa una mayor recuperación del metal. También se logró cuantificar la concentración de metales presentes en cada uno de los residuos y con ello conocer la cantidad de metales lixiviados por la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636.

LIMITACIONES

Al aplicar las condiciones de temperatura y densidad poblacional adecuadas a los residuos y realizar la digestión ácida de las muestras obtenidas en el digestor de microondas algunas de ellas no pudieron digerirse o disolverse totalmente ya que puede ser que algunas de ellas contengan materia orgánica por lo que la digestión de esas muestras se realizaron en autoclave.

7 FUNDAMENTO TEORICO

7.1 Generación de residuos a nivel nacional.

La industrialización presente en México trajo consigo la realización de diferentes actividades productivas es por ello que se requirió un abastecimiento de materias primas para la producción de bienes y servicios, por lo que hubo un crecimiento de algunas industrias, pero también propicio a que hubiera un incremento en la generación de residuos.

La palabra residuo es definido por la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) como aquel material o producto cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentra en estado sólido o semisólido, o es un líquido o gas contenido en recipientes o depósitos, y que puede ser susceptible de ser valorizado o requiere sujetarse a tratamiento o disposición final conforme a lo dispuesto en dicha ley y demás ordenamientos que de ella deriven (Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, 2015).

Todos los residuos que se generan de acuerdo a sus características se pueden clasificar en: a) residuos sólidos urbanos (RSU), b) residuos de manejo especial (RME) y c) residuos peligrosos (RP) (Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, 2015).

De acuerdo con la LGPGIR se define a estos tipos de residuos como:

a) Residuos sólidos urbanos (RSU)

Son aquellos generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes o empaques; los residuos que provienen de cualquier otra actividad dentro de establecimientos o en la vía pública que genere residuos con características domiciliarias, y los resultantes de la limpieza de las vías y lugares públicos.

b) Residuos de manejo especial (RME)

Son aquellos generados en los procesos productivos, que no reúnen las características para ser considerados como peligrosos o como residuos sólidos urbanos, o que son producidos por grandes generadores de residuos sólidos urbanos.

c) Residuos peligrosos (RP)

Son aquellos que poseen alguna de las características CRETIB : corrosividad, reactividad, explosividad, toxicidad, inflamabilidad, o que contengan agentes infecciosos que les confieran peligrosidad, así como envases, recipientes, embalajes y suelos que hayan sido contaminados cuando se transfieran a otro sitio. El manejo de los residuos peligrosos es responsabilidad del Gobierno Federal a través de la SEMARNAT.

7.2 Problemática ambiental ocasionada por residuos contaminados por metales

Existen algunos tipos de residuos que se encuentran contaminados por metales como son lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales, componentes automotrices, pilas, electrodomésticos, etc. La exposición de metales pesados causa serios problemas en el ambiente como la degradación en la vegetación, ríos, animales e incluso puede provocar daños en el ser humano. Hay muchos metales contaminantes, algunos ejemplos son Plomo, Mercurio, Bario, Cobre, Cadmio, Níquel, Estaño, entre otros (EroskiConsumer, 2001).

En las industrias, empresas y en la vida cotidiana se utilizan artículos o productos que para su elaboración se emplean algunos metales, por lo que cuando estos artículos terminan su vida útil o simplemente ya no se requiere de ellos se convierten en un residuo. Y estos residuos pueden provocar daños ambientales ya que generan contaminación por metales.

1.2.1 Clasificación de los metales

Los metales se pueden clasificar de acuerdo a sus características como son densidad, color y resistencia. Pero como el hierro es un metal que ha sido más utilizado, los metales suelen clasificarse en ferrosos y no ferrosos.

- **Metales Ferrosos:**

Los metales ferrosos son aquellos en el que su principal componente es el hierro, un ejemplo es el acero. Este tipo de metales es el más empleado debido a que presenta un bajo costo para su extracción y obtención.

A continuación, se nombran algunos ejemplos:

- Hierro dulce o hierro forjado; su contenido de carbono es inferior al 0.03%, se oxida fácilmente y es un material blando.
- Aceros; su contenido de carbono oscila entre 0.03 y 1.76%, se oxidan, son un poco más duros, son dúctiles y maleables
- Fundiciones; tiene un contenido de carbono entre 1.76 y 6.67%, es más duro al tener mayor contenido de carbono.

- **Metales no Ferrosos:**

Los metales no ferrosos son aquellos metales y aleaciones que no contienen hierro en su composición o es muy escaso, tienen una mayor resistencia a la corrosión, pero cuentan con poca resistencia mecánica y son blandos.

Los metales no ferrosos se clasifican de acuerdo a su densidad en:

- A) *Metales no ferrosos pesados*: son aquellos en la que su densidad es igual o mayor a 5 gr/cm³. Se pueden encontrar el cobre, estaño, plomo, níquel, cinc, cromo y cobalto.
- B) *Metales no ferrosos ligeros*: son aquellos que tienen una densidad entre 2 y 5 gr/cm³. En esta clasificación se encuentran el aluminio y el titanio.
- C) *Metales no ferrosos ultraligeros*: su densidad es menor a 2 gr/cm³ y se puede encontrar al magnesio.

7.3 Legislación

En nuestro país se ha desarrollado la creación de normas, leyes, así como algunas instituciones que se encargan de vigilar y hacer que se cumpla con los puntos establecidos en el manejo y control de residuos y con ello evitar que se ocasionen daños tanto al medioambiente como a la salud de los seres humanos. A continuación, se presentan algunas leyes y normas que rigen a los residuos.

Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR)

La cual es reglamentaria de las disposiciones de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos que se refieren a la protección al ambiente en materia de prevención y gestión integral de residuos, en el territorio nacional.

Sus disposiciones son de orden público e interés social y tienen por objeto garantizar el derecho de toda persona al medio ambiente sano y propiciar el desarrollo sustentable a través de la prevención de la generación, la valorización y la gestión integral de los residuos peligrosos, de los residuos sólidos urbanos y de manejo especial; prevenir la contaminación de sitios con estos residuos y llevar a cabo su remediación.

NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004:

Establece criterios para la caracterización y determinación de concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio, vanadio y sus compuestos inorgánicos; así como los criterios de remediación.

Esta Norma es de observancia obligatoria para todas aquellas personas físicas y morales que deban determinar la contaminación de un suelo con materiales o residuos que contengan arsénico, bario, berilio, níquel, plata, plomo, cromo hexavalente, mercurio, níquel, selenio, talio, vanadio y sus compuestos inorgánicos.

NOM-052-SEMARNAT-2005:

Esta Norma Oficial Mexicana establece el procedimiento para identificar si un residuo es peligroso, el cual incluye los listados de los residuos peligrosos y las características que hacen que se consideren como tales.

Los residuos peligrosos, en cualquier estado físico, por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, inflamables, tóxicas, y biológico-infecciosas, y por su forma de manejo pueden representar un riesgo para el equilibrio ecológico, el ambiente y la salud de la población en general, por lo que es necesario determinar los criterios, procedimientos, características y listados que los identifiquen.

Los avances científicos, tecnológicos y la experiencia internacional sobre la caracterización de los residuos peligrosos han permitido definir como constituyentes tóxicos ambientales, agudos y crónicos a aquellas sustancias químicas que son capaces de producir efectos adversos a la salud o al ambiente.

NOM-141-SEMARNAT-2003:

Establece las especificaciones para la caracterización del jal y la caracterización del sitio, así como los criterios para la mitigación de los impactos ambientales por la remoción de la vegetación para el cambio de uso de suelo. Asimismo, señala especificaciones y criterios ambientales para las etapas de preparación del sitio, proyecto, construcción, operación post-operación de presas de jales, y para el monitoreo.

7.4 Tratamiento de materiales contaminados con metales.

Existen algunos tratamientos físicos, químicos y biológicos que se emplean para tratar la contaminación por metales. Estos son:

-Tratamientos físicos y químicos:

- Precipitación:
- Solidificación:
- Electrocínética:

7.5 Métodos Biológicos empleados para el tratamiento de metales No ferrosos

Debido al mal manejo y control de los metales, esto constituye un crecimiento en la contaminación ambiental lo cual se ha convertido en una problemática mundial. Estos

metales representan una amenaza biológica ya que no son biodegradables. Existen microorganismos que cuentan con un sistema genético que les ayudan a contrarrestar los efectos tóxicos de los metales ya que pueden sobrevivir a grandes concentraciones de estos.

Para tratar los residuos por metales se requiere del empleo de algunos microorganismos a continuación se menciona algunos de los mecanismos de tolerancia/resistencia que tienen las bacterias a metales.

- **Quelación:**

Emplea agentes generados por microorganismos que tienen la capacidad de formar complejos estables con metales. Su uso ofrece un enfoque prometedor para la extracción de los metales.

- **Biosorción:**

Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación, ya que no requiere el agregado de nutrientes al sistema, al no requerir un metabolismo microbiano activo (Vullo, 2003).

- **Bioprecipitación:**

La bioprecipitación es una metodología en que se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan los metales. Dentro de estos microorganismos, se destacan fundamentalmente los microorganismos sulfato-reductores que, bajo condiciones de anaerobiosis, son capaces de reducir el sulfato a sulfuro, utilizando compuestos orgánicos sencillos como dadores de electrones (Willis, 2016).

- **Biomíneralización:**

Los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionúclidos como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico

presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H^+ hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado (Vullo, 2003). Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular.

- Bioacumulación:

Involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H^+ -ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonasaeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccaromycescerevisiae*(Vullo, 2003).

- Biotransformación:

Es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Vullo, 2003).

- Quimiosorción:

Se pueden describir aquella clase de reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización. Un ejemplo de este proceso es el agregado de Fe en un efluente a tratar, en presencia de bacterias reductoras del sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de FeS, sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS formado como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe,

pueden separarse fácilmente de la fase soluble, descontaminando así el material (Vullo, 2003).

- **Biolixiviación:**

Es una técnica que disuelve metales en un medio acuoso. Estas bacterias se alimentan de azufre o arsénico. Las bacterias pueden oxidar azufre a ácido sulfúrico y el arsénico a una especie inofensiva para el ser humano (Vullo, 2003). Los tratamientos biológicos, emplean microorganismos o sub-productos de ellos para reducir o eliminar la toxicidad del metal. A continuación, se nombran los microorganismos empleados en este tipo de tratamientos.

Tabla 1. Condiciones de crecimiento de los microorganismos

Microorganismo	Fuente energética	pH	Temperatura (°C)
<i>Thiobacillusferrooxidans</i>	Fe ⁺² , U ⁺⁴ , S ⁰	1.5	25-35
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S ⁰	2.0	25-35
<i>Leptospirillumferrooxidans</i>	Fe ⁺²	1.5	25-35
<i>Sulfolobus</i>	S ⁰ , Fe ⁺² , C orgánico	2.0	> a 60
<i>Acidiphiliumcryotum</i>	C orgánico	2.0	25-35
<i>T. intermedius</i>	S ⁰ , S ⁻² , C orgánico	2.5	30
<i>T. acidophilus</i>	S ⁰ , S ⁻²	3.0	
<i>Thiobacillus TH2 y TH3</i>	Fe ⁺² , S ⁻²	6.0	50
<i>Heterótrofos</i>	C orgánico		25-40

(Guerrero, 1994).

7.6 Reportes de trabajos con cultivos sulfooxidantes

A continuación, se mencionan algunos trabajos en los que se ha empleado las bacterias *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans*.

Se estudió la biolixiviación de pirita por un cultivo puro de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y por un consorcio de cepas nativas provenientes de la solución lixivante de pilas de biolixiviación de Minera Escondida (PLS). El estudio se efectuó con una muestra de pirita purificada y de fina granulometría, la cual fue lixiviada en reactores de frascos agitados

(Stavelot, 2009). Se han realizado estudios sobre el aislamiento e identificación de bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes del área minera de Riotinto para determinar su participación en el mantenimiento de las condiciones de acidez y concentración de metales, que le dan a este hábitat el calificativo de "ambiente extremo" y del que, en gran medida, las bacterias quimiolitautótrofas identificadas en el este trabajo son responsables directas (Segura Pachón, 1998). Se han realizado estudios sobre la secuencia del genoma de *A. thiooxidans*, encontrando que el genoma de *A. thiooxidans* A01 contiene enzimas claves para la oxidación de azufre elemental y RISCs (Compuestos inorgánicos de azufre reducidos) como: dioxigenasa de azufre (SDO), quinona sulfuro reductasa (SQR), tiosulfato: quinonaoxidoreductasa (TQO), Tetrionato hidrolasa (TET), Proteínas del sistema de oxidación de azufre y sus componentes asociados al transporte de electrones (SOx). Además, se detectó el gen oxigenasa de azufre reductasa (sor) así como otra vía putativa que se encuentra en el citoplasma de *A. thiooxidans* que cataliza la oxidación de sulfito a sulfato por la fosfo-adenosina fosfosulfatoreductasa (PAPS) y adenil-sulfato quinasa (APS). Otro estudio evaluó las condiciones físico-químicas y de operación en el crecimiento y la actividad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Govender et al., 2015). Los factores estudiados incluyen el tamaño del inóculo, condiciones de cultivo de inóculo, la disponibilidad de hierro ferroso en solución y la concentración de cobre en la solución. . Una comparación de las pruebas con diferentes tamaños de inóculo mostró que un tamaño de inóculo más pequeño resultó en un aumento del retraso en el crecimiento microbiano y la oxidación de hierro ferroso. En el cultivo crecido mediante pirita, hubo poca actividad microbiana con respecto al cultivo crecido en el hierro ferroso. Este estudio destaca que la concentración de inóculo que se emplea es importante ya que dependiendo del tamaño de inóculo se aumenta o disminuye la actividad microbiana. Se han realizado estudios de biolixiviación de minerales sulfurosos de bajo grado proveniente de una mina aurífera (que contiene oro), localizada en el municipio de Marmato en Caldas, antes y después de un proceso de biolixiviación en el que se empleó un cultivo bacteriano de la mina (compatible con *Thiobacillus ferrooxidans*) para medir la efectividad del mismo. Para los ensayos realizados se empleó un biorreactor y se consideraron diferentes relaciones líquido/sólido, para estimar variables como población bacteriana, pH, agitación, potencial de oxidorreducción, temperatura y tiempo. Los resultados demostraron una eficiencia máxima

del 95%, lo que significa un incremento del 8% de recuperación en relación con el tratamiento único por cianuración.

Para la recuperación de metales no ferrosos el potencial de usar *Acidithiobacillus thiooxidans* es que de acuerdo a los estudios realizados esta bacteria puede crecer o desarrollarse en condiciones de acidez alta y en concentraciones de metales, además de que se alcanza una mayor actividad microbiana en tamaños de inóculos más grandes. Otros estudios llevados a cabo sobre la biolixiviación con bacterias compatibles demuestran que se puede alcanzar una eficiencia de 95% de lixiviación de metales.

Lo que se evaluará en este proyecto de investigación es el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 26636 para poder establecer las condiciones óptimas para su crecimiento o desarrollo, por lo que se hará determinaciones de la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4), producción de sulfatos (SO_4) y disminución de pH. También se evaluará la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de crecer en presencia de residuos no ferrosos una vez establecidas las condiciones óptimas de crecimiento, esto se llevará a cabo mediante la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4), producción de sulfatos (SO_4) y nivel de pH. Y finalmente se evaluará la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* de lixiviar metales contenidos en los residuos no ferrosos.

8 METODOLOGIA

8.1 Microorganismo utilizado.

Para la realización del proyecto se empleó la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* AZCT-M125-5 aislada de una muestra proveniente de la zona Parque Nacional los Azufres, en la ciudad de Hidalgo del estado de Michoacán de Ocampo, México, con la capacidad de oxidar azufre a ácido sulfúrico a concentraciones de 1 a 9% (w/v) de azufre elemental y pH entre 3 y 7 (Rojas Avelizapa et al., 2013) y una velocidad de remoción de azufre de 0.185 mg S g⁻¹h⁻¹ al emplear una densidad de pulpa del 16 % (w/v) de un residuo industrial contaminado con azufre (Gómez Ramírez et al., 2014). El cultivo fue depositado ante la autoridad Internacional de depósito de material biológico Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) por lo que es codificado actualmente como *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 26636.

8.2 Medio de cultivo Starkey.

El medio de cultivo empleado fue medio Starkey modificado cuya composición en g/L es la siguiente: fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 3 g, sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) 0.2 g, sulfato de magnesio hepta-hidratado (MgSO₄.7H₂O) 0.5 g, cloruro de calcio di-hidratado (CaCl₂.2H₂O) 0.3 g, sulfato de hierro hepta-hidratado (FeSO₄.7H₂O) 0.01 g, molibdeno a 30 ppm (75 mg) y azufre elemental (S⁰) al 1% (w/v), ajustando el pH a 3 con ácido sulfúrico (H₂SO₄) y esterilizado a 10 lb durante 20 minutos (Rojas Avelizapa et al., 2013).

8.3 Preparación y ajuste de inóculo.

Se inoculó la bacteria *A. thiooxidans* DSM 26636 en matraces de 250 ml, el cual contenía 50 ml de medio Starkey modificado más azufre (S⁰) al 1 % (w/v). Posteriormente los matraces fueron colocados en la incubadora a 30°C, 150 rpm durante 72-96 horas, con la finalidad de tener células metabólicamente activas y en fase exponencial. Transcurrido el tiempo se realizó conteo de células empleando una cámara de Neubauer y un microscopio de campo luminoso (ZEISS) para llegar a una densidad poblacional de 3X10⁷ UFC/ml y 2X10⁸ UFC/ml, empleando medio Starkey fresco a pH 3.0.

8.4 Efecto del tamaño de inóculo y temperatura sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 26636.

Con la finalidad de conocer de que, forma afecta la temperatura y tamaño de inóculo la capacidad de oxidar azufre elemental a ácido sulfúrico (agente bio-lixiviante empleado para la lixiviación de metales) por *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 26636. Se realizaron estudios cinéticos durante 7 días a las temperaturas de 20, 25, 30, 35 y 40 °C empleando en cada temperatura dos tamaños de inóculo (3X10⁷ UFC/ml y 2X10⁸ UFC/ml). Para tal fin se emplearon cultivos metabólicamente activos para obtener los inóculos como se mencionó en el rubro (5.3). De cada inóculo se sembraron matraces de 125 mL conteniendo 30 mL de medio Starkey modificado a pH 3.0 con el 10 % del volumen nominal (3 mL) de cada inóculo y se dejaron incubar a 30°C, 150 rpm durante 7 días, cada 24 horas se tomaron 1 mL de muestras de los matraces y fueron colocados en tubos Eppendorf los cuales se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min, y guardados en refrigeración, al final de los siete días todo el contenido del matraz fue colectado en tubos Falcón de 50 mL y centrifugados a 6000 rpm durante 7 min, el contenido fue vertido en tubos de vidrio de 50 mL, con tapón de rosca y guardados en refrigeración hasta su uso, las muestras tomadas cada 24 horas se les determino la concentración del ion sulfato, la muestra colectada al día 7 se determinó además de sulfatos el pH y la concentración de ácido sulfúrico para de esta manera determinar el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *A. thiooxidans*.

8.5 Determinación del ion sulfato

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-K-436-1977 “Determinación del ion sulfato en muestras de aguas para alimentación de calderas” se llevó a cabo la determinación de sulfatos, en donde del sobrenadante obtenido a los diferentes tiempos se tomaron cantidades de 900 µL de los controles y 800 a 100 µL de los experimentales según tiempo de incubación transcurrido, se agregaron en matraz aforado de 50 ml y se aforo con agua destilada a 50 ml. Tomando una alícuota de 25 ml de la solución el cual fue depositado a un frasco de vidrio, se agregó 1 ml de solución acondicionadora y se mezcló por medio de un

agitador magnético durante 1 minuto. Pasado el minuto, mientras se agitaba se agregó 0.075 g de cloruro de bario (BaCl_2) y a partir de este momento, se contaron 2 minutos de agitación a una velocidad constante. Después de transcurrir 2 minutos de agitación, se vertió parte de la solución a la celda del fotómetro y se midió la turbidez dentro de los 5 minutos siguientes a una longitud de onda de 425nm. Generalmente se obtiene una turbidez máxima dentro de los 2 minutos y a partir de entonces las lecturas se mantienen constantes durante 3 a 10 minutos. Las lectura de turbidez obtenidas en el espectrofotómetro fueron substituidas en la ecuación de la curva, lo cual se obtuvo a partir de una curva de calibración y de esta manera se obtuvo la concentración del ion sulfato presente. Una vez obtenido las concentraciones de los sulfatos de cada una de las muestras se realizó una gráfica para la densidad poblacional de 3×10^7 UFC/ml y 2×10^8 UFC/ml, en donde el eje x corresponde al tiempo (hrs) y el eje y corresponde a sulfatos (mg/L).

8.5.1 Solución Acondicionadora.

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-K-436-1977 se prepara la solución acondicionadora de la siguiente manera: se mezclan 50 ml de glicerina ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) con una solución que contenga 30 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl), 300 ml de H_2O , 100 ml de alcohol etílico al 95% y 75 gr de cloruro de sodio (NaCl).

8. 5.2 Curva de calibración.

Se realizó una curva de calibración para poder determinar la cantidad de sulfatos de cada fase experimental, para ello se realizaron una gama de soluciones tipo con valores de 0 a 40 mg/L de sulfatos a partir de una solución stock de sulfatos a una concentración de 100 ppm a partir de una sal de Na_2SO_4 . Para obtener los diferentes puntos de la curva se diluyeron 0.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5 y 20 ml de la solución estándar de sulfatos a 50 ml en matraces aforados usando agua destilada. Para llegar a las concentraciones del ion sulfato de 0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 35.0 y 40 mg/L respectivamente. De cada concentración se determinó la concentración del ion sulfato como se mencionó en el rubro 4.5, con los datos obtenidos se elaboró una curva tipo para de esta forma conocer la

ecuación de la recta y determinar la concentración del ion sulfato presente en los tratamientos.

8.6 Lectura de pH.

De las muestras previamente centrifugadas (5.4) y guardadas en frascos de vidrio en refrigeración, fueron atemperadas para poder realizar la medición de pH para lo cual se empleó un potenciómetro el cual se calibra con un buffer de pH 7 y posteriormente con un buffer de pH 4. Para posteriormente medir el pH del contenido del frasco de cada uno de los tratamientos al tiempo final.

8.7 Determinación de la concentración de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

La concentración de ácido sulfúrico se midió a través de una titulación. La técnica requiere la utilización de 20 mL de la muestra, la cual se depositan en un matraz de 125 ml, posteriormente se añade una gota de azul de Bromotimol como indicador acido-base, como solución neutralizadora se adiciona NaOH a una concentración de 0.5M, gota a gota agitando el matraz hasta que éste vire a un tenue color azul, se anotan los mL gastados de NaOH y en base a una formula se conoce la concentración Molar de ácido sulfúrico.

La fórmula empleada para conocer la concentración de ácido sulfúrico es la siguiente.

$$\text{Molaridad de } H_2SO_4 = \frac{(M - NaOH)(V - NaOH)}{2(V - H_2SO_4)} * \text{Dilución}$$

Donde:

$M - NaOH$: Molaridad del NaOH

$V - NaOH$: Volumen gastado del NaOH

$V - H_2SO_4$: Volumen de la muestra

Una vez obtenida la concentración de ácido sulfúrico (H₂SO₄) se procedió a realizar una gráfica con los datos.

8.8 Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 26636 de crecer en presencia de residuos NO ferrosos.

Para tal fin se prepararon matraces de 125 ml conteniendo 30 ml de medio Starkey modificado y azufre al 1% (w/v) más el residuo a evaluar al 1%. Por cada residuo se incluyó un control abiótico y tres matraces experimentales correspondientes a los días 7, 14 y 21 días. Cada matraz fue inoculado con 3 mL (1 %) de un cultivo de *A. thiooxidans* DSM 26636 ajustado a una densidad poblacional de 2×10^8 UFC/ml. Posteriormente los matraces fueron colocados en la incubadora a 30°C y 150 rpm. A los 7, 14 y 21 días se procesó un matraz experimental por cada residuo, y el matraz control se procesó al día 21. El contenido de cada matraz fue colocado en un tubo falcón y centrifugado a 6,000 rpm durante 7 minutos. El sobrenadante se colocó en frascos de vidrio y se almaceno en refrigeración hasta su uso. La pastilla de cada tratamiento contenida en el tubo Falcón se dejó secar a 30°C en un horno (BINDER). Del sobrenadante de cada tratamiento se realizó la medición de pH (Rubro 4.8), la determinación del ion sulfato (Rubro 4.5) y la técnica de titulación para conocer la concentración de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Rubro 4.9). Los sólidos del tiempo 21 una vez secos tanto en los tratamientos como en el control abiótico fueron tratados con tetrahidrofurano (THF) de 15 a 30 mL para solubilizar el azufre residual, la pastilla fue nuevamente puesta a secar a 50°C para eliminar el THF residual. Las muestras sólidas y líquidas de los tratamientos y control abiótico fueron digeridas en el Microwave Pro AntonPaar y posteriormente analizadas en el Spectrometro de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) para conocer el contenido metálicos de las muestras antes y después del tratamiento biológico.

8.9 Digestión de muestras y cuantificación de metales mediante ICP-OES.

Para la digestión de las muestras, tanto el líquido filtrado como el sólido seco fueron sometidos a un proceso de digestión ácida en el cual se utilizó de 10 a 20 mg del sólido seco y 1000 µL del filtrado líquido, estos se colocaron en liner F100 TFM para digestión y se adicionan 6 mL de ácido nítrico (HNO₃) y 2 de ácido clorhídrico (HCl), el proceso de

digestión se realizó utilizando un equipo de microondas Microwave Pro AntonPaar con las condiciones que se presentan en las tablas 13 y 14.

Tabla 2. Condiciones de digestión ácida Microwave Pro (Digestión líquida)

Condición	No. Vasos	
		4
Potencia (W)	400	800
Presión (bar)	40	40
Tipo de rotor	HF 100	
Temperatura (°C)	210 – 240 °C	
pRate	0.3 bares /seg	
Rampa	15 min	
Hold	15 min	
Cooling	15 min	

Tabla 3. Condiciones de digestión ácida Microwave Pro (Digestión sólida)

Condición	No. Vasos	
		4
Potencia (W)	400	800
Presión (bar)	40	40
Tipo de rotor	HF 100	
Temperatura (°C)	210 – 240 °C	
pRate	0.3 bares /seg	
Rampa	15 min	
Hold	30 min	
Cooling	15 min	

Para las muestras que posiblemente contenían materia orgánica las digestiones se realizaron en autoclave empleando tubos de teflón y una mezcla de ácido nítrico: ácido clorhídrico en

una relación 3:1 a una temperatura de 121°C manteniendo dicha temperatura durante una hora.

Al final de la digestión las muestras de ser necesario se filtraron con filtros de celulosa de 0.2 µm y se aforaron a 100 mL. Por último se depositaron en frascos de plástico para su posterior análisis cuantitativo y cualitativo en el ICP-OES con diferentes longitudes de onda para cada elemento. La concentración de los elementos se calcularon en base a una curva de calibración de 0.25-6 ppm usando un estándar comercial (High-Purity) Cat. #ICP-200.7-6. La lectura de los metales se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Varian modelo 710-ES) con las siguientes longitudes de onda (nm): Al (396.152), As (188.980), Cd (214.439), Cr (267.716), Cu (327.395), Fe (238.204), Mg (279.553), Mo (202.032), Ni (231.604), P (213.618), Pb (220.353), V (292.401), Zn (213.857). Otro estándar comercial que se empleo es (High-Purity) Cat. #ICP-MS-68A-C, la lectura de los metales se llevó a cabo con las siguientes longitudes de onda (nm): Au (242.794), Ir (224.268), Os (225.585), Pd (340.458), Pt (214.424), Rh (343.488), Ru (267.876). Y con el estándar comercial (High-Purity) Cat. #ICP-MS-68^a la lectura de los metales se realizó con las longitudes de onda (nm): Ti (336.122), W (207.912).

9 RESULTADOS

9.1 Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636.

Para evaluar el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *A. thiooxidans* DSM26636, se realizaron estudios cinéticos durante 7 días a las temperaturas de 20, 25, 30, 35 y 40 °C empleando en cada temperatura dos tamaños de inóculo (3×10^7 UFC/ml y 2×10^8 UFC/ml). A las muestras tomadas cada 24 horas se les determinó la concentración del ion sulfato, la muestra colectada al día 7 se determinó además de sulfatos el pH y la concentración de ácido sulfúrico para de esta manera determinar el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *A. thiooxidans*. Con la determinación del ion sulfato se puede evaluar de manera indirecta el crecimiento del cultivo ya que este organismo crece y sobrevive mediante la utilización de la energía derivada de la oxidación de azufre, que mediante diferentes reacciones se produce sulfato como producto final de la oxidación de azufre, el cual esta como H_2SO_4 (Yin et al., 2014). Por lo cual que se mide el nivel de pH ya que si este presenta una reducción nos indica que se está produciendo el ácido sulfúrico y hay actividad microbiana. El ácido sulfúrico producido se determina mediante una reacción de titulación para de esta forma conocer la concentración del ácido el cual es el agente lixivante que es empleado para la movilización de metales (Yin et al., 2014). Los resultados obtenidos a 20 °C se muestran en Figura 1(a, b, c). En el caso de la producción de sulfatos incrementa conforme transcurren los días encontrando la máxima producción del ion sulfatos al día 6 (144 h) con valores de 7,874 mg/L y 11,041 mg/L para las densidades poblacionales de 3×10^7 y 2×10^8 UFC/mL respectivamente, al día 7 (168 h) la producción del ion sulfato se mantuvo sin cambios en ambas densidades poblacionales. Para el caso del pH este descendió de 3.05 a valores de 1.36 y 1.25 unidades respectivamente en la densidad poblacional de 3×10^7 UFC/mL y 2×10^8 UFC/mL. En el caso de la concentración de ácido sulfúrico se obtuvieron concentraciones finales de 0.179 M y 0.218 M respectivamente para cada densidad poblacional. Por lo que en base a los resultados de concentración de sulfatos, descenso de pH y concentración de ácido sulfúrico

al final de la cinética la densidad poblacional de 2×10^8 UFC/mL fue en la que obtuvieron los mejores resultados.

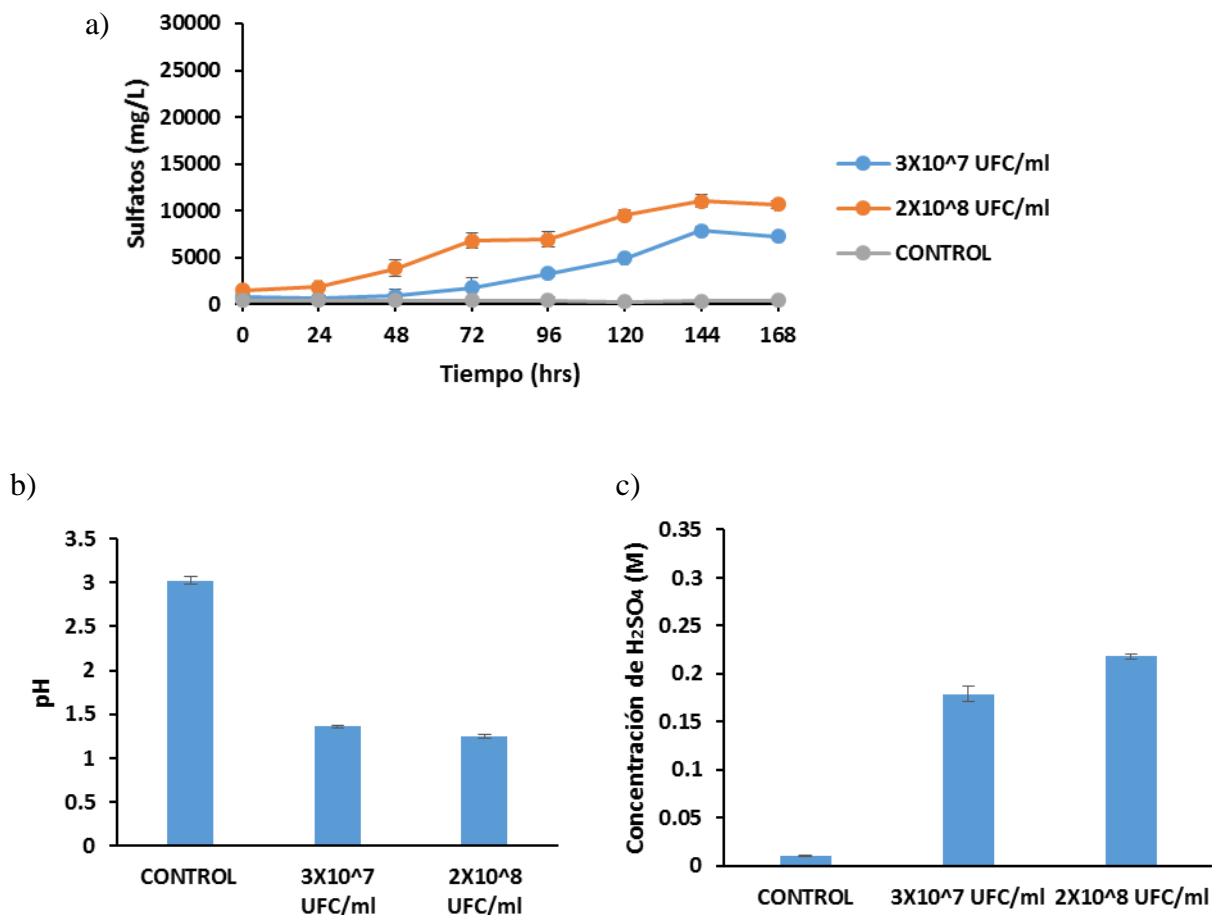


Figura 1. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636. Crecido en medio Starkey modificado más azufre elemental al 1 % a 20°C, 150 rpm durante 7 días. Se determinó: a) Sulfatos b) pH y c) Concentración de H₂SO₄.

En el caso de la temperatura de 25 °C los resultados se muestran en la Figura 2(a, b, c), como se puede observar la producción del ion sulfatos incrementa de manera gradual al paso del tiempo en la densidad poblacional de 2×10^8 UFC/mL llegando a valores máximos al día 7 (168 h) de 27,975 mg/L, en la caso de la densidad poblacional de 3×10^7 UFC/mL se obtuvo la máxima producción al día 7 (168 h) con valores de 17, 665 mg/L, sin embargo desde el día 5 al día 7 la producción del ion sulfato se mantuvo casi constante. Referente al pH este disminuyó de 2.99 unidades a 1. 41 y 1.29 respectivamente en las densidades

poblacionales de 3×10^7 UFC/mL y 2×10^8 UFC/mL. En lo que respecta a la concentración H_2SO_4 se obtuvieron concentraciones de 0.229 M y 0.267 M respectivamente para las densidades poblacionales de 3×10^7 UFC/mL y 2×10^8 UFC/mL. Por lo que nuevamente a una mayor densidad poblacional se observa una mayor producción de sulfatos, mayor descenso de pH y mayor concentración de ácido sulfúrico.

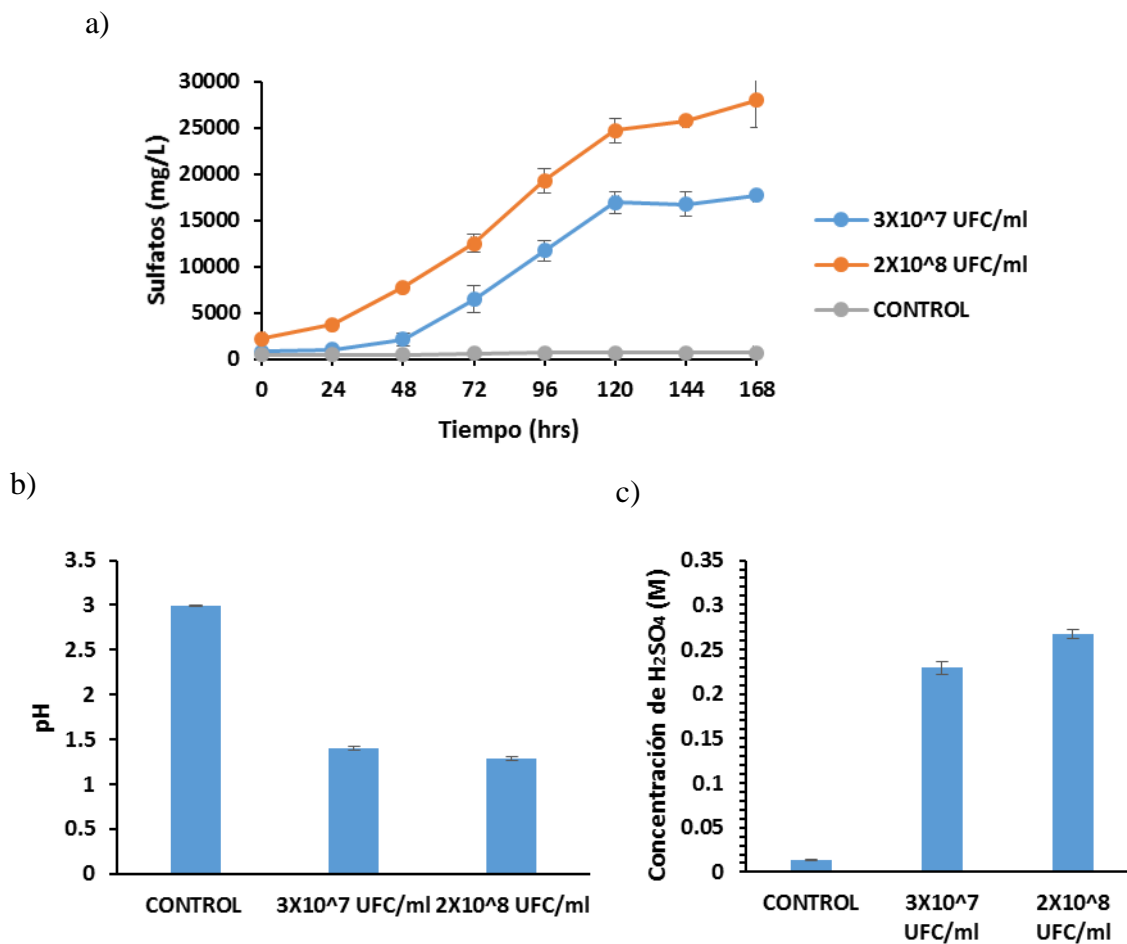
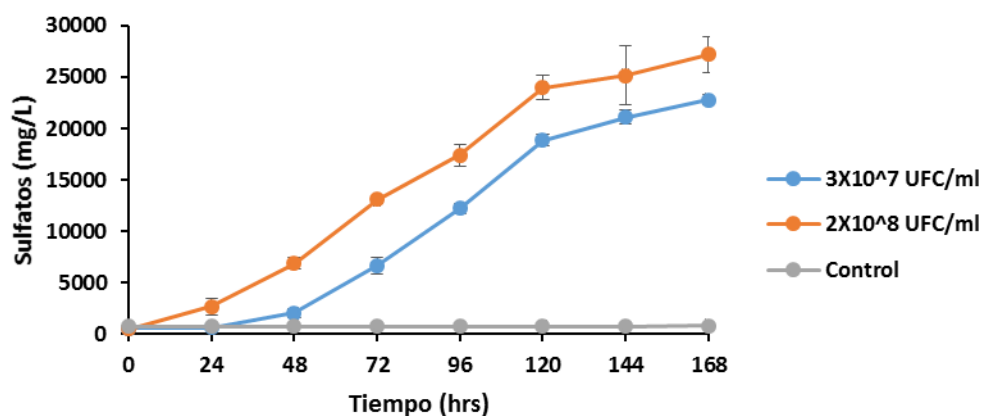


Figura 2. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636. Crecido en medio Starkey modificado más azufre elemental al 1 % a 25°C, 150 rpm durante 7 días. Se determinó: a) Sulfatos b) pH y c) Concentración de H_2SO_4 .

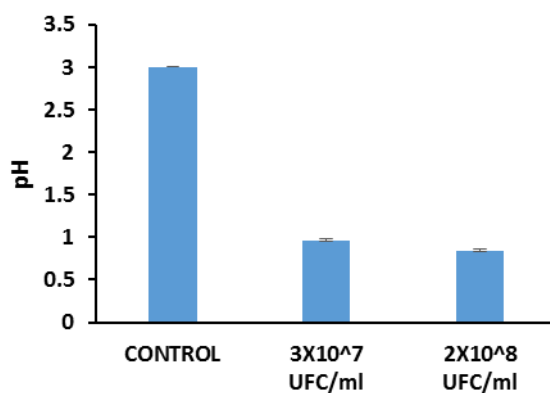
En la Fig. 3 (a, b, c) se muestran los resultados para la temperatura de 30°C, como se puede observar en ambas densidades poblacionales la concentración del ion sulfato va aumentando respecto al tiempo llegando a valores máximos al día 7 (168 h) de 22,804 mg/L en la densidad poblacional de 3×10^7 UFC/mL y de 27,196 mg/L para la densidad poblacional de 2×10^8 UFC/mL. Con respecto al pH este descendió en ambos casos con

valores de 3 a 0.96 y 0.85 unidades para la densidad poblacional de 3×10^7 UFC/mL y 2×10^8 UFC/mL respectivamente por lo tanto la concentración de H_2SO_4 fue mayor en 2×10^8 UFC/mL que en 3×10^7 UFC/mL obteniendo una concentración de 0.3 M y 0.266 respectivamente. Nuevamente el mejor resultado encontrado para la oxidación de azufre fue en la densidad de 2×10^8 UFC/mL.

a)



b)



c)

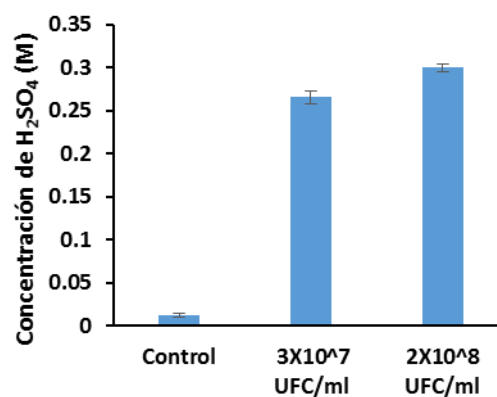
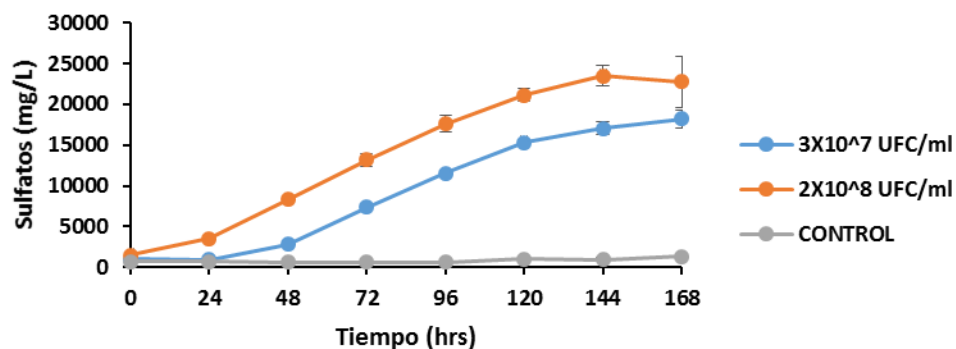


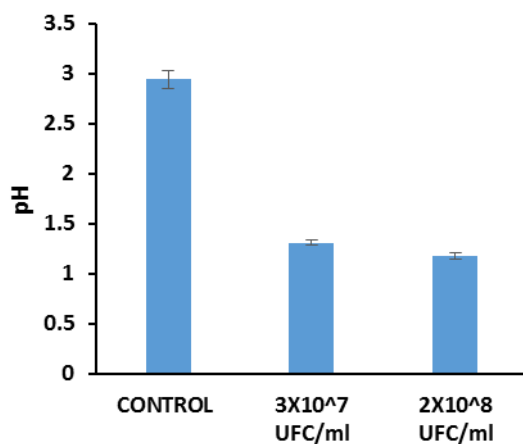
Figura 3. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636. Crecido en medio Starkey modificado más azufre elemental al 1 % a 30°C, 150 rpm durante 7 días. Se determinó: a) Sulfatos (SO₄) b) pH y c) H₂SO₄.

Para la temperatura de 35°C, los resultados se muestran en la Figura 4 (a, b, c). En el caso de la producción de sulfatos esta va en aumento conforme transcurre el tiempo, con valores máximos de 23,500 mg/L al día 6 (144h) al cual se mantuvo casi constante al día 7 en la densidad poblacional de 2×10^8 UFC/mL, para la densidad poblacional de 3×10^7 se alcanzó la máxima concentración de 18,236 mg/L del ion sulfato al día 7. Con respecto al pH en este se observó un descenso de 2.94 a 1.31 y 1.18 unidades para las densidades poblacionales de 3×10^7 UFC/mL y 2×10^8 UFC/mL respectivamente. Por lo tanto la mayor concentración de H_2SO_4 se presentó en la densidad poblacional de 2×10^8 UFC/mL con una concentración de 0.238 M y de 0.212 M para 3×10^7 UFC/mL. Nuevamente los mejores resultados obtenidos se observaron en la mayor densidad poblacional (2×10^8 UFC/mL).

a)



b)



c)

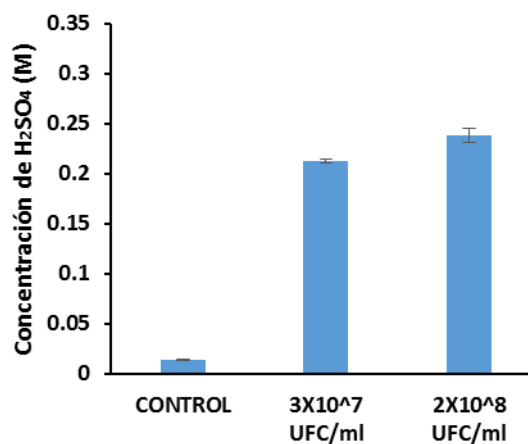
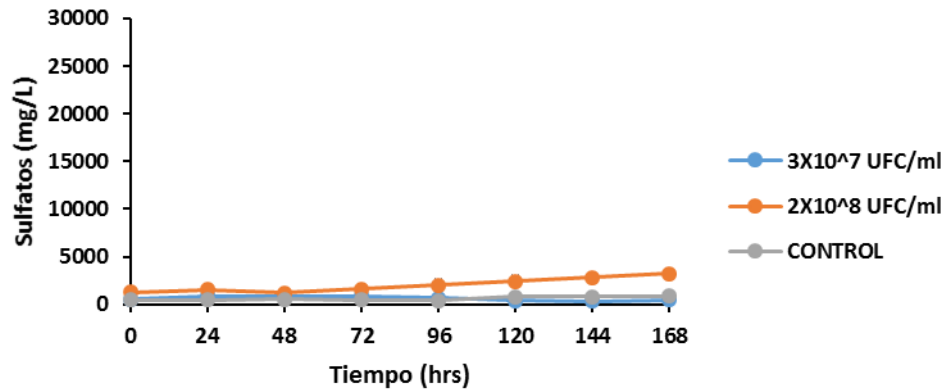


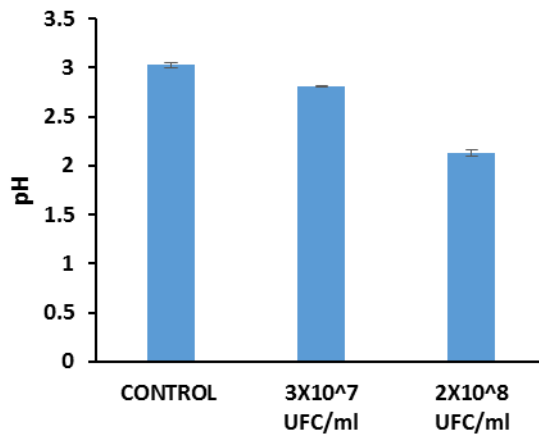
Figura 4. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636. Crecido en medio Starkey modificado más azufre elemental al 1 % a 35°C, 150 rpm durante 7 días. Se determinó: a) Sulfatos (SO_4) b) pH y c) H_2SO_4 .

Los resultados obtenidos para la temperatura de 40°C se muestran en la Fig. 5 (a, b, c). Donde se puede observar una marcada disminución de la actividad sulfooxidante de *A. thiooxidans* en ambas densidades poblacionales. La producción de sulfatos para dicha temperatura es muy baja en comparación a las demás temperaturas. Para la densidad poblacional de 2×10^8 UFC/mL la mayor producción de sulfatos fue de 3,207 mg/L y de 896 mg/L para la densidad poblacional 3×10^7 UFC/mL. En el caso del pH este descendió muy poco de 3.02 a valores de 2.13 y 2.81 unidades para las densidades poblacionales de 2×10^8 UFC/mL y 3×10^7 UFC/mL respectivamente, por lo tanto la concentración de H_2SO_4 detectada en esta temperatura fue muy baja, con valores de 0.038 M y 0.019 M respectivamente para cada densidad poblacional. Esto nos lleva a que la temperatura de 40°C no favorece la actividad sulfooxidante del cultivo pues este se ve afectado, por lo cual esta temperatura sería descartada para el crecimiento del cultivo en presencia de residuos contaminados con metales.

a)



b)



c)

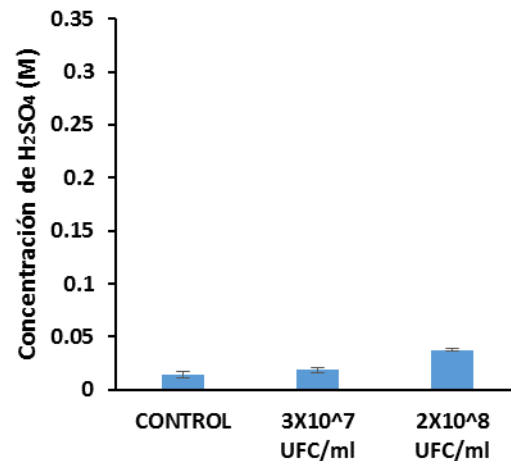


Figura 5. Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636. Crecido en medio Starkey modificado más azufre elemental al 1 % a 40°C, 150 rpm durante 7 días. Se determinó: a) Sulfatos (SO₄) b) pH y c) H₂SO₄.

A continuación en la Figura 6 (a, b, c, d) se muestran las gráficas de la concentración del ion sulfato, porcentaje de oxidación, descenso de pH y concentración de ácido sulfúrico (M), parámetros evaluador para evidenciar la actividad sulfooxidante de *A. thiooxidans* DSM26636 las cuales fueron determinadas al día 7 para cada temperatura (20, 25, 30, 35 y 40 °C) y densidad poblacional (3X10⁷ UFC/mL y 2X10⁸ UFC/mL) y de esta manera evaluar el efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *A. thiooxidans* DSM 26636 al crecer en el medio de Starkey modificado más azufre al 1 %.

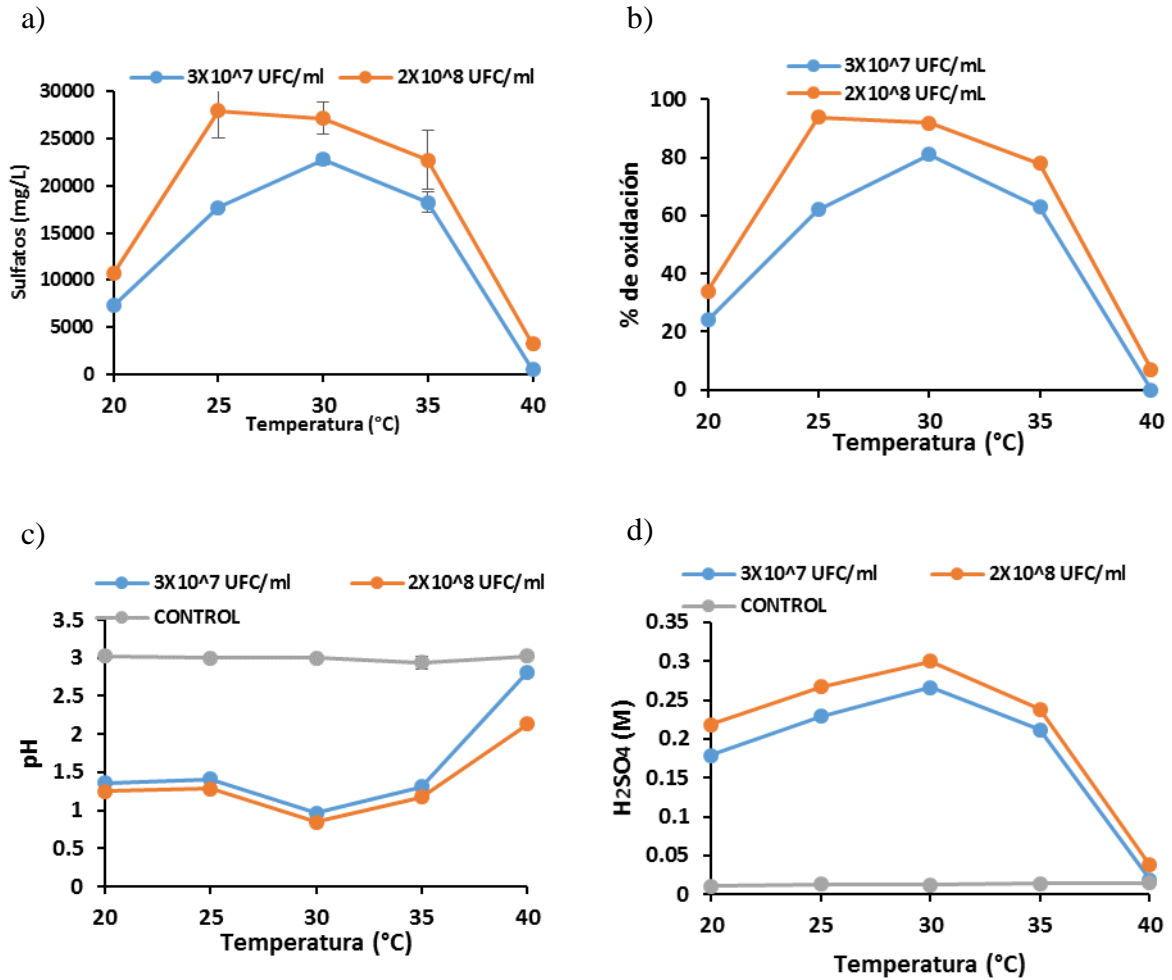


Figura 6 Efecto de la temperatura y tamaño de inóculo sobre la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636. Se determinó: a) Sulfatos (SO₄) b) Porcentaje de oxidación c) pH d) Concentración de H₂SO₄.

9.2 Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 26636 de crecer en presencia de residuos NO ferrosos bajo las condiciones óptimas de temperatura y tamaño de inóculo.

Para este fin se probaron 12 residuos los cuales están codificados como sigue: R1 (residuo de torno), R2 (residuo de fabricación de rines de automóvil), R3M1 (jal de mina), R3M2 (jal de mina), R4 (Interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado), R5 (Interior del contenido de un filtro de agua-resina), R6 (Catalizador-IMP “HDS2R”), R7

(Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”), R8 (Catalizador-IMP “CAT_US”), R9 (Escorias fundidora de Aluminio), R10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1) y R11 (Residuo regeneración metal liquido-lote 2), cuya composición metálica fue determinada por ICP. La finalidad de esta parte de la investigación fue evaluar la habilidad del cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de crecer en presencia de ellos, cada residuo fue adicionado al medio Starkey modificado a una concentración del 1 % (w/v) más azufre elemental al 1 %. Por cada residuo se incluyó un control abiótico y tres matraces experimentales correspondientes a los días 7, 14 y 21 días. Cada matraz fue inoculado con 3 mL del cultivo ajustado a una densidad poblacional de 2×10^8 UFC/mL. Posteriormente los matraces fueron colocados en la incubadora a 30°C y 150 rpm. Se realizó la medición de pH, determinación del ion sulfato y determinación de la concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) en cada tiempo. Los resultados obtenidos se muestran a continuación. En la Figura 7 (a, b, c, d) se muestran los resultados obtenidos del residuo R1 (residuos de torno) el cual contenía los siguientes metales en orden decreciente Al (591072.1 mg/Kg) > Fe (10928.6 mg/Kg) > Mg (9121.3 mg/Kg) > Cr (2716.1 mg/Kg) > Cu (1845.6 mg/Kg) > Ni (931.7 mg/Kg) > Si (340.4 mg/Kg) > Li (312.9 mg/Kg) > Zn (29.6 mg/Kg), para este residuo la máxima producción de sulfatos fue de 14,574 mg/L en el día 7, cuya producción se mantuvo casi igual al día 14 sin embargo al día 21 se observó una disminución con valores de 7,335 mg/L, en lo que respecta al pH se observó un ligero incremento en relación al sistema control de 3.37 a 4.01 en los diferentes días, lo que nos indica que en este residuo la actividad microbiana fue baja con una concentración máxima de H_2SO_4 al día 7 de 0.130 M. Como se muestra en los gráficos en este residuo se observa una muy baja actividad microbiana, siendo descartado para la siguiente etapa de la investigación. De acuerdo a la composición metálica uno de los metales que pudo haber afectado el crecimiento de la bacteria es el Aluminio debido a la toxicidad de este ya que es uno de los factores que perjudica el crecimiento de bacterias (Campillo et al., 2005) y como se puede observar dicho metal es el mayor componente de este residuo además de que fue el residuo que presento una mayor concentración de aluminio en relación a los residuos donde hubo actividad microbiana.

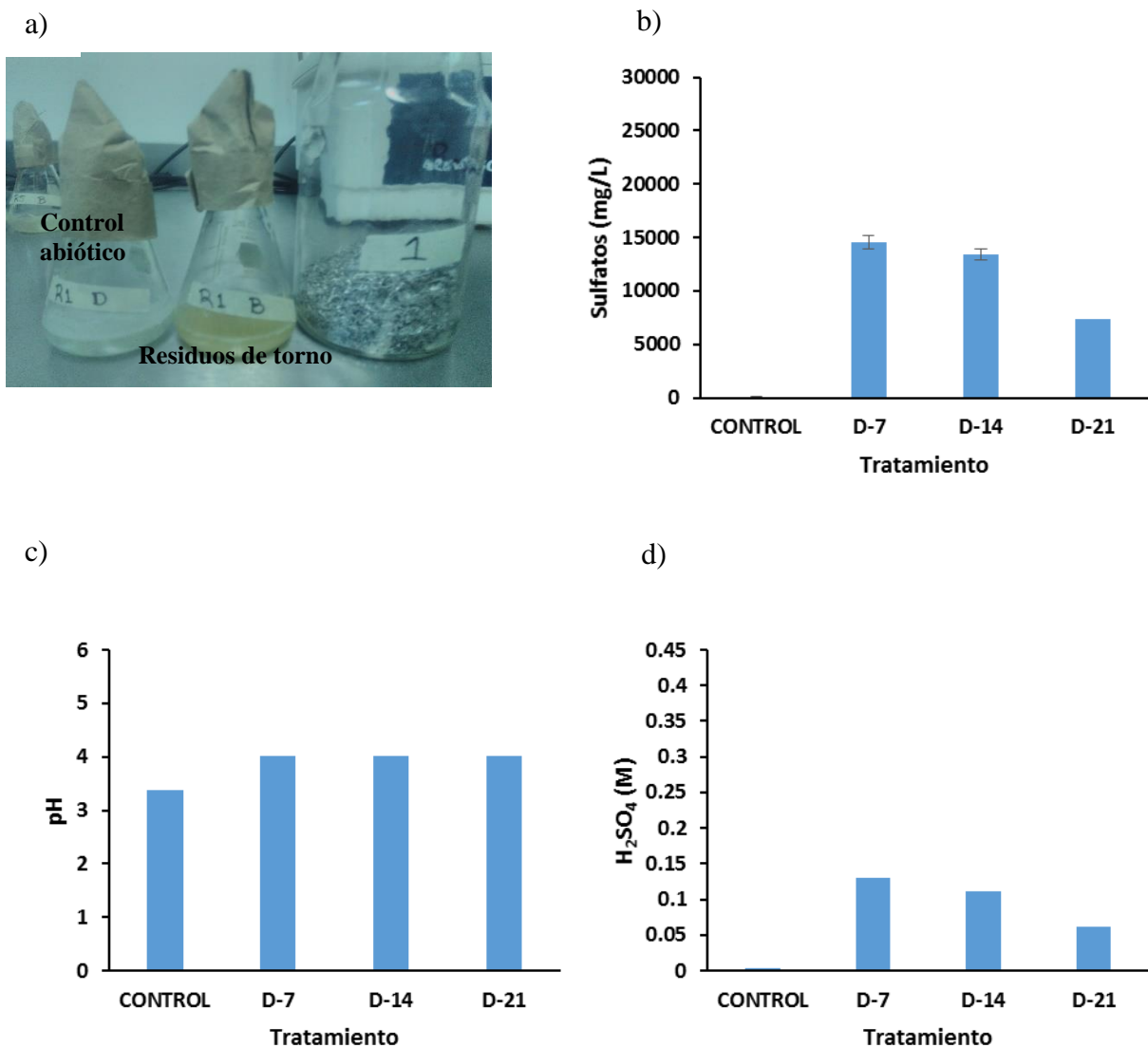


Figura 7. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-1 (Residuo de Torno) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo de torno b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

Los resultados obtenidos del residuo R2 (residuo fabricación de rines de automóvil) se muestran en la Figura 8 (a, b, c, d), este residuo contenía los siguientes metales en orden decreciente Al (563542.3 mg/Kg) > Mg (7245.8 mg/Kg) > Si (4357.9 mg/Kg) > Fe (3250.3 mg/Kg) > Cu (735.9 mg/Kg) > Cr (488.0 mg/Kg) > Li (308.7 mg/Kg) > Mn (98.2 mg/Kg) > Ni (75.1 mg/Kg). La producción de sulfatos para este residuo fue del orden de 16,173 mg/L a 18,217 mg/L del día 7 al 21, respecto al pH este se observa una disminución en relación con el sistema control de 4.86 a 4.01 para cada uno de los días, esto nos indica que

en este residuo la actividad microbiana fue baja ya que se observa una concentración máxima de H_2SO_4 de 0.195 M al día 14 y 0.152 M al día 21. Por lo que al observar una muy baja actividad microbiana en este residuo, será descartado para la siguiente etapa de la investigación. En cuanto a los metales presentes en este residuo nuevamente se observa que el mayor contenido es Aluminio y debido a la alta toxicidad que este tiene a altas concentraciones este pudo influir en el crecimiento de la bacteria.

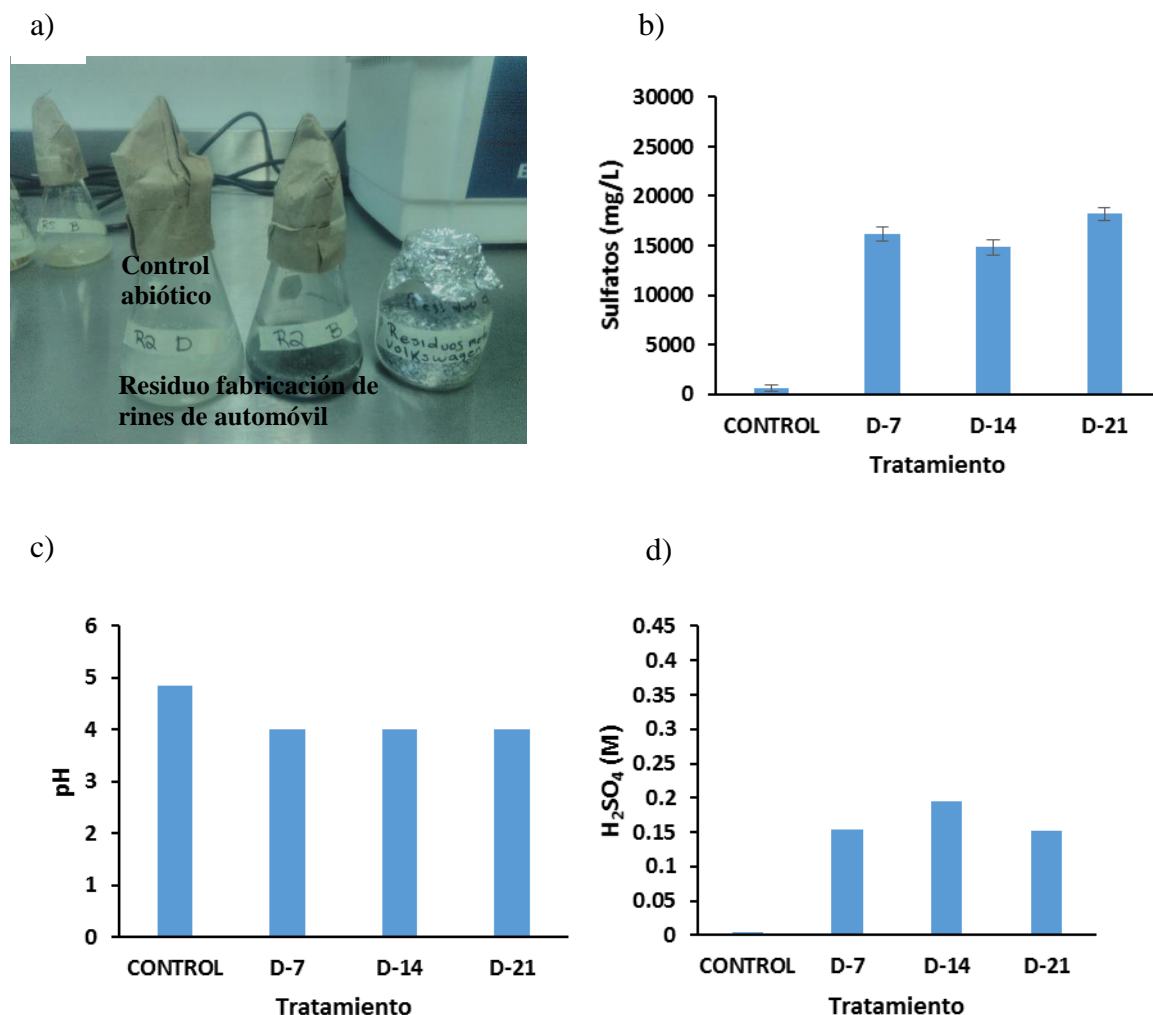


Figura 8. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-2 (Residuo fabricación de rines de automóvil) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo fabricación de rines de automóvil b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

En la Figura 9 (a, b, c, d) se muestran los resultados del residuo R3 M1 (jal de mina) cuyo contenido metálico en orden decreciente es Fe (62631 mg/Kg) > Si (37296.4 mg/Kg) > Al

(23250.8 mg/Kg) > Zn (15538.3 mg/Kg) > Pb (8678.7 mg/Kg) > Mg (6307.8 mg/Kg) > Mn (2029.9 mg/Kg) > Ba (1558.1 mg/Kg) > Cu (893.1 mg/Kg) > Ir (665.4 mg/Kg) > Os (522.8 mg/Kg) > Li (329.8 mg/Kg) > As (202.8 mg/Kg) > Ru (120.1 mg/Kg) > Au (68.1 mg/Kg) > Pt (39.8 mg/Kg) > Pd (22.0 mg/Kg). En lo que respecta a producción de sulfatos se observan valores de entre 14,313 mg/L a 14,871 mg/L a lo largo de los 21 días. En el caso del pH este disminuye conforme transcurren los días en relación al sistema de control, de 3.0 a 0.64 unidades para el día 21, por lo tanto la concentración de H₂SO₄ incremento conforme transcurrían los días con valores máximos de 0.323 M al día 21. De acuerdo a los resultados mostrados en los gráficos para este residuo se puede observar que si hay actividad microbiana ya que se alcanzan niveles bajos de pH. Si bien el residuo tiene una alta carga metálica este no afecto el crecimiento de la bacteria.

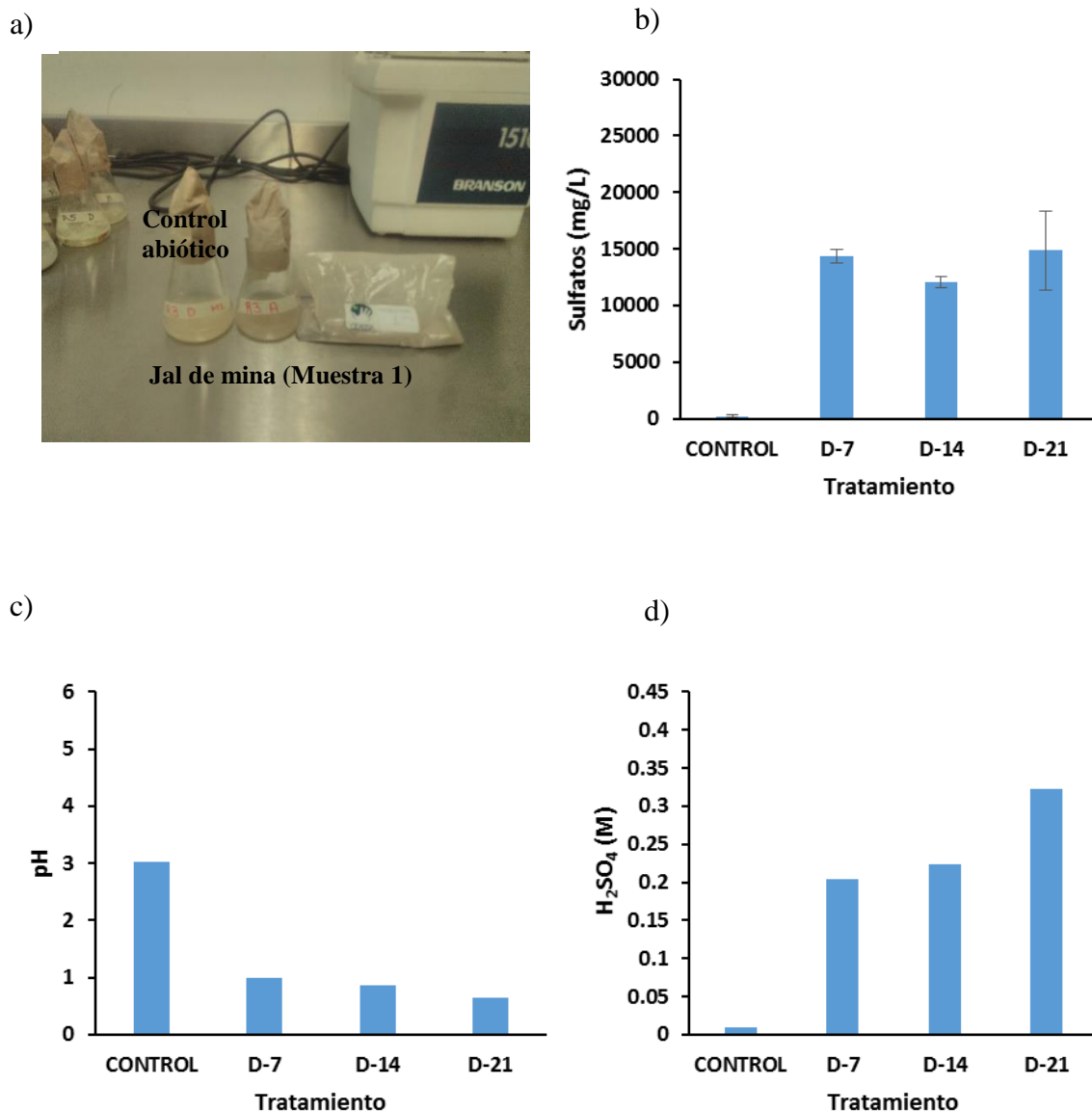


Figura 9. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-3 M1 (Jal de mina) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo jal de mina b) Producción de SO₄²⁻ c) cambios de pH d) Concentración de H₂SO₄ (M)

En la Figura 10 (a, b, c, d) se muestran los resultados del residuo R3 M2 (jal de mina) el cual contenía los siguientes metales en orden decreciente: Fe (56333.9 mg/Kg) > Si (35459.0 mg/Kg) > Al (24736.3 mg/Kg) > Zn (22763.6 mg/Kg) > Mg (6346.7 mg/Kg) > Pb (6199.3 mg/Kg) > Mn (1916.1 mg/Kg) > Cu (1080.3 mg/Kg) > Ir (783 mg/Kg) > Ba (698 mg/Kg) > Os (435.6 mg/Kg) > Li (329 mg/Kg) > As (127.2 mg/Kg) > Ru (97.4 mg/Kg) > Pt (76.1 mg/Kg) > Cd (55.7 mg/Kg) > Au (25.0 mg/Kg) > Pd (19.9 mg/Kg). La

producción de sulfatos se mantuvo entre los 13, 414 mg/L a 14,313 mg/L a los largo de los 21 días. El pH disminuyo en relación al sistema de control al transcurrir los días de 3.01 a 0.63 al día 21, indicando una actividad microbiana, en relación a la concentración de H_2SO_4 este incremento respecto al tiempo a valores de 0.252 M al día 21. Por lo que de acuerdo a los resultados mostrados en los gráficos este residuo será incluido en la siguiente etapa de la investigación. Nuevamente aunque en esta muestra había una alta carga metálica el cultivo fue capaz de tener una actividad metabólica en presencia del residuo.

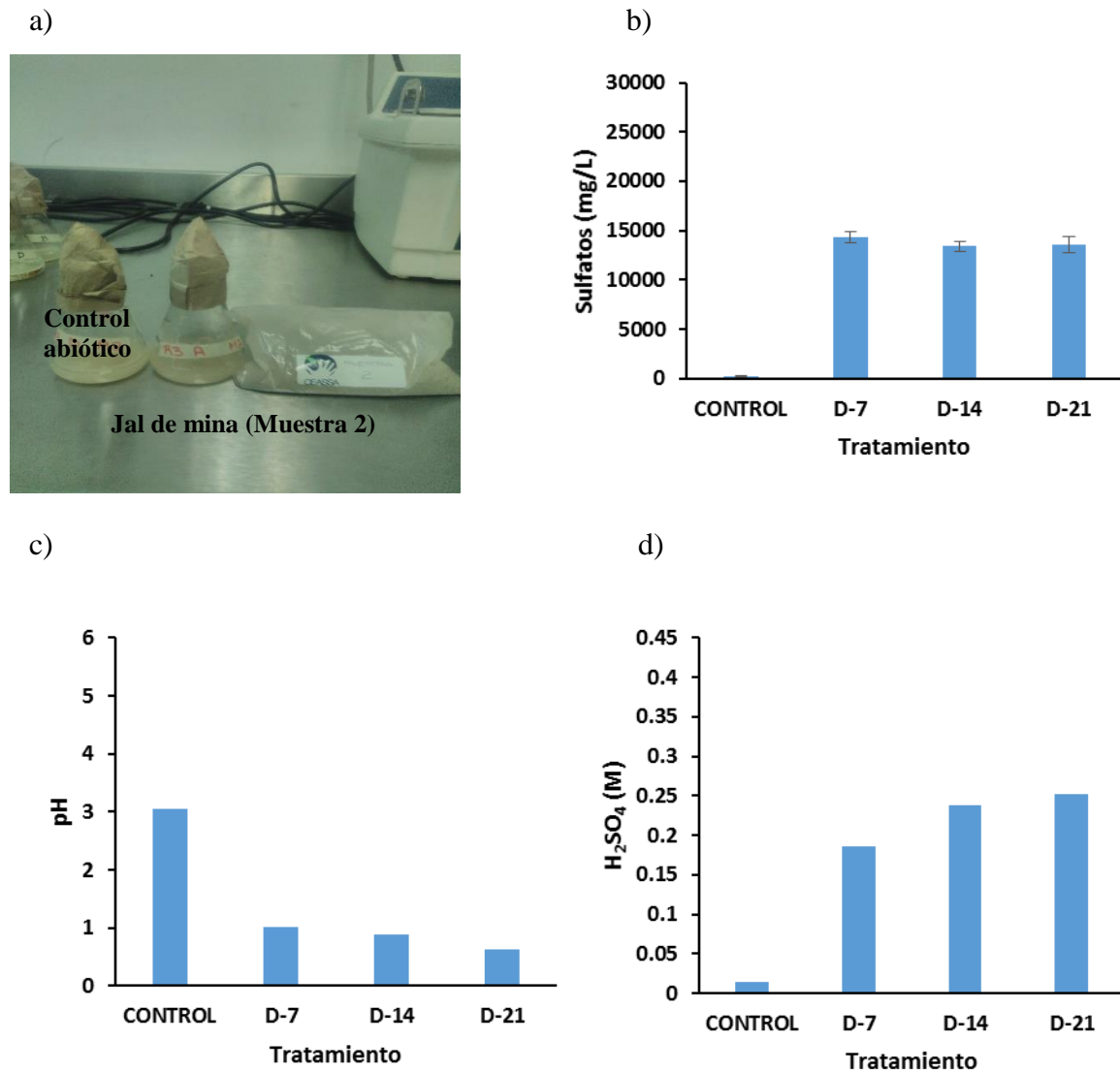


Figura 10. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-3 M2 (Jal de mina) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo jal de mina b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

Los resultados obtenidos del residuo R4(interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado) se muestran en la Figura 11 (a, b, c, d) dicho residuo contenía los siguientes metales: Fe (9651.1 mg/Kg) > Al (9170.4 mg/Kg) > Si (4540.2 mg/Kg) > Mg (2087.0 mg/Kg) > Cr (555.1 mg/Kg) > Mn (535.5 mg/Kg) > Cu (224.2 mg/Kg) > Ni (213.7 mg/Kg) > Li (161.2 mg/Kg). En relación a la concentración de sulfatos la máxima producción se mostró al día 21 con valores de 21,901 mg/. El nivel de pH fue en disminución en relación al sistema de control y respecto al tiempo de 3.35 a 0.75 al día 21, evidenciado actividad microbiana, en lo que respecta a la concentración de H₂SO₄ este aumento conforme transcurren los días obteniendo la máxima concentración de 0.291 M al día 21. De acuerdo a los resultados obtenidos este residuo será incluido en la siguiente etapa de la investigación, sin embargo el contenido metálico presente en este residuo fue bajo en comparación con el de la muestra R3 M1 y R3 M2 que son los provenientes de jales de mina y en los que se detectó actividad microbiana.

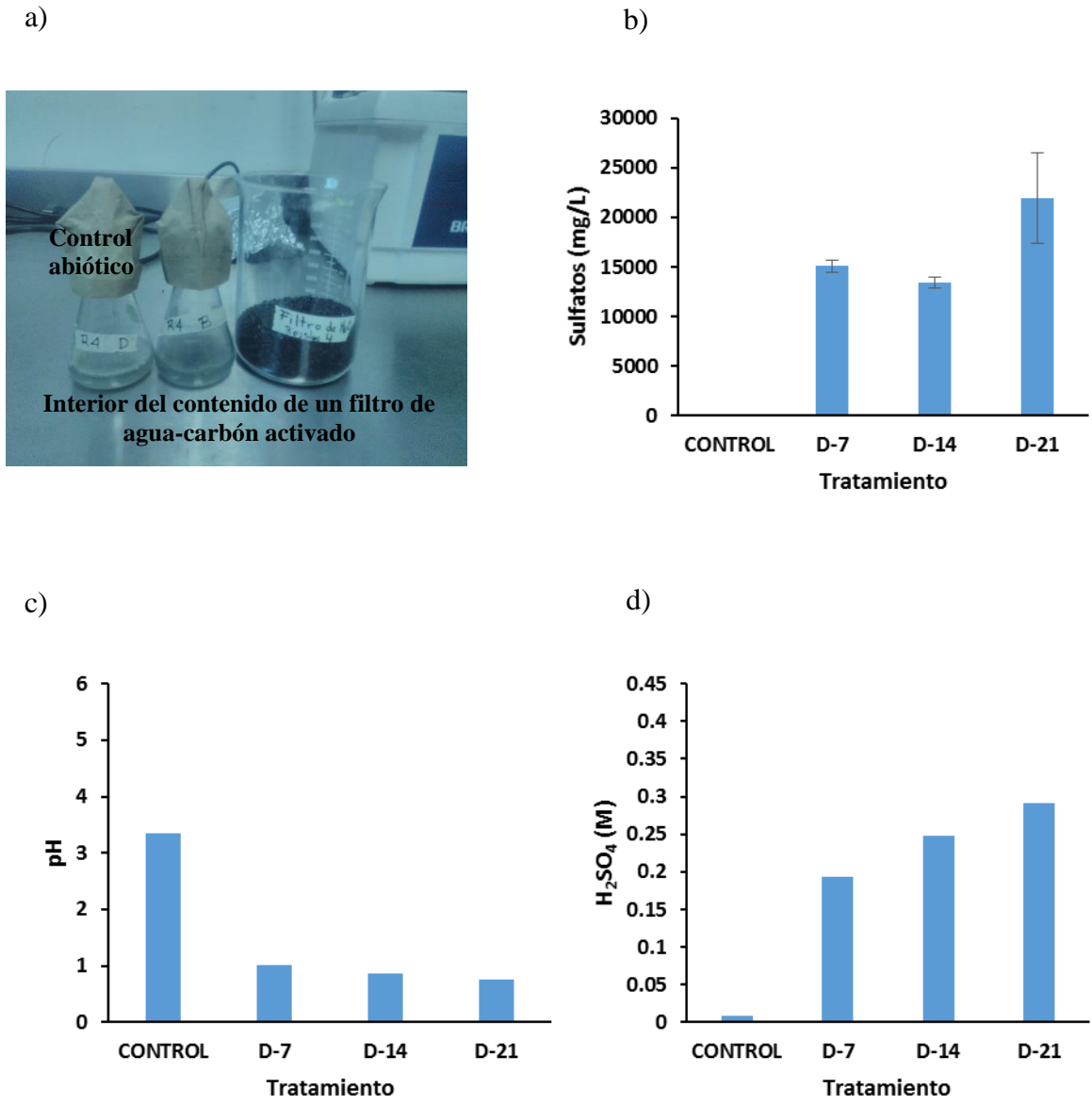


Figura 11. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-4 (Interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

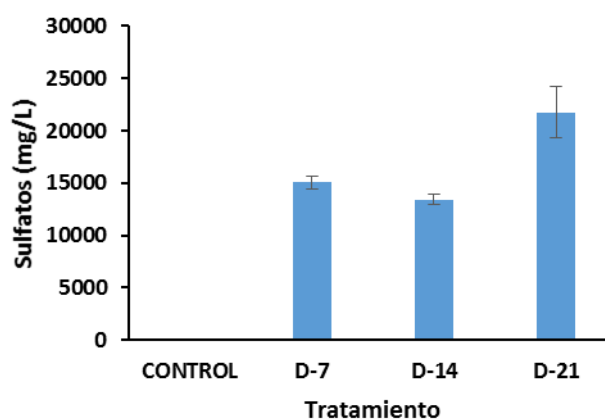
En la Figura 12 (a, b, c, d) se muestran los resultados del residuo R5 (interior del contenido de un filtro de agua-resina), este residuo contenía los siguientes metales en orden decreciente Mg (3350.1 mg/Kg) > Al (877.0 mg/Kg) > Fe (726.5 mg/Kg) > Sr (230.2 mg/Kg) > Li (213.8 mg/Kg) > Zn (140.8 mg/Kg) > Cr (112.1 mg/Kg) > Ni (13.9 mg/Kg). La máxima producción de sulfatos se dio al día 21 con valores de 21,778 mg/L. El pH

obtenido en los tratamientos fue disminuyendo respecto al tiempo y en relación al sistema de control de 2.87 a valores de 0.73 unidades al día 21 por lo que la concentración de H_2SO_4 fue aumentando respecto al tiempo con valores máximos de 0.245 M al día 21, nuevamente lo que nos indica que si hay actividad microbiana. El contenido de metales en este residuo y el anterior fue muy parecida ya que ambos son del interior de un filtro de agua, aunque la matriz fue diferente. De acuerdo a los resultados mostrados en los gráficos, este residuo también será incluido en la siguiente etapa de la investigación.

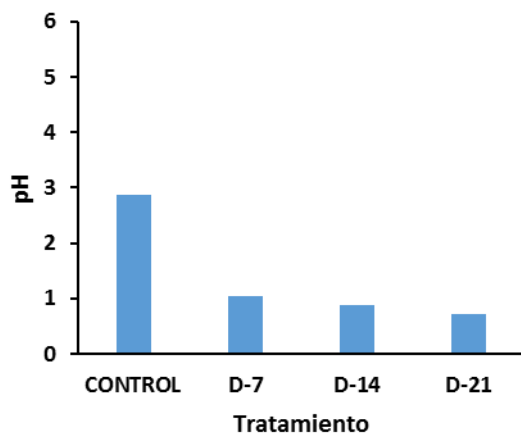
a)



b)



c)



d)

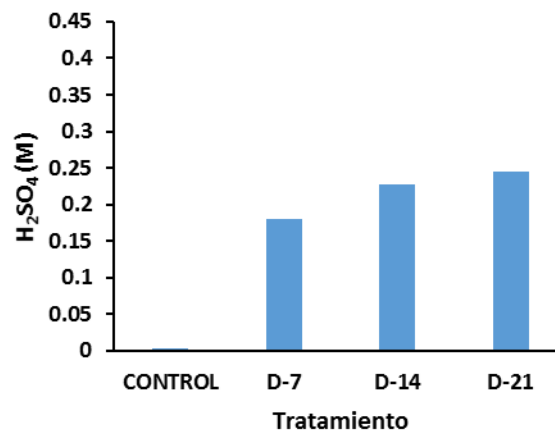


Figura 12. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-5 (Interior del contenido de un filtro de agua-resina) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo interior del contenido de un filtro de agua-resina b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

Los resultados del residuo R6 (Catalizador-IMP “HDS2R”) se muestran en la Figura13 (a, b, c, d), dicho residuo contenía los siguiente metales Al (152892.1 mg/Kg) > Mo (65577.6 mg/Kg) > Co (13219.7 mg/Kg) > Mg(779.8 mg/Kg) > Rh ((513.4 mg/Kg) > Li (306.9 mg/Kg) > Ru (231.3 mg/Kg) > Fe (86.2 mg/Kg) > Ti (72.6 mg/Kg) > W (26.6 mg/Kg) > Ni (21.1 mg/Kg) > Os (1.7 mg/Kg). La máxima producción de sulfatos es el de 14,313 mg/L al día 7, para el día 14 los sulfatos disminuyen a 12,877 mg/L y al día 21 la producción fue de 2,626 mg/L. En relación al pH, este se mantuvo sin cambios a lo largo de los 21 días y con valores parecidos al sistema control de 2.94 y 3.01 unidades. En cuanto a la concentración de H₂SO₄ nose observó producción de ácido a lo largo de los 21 días pues los valores obtenidos fueron similares a los del sistema control con valores de 0.020 M. De acuerdo con los resultados y al no observar disminución de pH y una producción de H₂SO₄, se concluye que en presencia de este residuo el cultivo fue incapaz de crecer, al revisar la carga metálica se observa que es uno de los residuos que presenta una alta concentración de aluminio (152892.1 mg/Kg) así como Cobalto (13219.7 mg/Kg) que no se había detectado en ninguno de los otros residuos estudiados. Dicho residuo no será empleado en la siguiente etapa de la investigación.

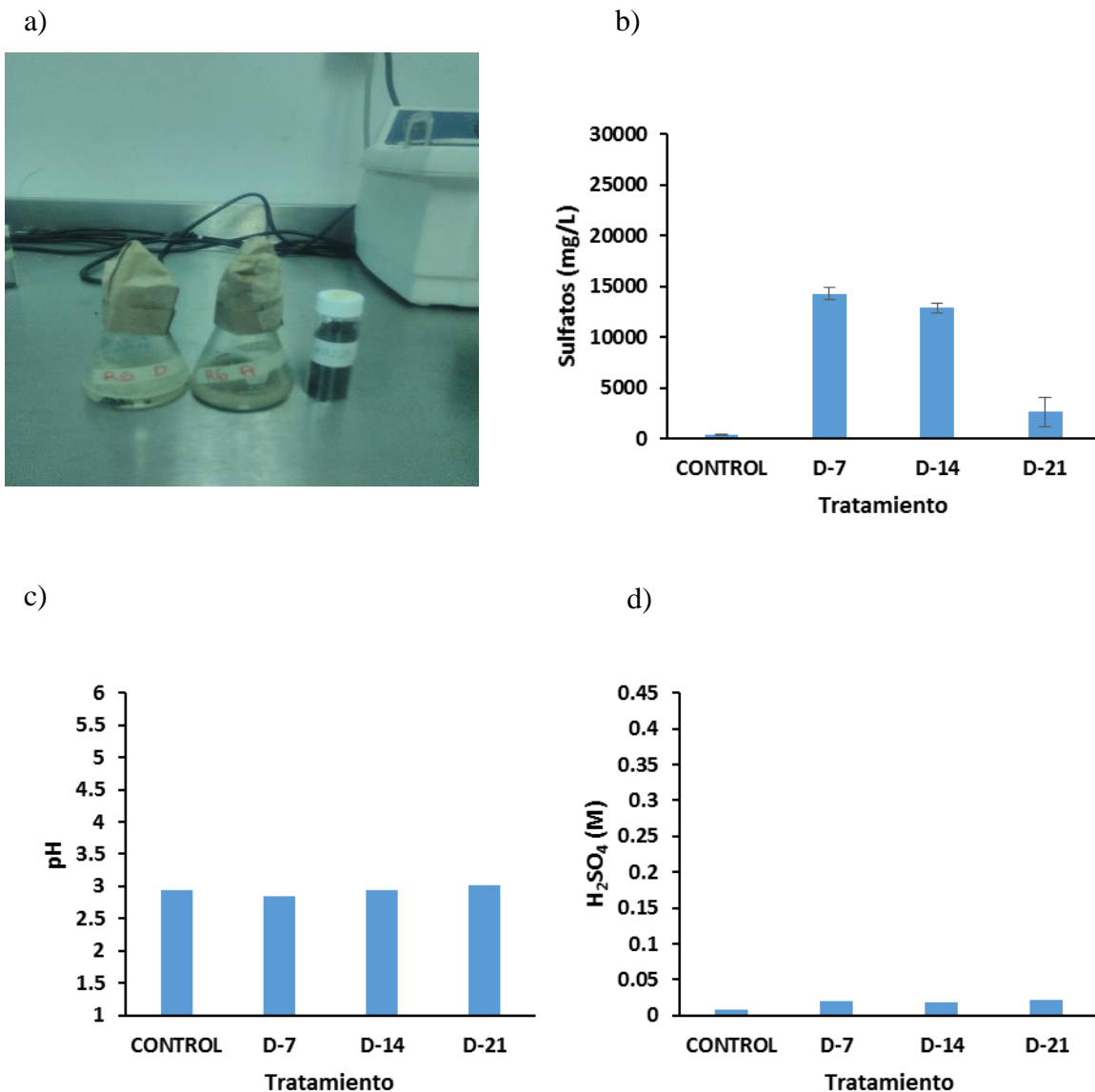


Figura 13. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-6 (Catalizador-IMP “HDS2R”) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo Catalizador-IMP “HDS2R” b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

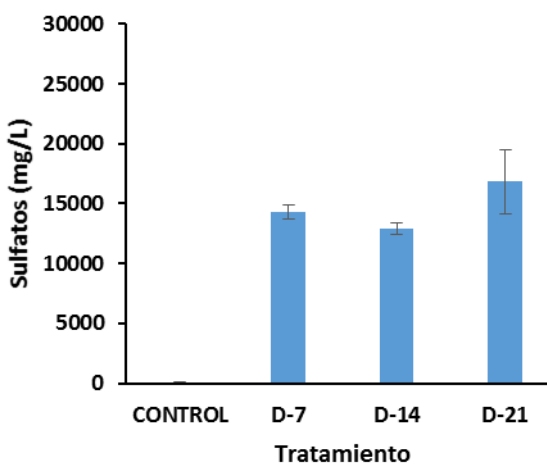
En la Figura 14 (a, b, c, d) se muestran los resultados obtenidos para el residuo R7 (Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”), los metales que contenía este residuo son los siguientes: Mg (6185.6 mg/Kg) > Al (1935.3 mg/Kg) > Fe (880.2 mg/Kg) > Li (308.7 mg/Kg) > Ru (138.0 mg/Kg) > Ti (119.5 mg/Kg) > Mo (56.2 mg/Kg) > Au (25.1 mg/Kg) > Pt (15.1 mg/Kg) > Ir (12.3 mg/Kg) > Os (4.3 mg/Kg). La máxima producción de sulfatos

se dio al día 21 con un valor de 16,824 mg/L. El pH fue en disminución conforme transcurrían los días en relación al sistema de control de 4.67 por debajo de 1.0 desde el día 7 a valores de 0.6 al día 21, por lo tanto la máxima concentración de H₂SO₄ observada fue de 0.262 M al día 21, este residuo también es un catalizador de la industria petroquímica pero la carga metálica fue menor presentando 79 veces menos aluminio que el residuo R6 además de no presentar cobalto. Por lo que en este residuo si se detectó actividad microbiana y será incluido en la siguiente etapa de la investigación.

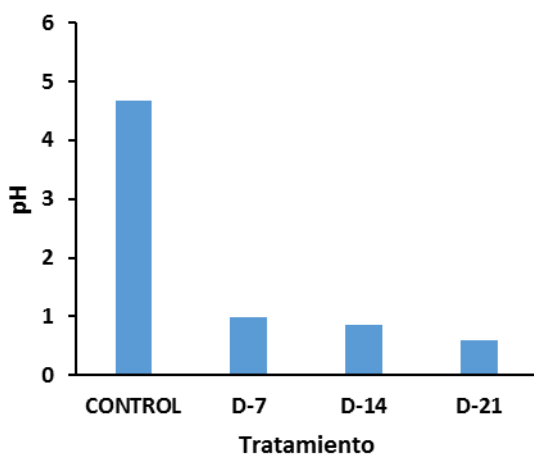
a)



b)



c)



d)

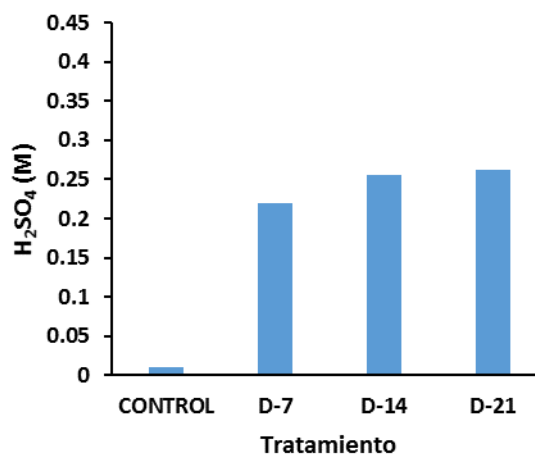


Figura 14. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-7 (Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm

durante 21 días. a) Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010” b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

Los datos del residuo R8 (Catalizador-IMP “CAT_US”) se muestran en la Figura 15 (a, b, c, d), los metales contenido en este residuo se mencionan a continuación en orden decreciente Al (47142.9 mg/Kg) > Fe (44205.4 mg/Kg) > Ti(10870.3 mg/Kg) > Mg (1743.9 mg/Kg) > Mn (579.1 mg/Kg) > Li (309.3 mg/Kg) > Os (283.8 mg/Kg) > Ru (159.1 mg/Kg) > W (14.1 mg/Kg) > Pt (0.3 mg/Kg). En este residuo se observó actividad microbiana con una máxima producción de sulfatos de 21,431 mg/L al día 21. El nivel de pH descendió desde el día 7 por debajo de 1.0 llegando a valores de 0.58 unidades al día 21 en comparación con el sistema control que mostro un pH de 2.73, en lo que se refiere a la concentración de H_2SO_4 esta incremento ligeramente respecto al tiempo con valores de 0.25 M a 0.282 M a lo largo del experimento. En cuanto a la carga metálica y tratándose de un catalizador el contenido de aluminio es de tres veces menos que el R6, este residuo no tiene cobalto pero si presento una concentración considerable de Ti (10870.3 mg/Kg), de cualquier forma el cultivo fue capaz de crecer en presencia de este residuo, que será incluido en la siguiente etapa de la investigación.

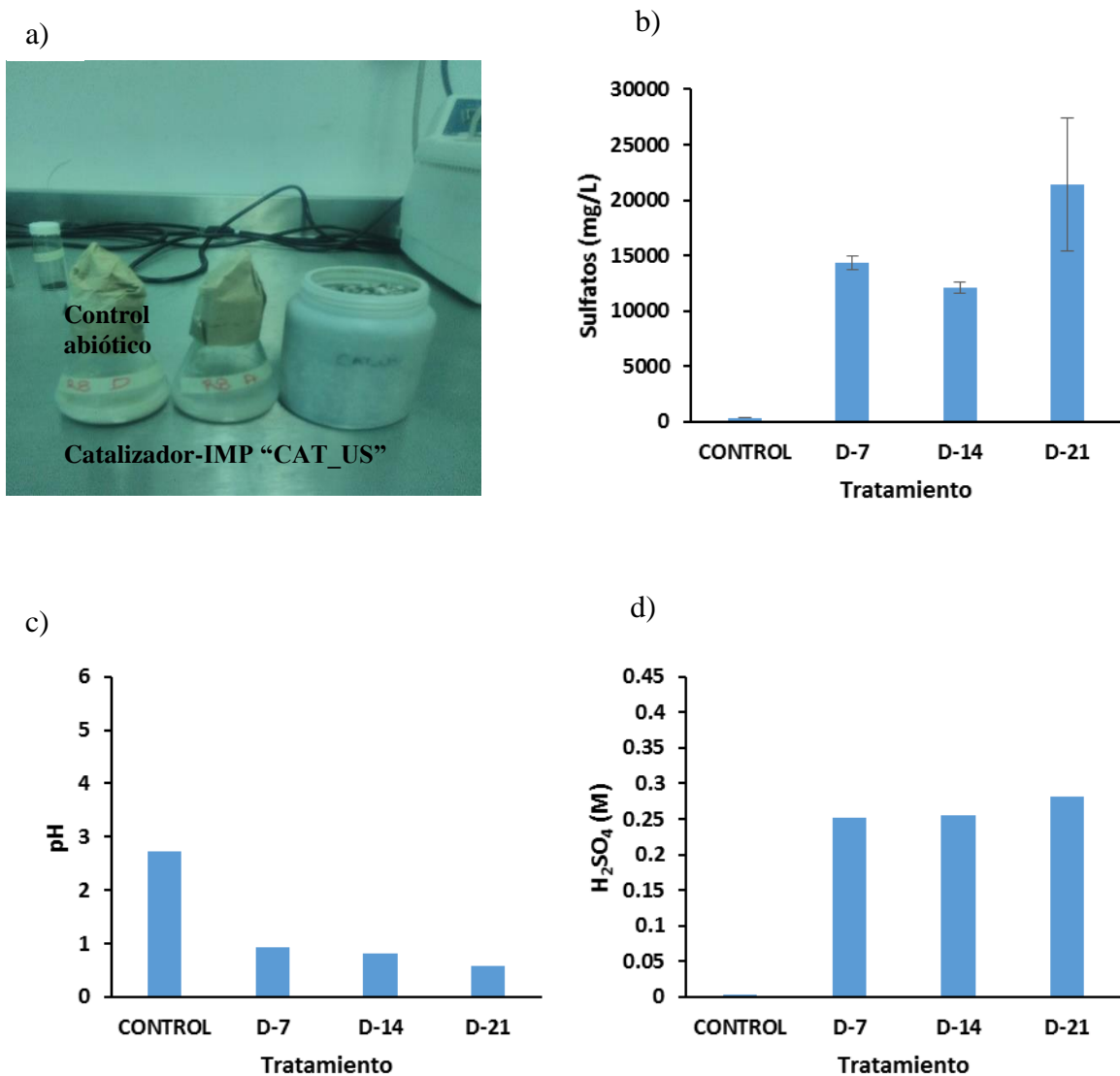


Figura 15. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-8 (Catalizador-IMP “CAT_US”) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Catalizador-IMP “CAT_US” b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

En la Figura 16 (a, b, c, d) se muestran los resultados del residuo R9 (Escorias fundidora de Aluminio), los metales contenidos en este residuo son los siguientes: Al (119556.0 mg/Kg) > Mg (25561.2 mg/Kg) > Fe (9807.1 mg/Kg) > Si (7738.8 mg/Kg) > Cu (1695.0 mg/Kg) > Zn (1430.1 mg/Kg) > Ir (1021.7 mg/Kg) > Mn (721.1 mg/Kg) > Ru (530.8 mg/Kg) > Cr (200.7 mg/Kg) > Li (167.4 mg/Kg) > Ni (154.9 mg/Kg) > Pt (22.4 mg/Kg) > Au (22.0 mg/Kg) > Os (11.0 mg/Kg). Nuevamente es este residuo si se detectó actividad microbiana

con una máxima producción de sulfatos de 18,744 mg/L al día 21. Con lo que respecta al pH este disminuyó de valores de 5.76 unidades en el sistema control a valores de 1.27 al día 21, mostrando máxima concentración de H_2SO_4 de 0.191 M al día 21, en cuanto al contenido de metales si bien presenta una elevada concentración de aluminio esta es cerca de 5 veces menos en comparación con el residuo R1 y R2 cuyos concentraciones oscilaban entre las 591072,1 y 563542,3 mg/Kg en donde no se registró actividad microbiana, aunque se detecta la presencia de otros metales estos no afectan la actividad metabólica del cultivo, dicho residuo se considera en la siguiente etapa de la investigación.

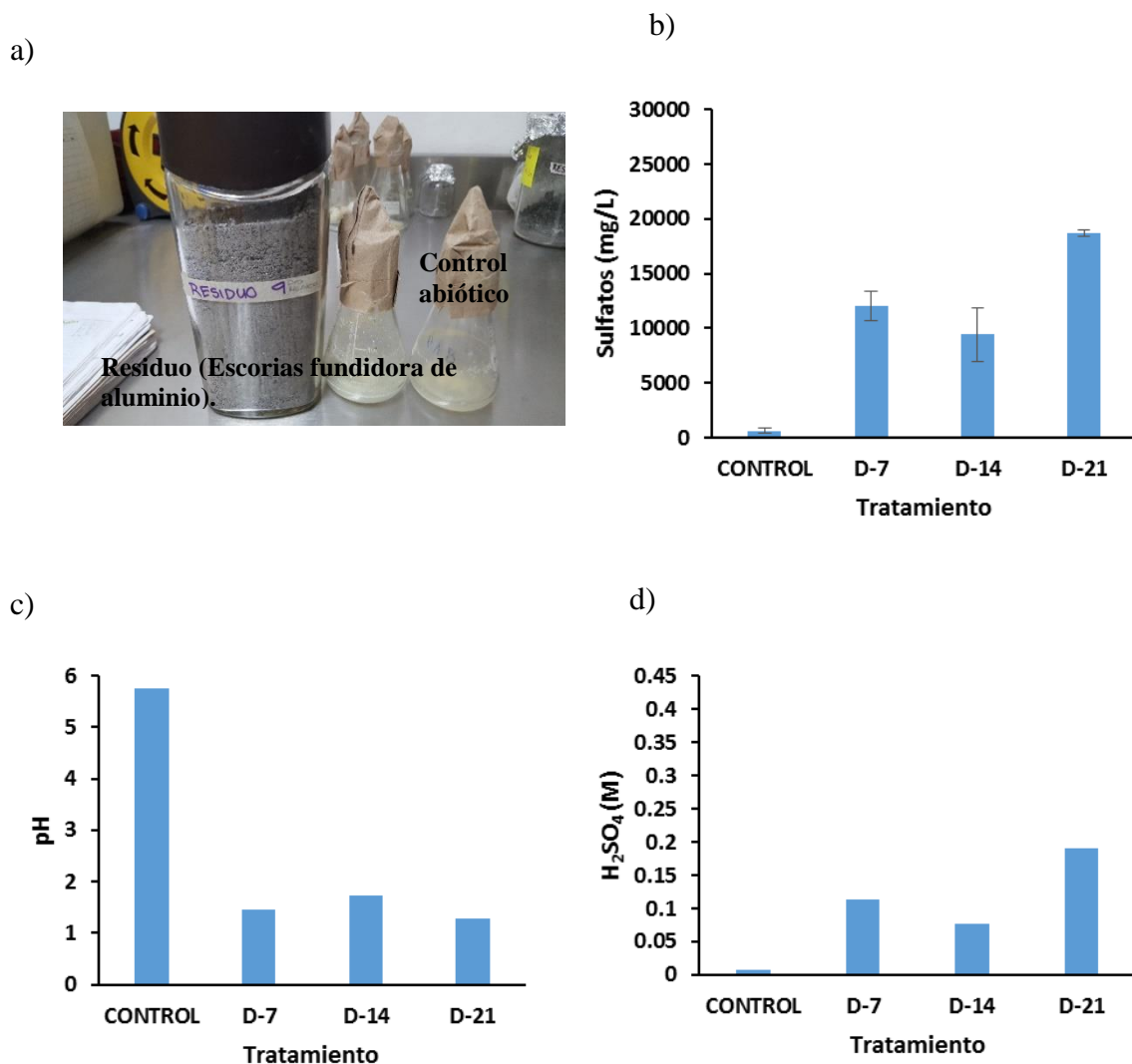


Figura 16. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-9 (Escorias fundidora de Aluminio) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante

21 días. a) Escorias fundidora de Aluminio b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

En la Figura 17 (a, b, c, d) se muestran los resultados obtenidos para el residuo R10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1), los metales que contenía dicho residuo son los siguientes: Ga (3829064 mg/Kg) > In (1586685 mg/Kg) > Al (38609.6 mg/Kg) > Sn (6838.9 mg/Kg) > Cu (3322.8 mg/Kg) > Fe (2526.3 mg/Kg) > Mg (718.4 mg/Kg) > Li (153.6 mg/Kg) > Ni (120.0 mg/Kg) > Zn (106.0 mg/Kg) > Mn (63.9 mg/Kg), así como Ga e In, cuya concentración no se pudo determinar por carecer del estándar pero se muestran valores de intensidad normalizador a 1 en relación a la intensidad del elemento cuyos valores fueron de 8.9 para Ga y 4.4 para In. La máxima producción de sulfatos registrada fue de 17,446 mg/L al día 14 sin cambios significativos al día 21. En relación al pH este disminuyó en relación al sistema control de 4.97 a 0.78 unidades al día 21, sin embargo desde el día 7 ya había un descenso hasta 1.0. La máxima concentración de H_2SO_4 fue de 0.211 M al día 21, en relación a la carga metálica este no afecto el crecimiento del cultivo, considerado para la siguiente etapa.

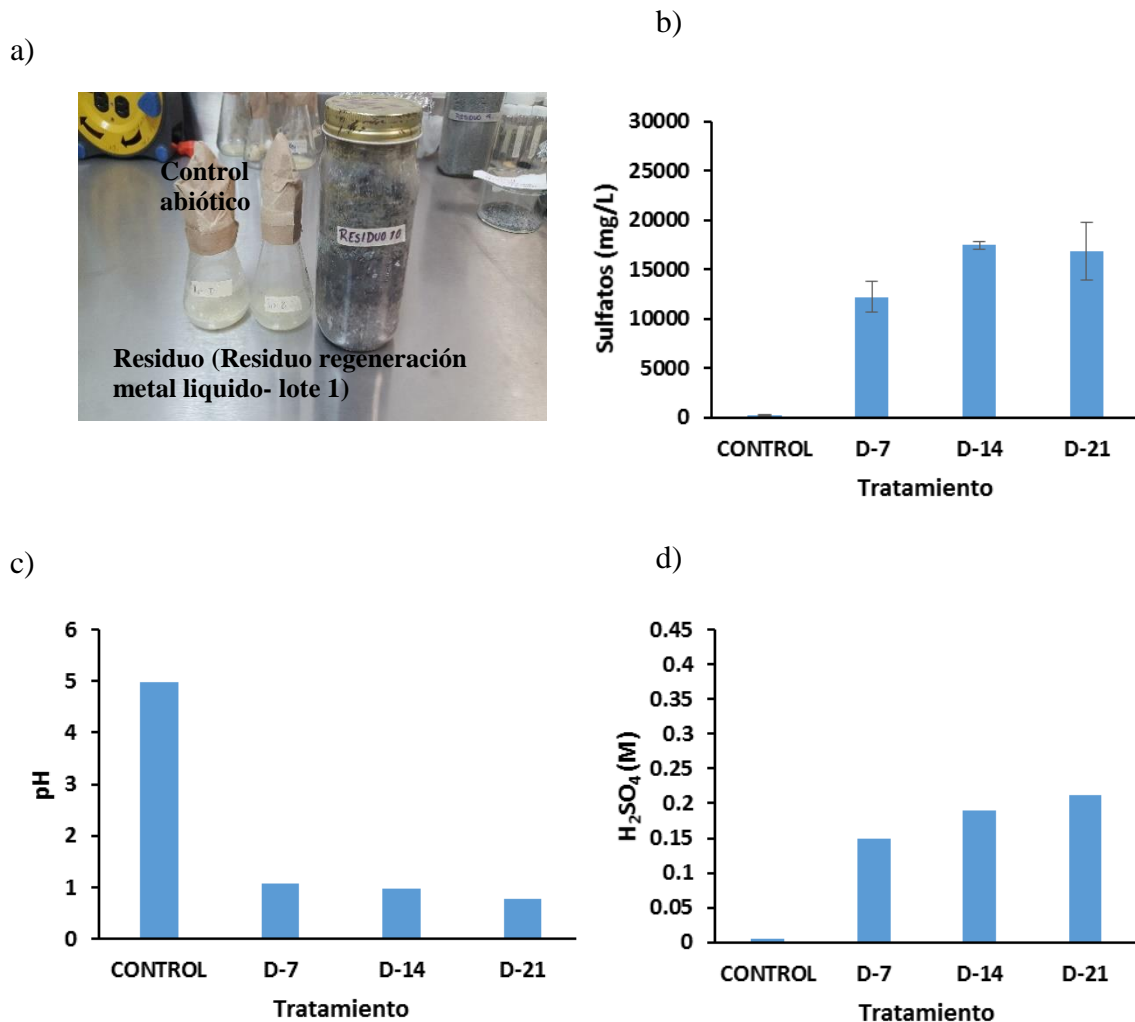


Figura 17. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo regeneración metal liquido-lote 1 b) Producción de SO_4^{2-} c) cambios de pH d) Concentración de H_2SO_4 (M)

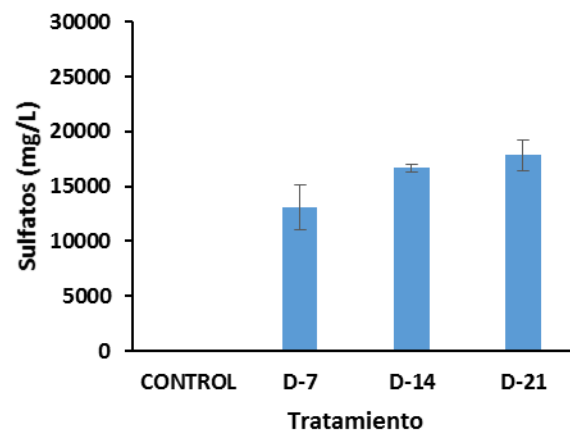
En la Figura 18 (a, b, c, d) se muestran los datos del residuo R11 (Residuo regeneración metal liquido-lote2), los metales contenidos en este residuo son los siguientes: In (11000000 mg/Kg) > Ga (7579113 mg/Kg) > Al (72158.0 mg/Kg) > Sn (57847,8 mg/Kg) > Fe (5344.0 mg/Kg) > Cu (2350.0 mg/Kg) > Mg (1412.9 mg/Kg) > Cr (1161.2 mg/Kg) > Ni (517.7 mg/Kg) > Li (155.5 mg/Kg) > Mn (55.9 mg/Kg), así como Ga e In, cuya concentración fue determinada como en el residuo anterior con valores de 22.2 para Ga y 36.5 para In. De acuerdo a los resultados obtenidos, la máxima producción de sulfatos se

dio al 21 con valores de 17,826 mg/L. Respecto al pH este descendió de 4.01 a valores de 0.9 al día 21, sin embargo desde el día 7 se mostraban valores cercanos a 1.0, en cuanto a la concentración de H_2SO_4 se observaron los máximos valores entre el día 14 y 21 con valores de 0.183 y 0.194 M respectivamente. Nuevamente la carga metálica presente en este residuo no afecto la actividad sulfooxidante de *A. thiooxidans* DSM26636, por lo que como en los casos anteriores dicho residuo será empleado en la siguiente etapa en la cual se determinara la habilidad del ácido producido por el cultivo durante su crecimiento en presencia del residuo más azufre para lixiviar los metales contenidos en el sólido y pasarlos en solución, dichos resultados se muestran más adelante.

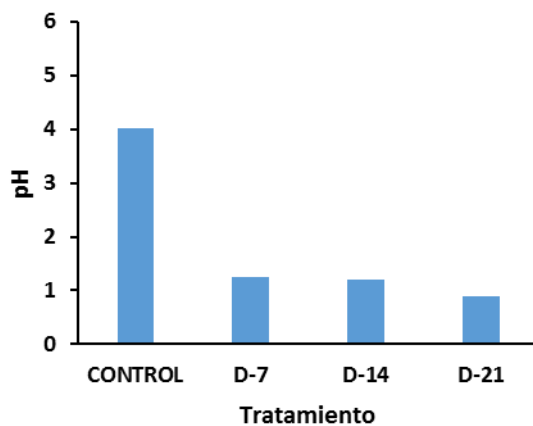
a)



b)



c)



d)

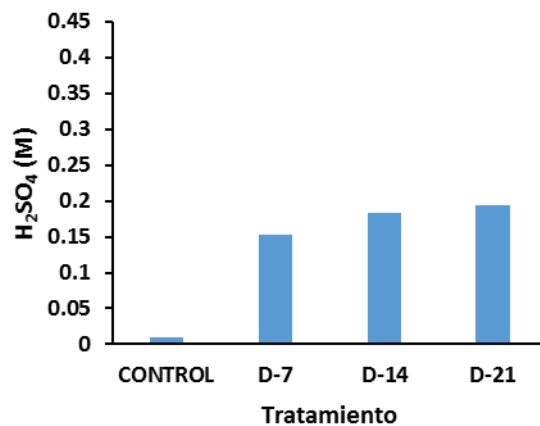
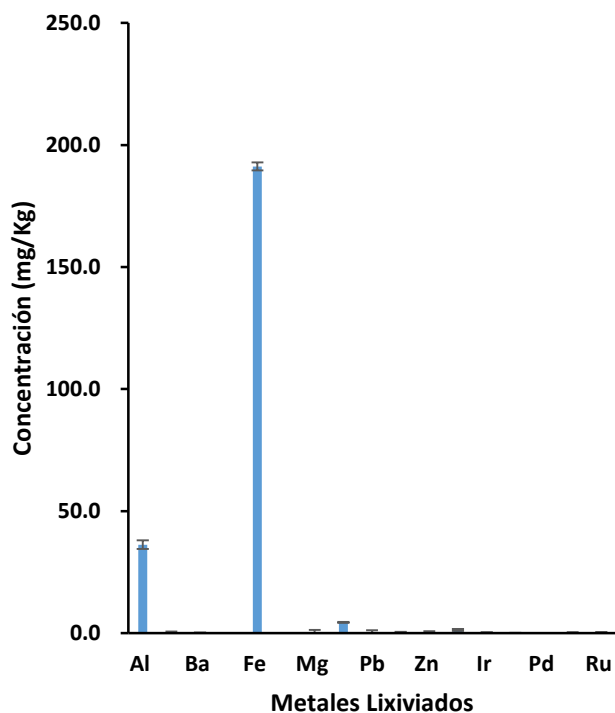


Figura 18. Evaluación de la actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia del Residuo-11 (Residuo regeneración metal liquido-lote 2) al 1% más azufre al 1% e incubado a 30°C, 150 rpm durante 21 días. a) Residuo regeneración metal liquido-lote 2 b) Producción de SO₄²⁻ c) cambios de pH d) Concentración de H₂SO₄ (M)

9.3 Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en residuos NO ferrosos mediante la cuantificación de metales por ICP-OES.

De los 12 residuos ensayados anteriormente solo en nueve de ellos el cultivo de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 mostro actividad sulfooxidante medida en términos de producción del ion sulfato, concentración de ácido sulfúrico y descenso del pH a lo largo de 21 días que duró el ensayo, dichas muestras codificadas como : R3M1 (jal de mina 1), R3M2 (jal de mina 2), R4 (Interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado), R5 (Interior del contenido de un filtro de agua-resina), R7 (Catalizador-IMP“Desact-ULSD/2010”), R8 (Catalizador-IMP “CAT_US”), R9 (Escorias fundidora de Aluminio), R10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1) y R11 (Residuo regeneración metal liquido-lote 2) incluyendo los controles negativos fueron digeridas para posteriormente realizar un análisis cuantitativo de los metales lixiviados por espectrometría de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) empleando diferentes longitudes de onda para cada elemento. La finalidad de esta parte de la investigación fue conocer la concentración de los metales lixiviados por *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en cada uno de los residuos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación. En la Figura 19 (a, b) se muestran los resultados del residuo R3M1 (Jal de Mina), en la gráfica se observan los metales que fueron lixiviados por la bacteria en orden decreciente fueron Fe (191.2 ± 1.6 mg/Kg), Al (36.3 ± 1.7 mg/Kg), Mn (4.5 ± 0.2 mg/Kg), Au (1.3 ± 0.4 mg/Kg) y Ru (0.3 ± 0.1 mg/Kg.), correspondiendo a un 0.31 % para Fe, 0.15 % para Al, 0.22 % para Mn, 1.91 % para Au y 0.25 % para Ru de metales lixiviados. Si bien en términos de porcentaje estos son bajos es importante resaltar que el ácido sulfúrico producido de manera biológica fue capaz de lixiviar algunos metales contenidos en el residuo reduciendo con ello la carga metálica presente en el Jal de Mina. Aunque en la mayoría de los casos se alcanzó un porcentaje por debajo del 2 % de los metales lixiviados en este residuo.

a)



b)

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	23250,8	36.3 ± 1.7
As	202,8	0
Ba	1558,1	0
Cu	893,1	0
Fe	62631,4	191.2 ± 1.6
Li	329,8	0
Mg	6307,8	0
Mn	2029,9	4.5 ± 0.2
Pb	8678,7	0
Si	37296,4	0
Zn	15538,3	0
Au	68,1	1.3 ± 0.4
Ir	665,4	0
Os	522,8	0
Pd	22,0	0
Pt	39,8	0
Ru	120,1	0.3 ± 0.1

Figura 19. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R3 M1 (Jal de mina). a) Gráfico de la concentración (mg/Kg) de metales lixiviados b) Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

En la Figura 20 (a, b) se muestran los resultados del residuo R3M2 (Jal de Mina2). Los metales lixiviados por la bacteria en orden decreciente fueron: Fe (208.3 ± 0.5 mg/Kg), Mg (136.7 ± 1.2 mg/Kg), Al (74.5 ± 0.3 mg/Kg), Zn (55.7 ± 1.3 mg/Kg), Mn (20.9 ± 0.1 mg/Kg), Pb (1.2 ± 0.6 mg/Kg), Ir (0.9 ± 0.6 mg/Kg), Os (0.8 ± 0.6 mg/Kg), As (0.2 ± 0.1 mg/Kg) y Li (0.2 ± 0.0 mg/Kg), correspondiendo a un porcentaje de 0.37% para Fe, 2.15% para Mg, 0.30% para Al, 0.24% para Zn, 1.09% para Mn, 0.02% para Pb, 0.11% para Ir, 0.18% para Os, 0.16% para As y 0.06% para Li. Como se observa los valores en porcentaje son bajos, pero la bacteria fue capaz de lixiviar algunos metales mediante el ácido sulfúrico producido. Sin embargo, en comparación con el residuo 1 que también es un jal de mina en este residuo se observaron mayores metales lixiviados.

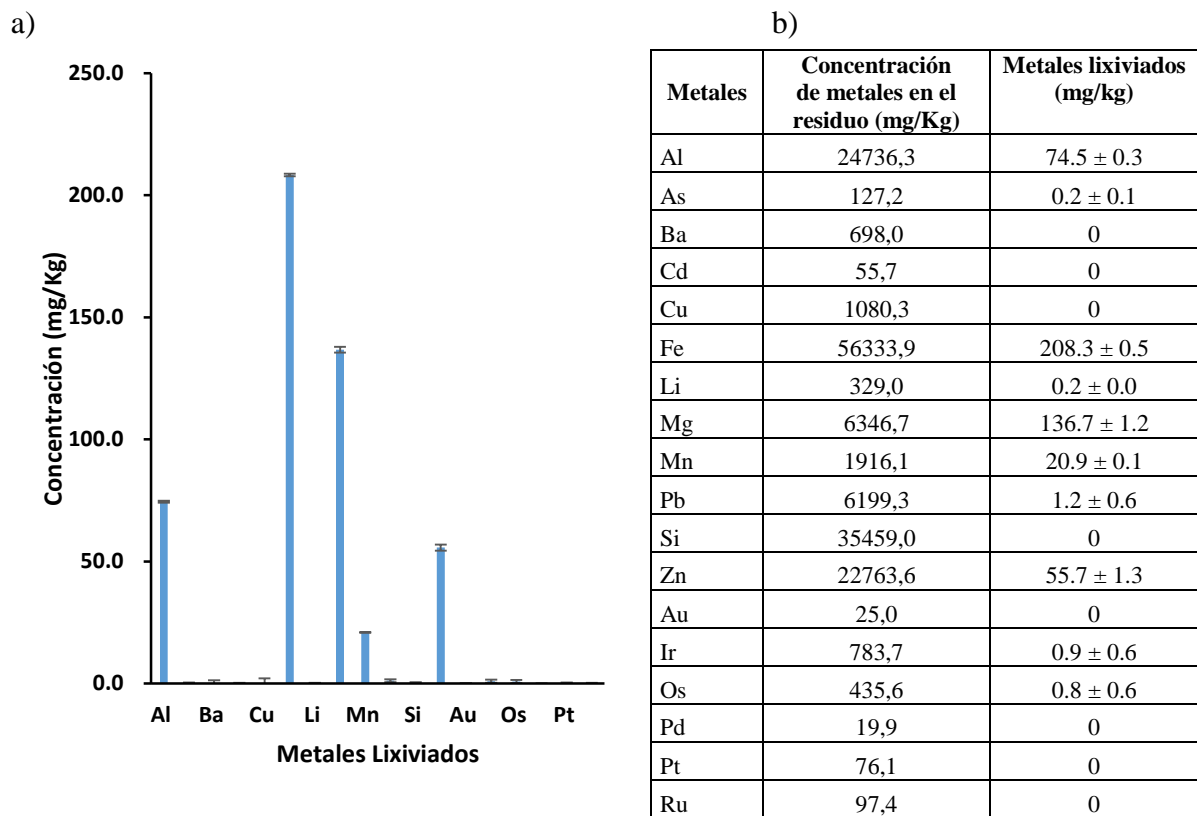
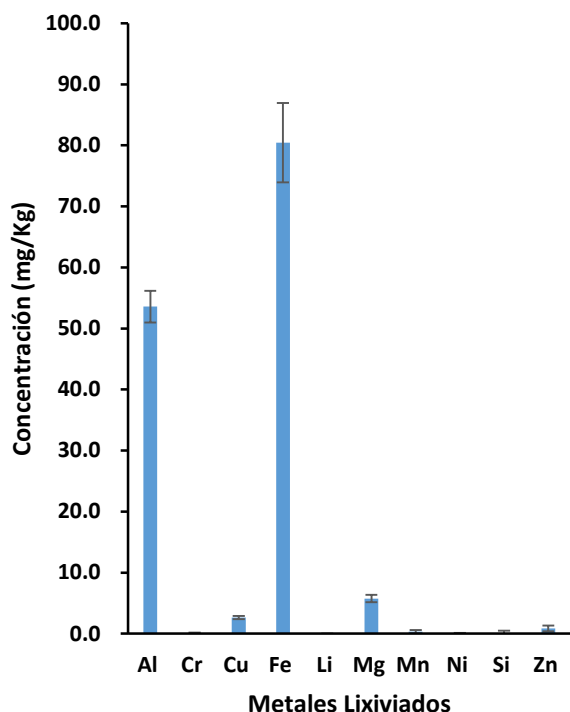


Figura 20. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R3 M2 (Jal de mina). a) Gráfico de la concentración (mg/Kg) de metales lixiviados b) Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

En la Figura 21 (a, b) se muestran los resultados del residuo R4 (Interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado) en el cual los metales lixiviados por la bacteria en orden decreciente fueron: Fe (80.4 ± 6.5 mg/Kg), Al (53.6 ± 2.6 mg/Kg), Mg (5.8 ± 0.6 mg/Kg), Cu (2.6 ± 0.2 mg/Kg), Zn (0.8 ± 0.5 mg/Kg) y Mn (0.3 ± 0.3 mg/Kg), correspondiendo al 0.83% para Fe, 0.58% para Al, 0.28% para Mg, 1.16% para Cu, 0.89% para Zn y 0.06% para Mn. Si bien los porcentajes de lixiviación son bajos pero el ácido producido por la bacteria fue capaz de lixiviar algunos metales reduciendo con ello la carga metálica de este residuo. Pero en la mayoría de los metales el porcentaje se encuentra por debajo del 1%.

a)



b)

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	9170,4	53.6 ± 2.6
Cr	555,1	0
Cu	224,2	2.6 ± 0.2
Fe	9651,1	80.4 ± 6.5
Li	161,2	0
Mg	2087,0	5.8 ± 0.6
Mn	535,5	0.3 ± 0.3
Ni	213,7	0
Si	4540,2	0
Zn	89,9	0.8 ± 0.5

Figura 21. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R4 (Interior del contenido de un filtro de agua-carbón activado). a) Gráfico de la concentración (mg/Kg) de metales lixiviados b) Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

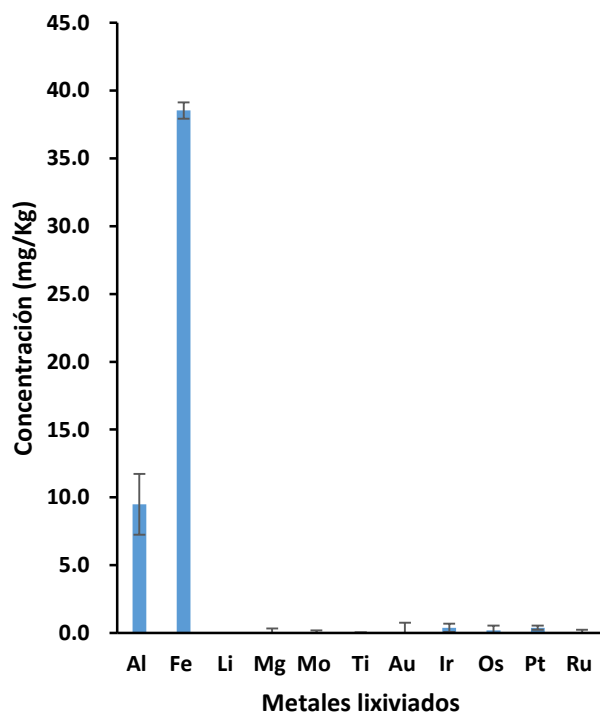
Los resultados para el residuo R5 (interior del contenido de un filtro de agua-resina) se muestran en la Figura 22. Como se puede observar en el caso de este residuo no se logró la lixiviación de metales mediante el ácido sulfúrico producido por la bacteria, ya que las concentraciones de los metales analizados presentan un valor de cero.

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	877.0	0
Cr	112.1	0
Fe	726.5	0
Li	213.8	0
Mg	3350.1	0
Ni	13.9	0
Sr	230.2	0
Zn	140.8	0

Figura 22. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R5 (Interior del contenido de un filtro de agua-resina). Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

En la Figura 23 (a, b) se muestran los resultados obtenidos en el residuo R7 (Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”). Los metales lixiviados en orden decreciente fueron: Fe (38.5 ± 0.6 mg/Kg), Al (9.5 ± 2.2 mg/Kg), Ir (0.4 ± 0.3 mg/Kg), Pt (0.4 ± 0.1 mg/Kg) y Os (0.2 ± 0.4 mg/Kg), correspondiendo un porcentaje de 4.37% para Fe, 0.49% para Al, 3.25% para Ir, 2.65% para Pt y 4.65% para Os. En la mayoría de los metales a excepción del Fe se alcanzan más del 2% de lixiviación por lo que quiere decir que se reduce la carga metálica de este material mediante el ácido sulfúrico producido por la bacteria.

a)



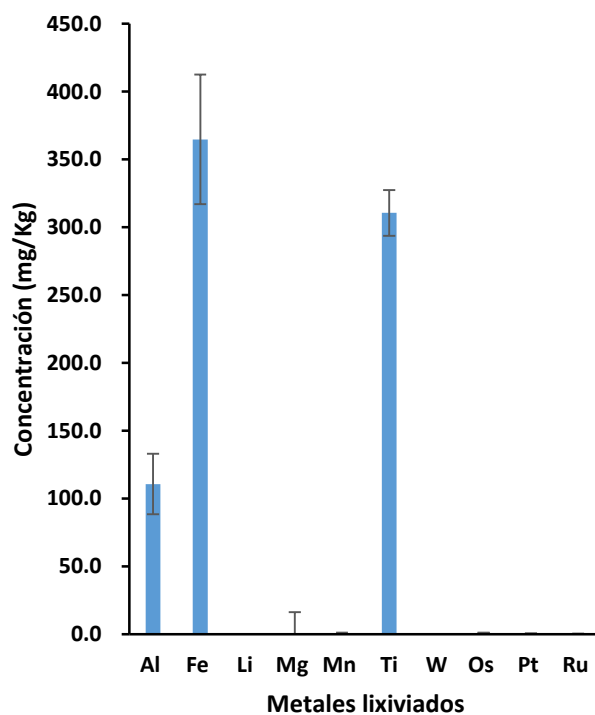
b)

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	1935.3	9.5 ± 2.2
Fe	880.2	38.5 ± 0.6
Li	308.7	0
Mg	6185.6	0
Mo	56.2	0
Ti	119.5	0
Au	25.1	0
Ir	12.3	0.4 ± 0.3
Os	4.3	0.2 ± 0.4
Pt	15.1	0.4 ± 0.1
Ru	138.0	0

Figura 23. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-7 (Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”). a) Gráfico de la concentración (mg/Kg) de metales lixiviados b) Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

En la Figura 24 (a, b) se muestran los resultados para el residuo R8 (Catalizador-IMP “CAT_US”). Los metales lixiviados por la bacteria en orden decreciente fueron: Fe (364.8 ± 47.8 mg/Kg), Ti (310.6 ± 16.9 mg/Kg), Al (110.7 ± 22.4 mg/Kg), Os (0.8 ± 0.4 mg/Kg), Mn (0.7 ± 0.6 mg/Kg), Ru (0.2 ± 0.2 mg/Kg) y Pt (0.1 ± 0.4 mg/Kg), a los cuales les corresponde un porcentaje de 0.83% para Fe, 2.86% para Ti, 0.23% para Al, 0.28% para Os, 0.12% para Mn, 0.13% para Ru y 33.33 % para Pt. Debido a que hubo lixiviación de metales mediante el ácido producido por la bacteria se logra reducir la carga metálica de dicho residuo. Aunque en la mayoría de los metales el porcentaje es menor al 1% se logran porcentajes mayores al 2% para Ti y una 33.3 % para Pt.

a)



b)

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	47142.9	110.7 ± 22.4
Fe	44205.4	44205,4
Li	309.3	0
Mg	1743.9	0
Mn	579.1	0.7 ± 0.6
Ti	10870.3	310.6 ± 16.9
W	14.1	0
Os	283.8	0.8 ± 0.4
Pt	0.3	0.1 ± 0.4
Ru	159.1	0.2 ± 0.2

Figura 24. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-8 (Catalizador-IMP “CAT_US”). a) Gráfico de la concentración (mg/Kg) de metales lixiviados b) Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

Los resultados del residuo R9 (Escorias fundidora de Aluminio) se muestran en la Figura 25. Como se puede observar para este residuo no se logró la lixiviación de ningún metal por medio de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636, por lo que no se reduce la carga metálica de este residuo.

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	119556,0	0
Cr	200.7	0
Cu	1695.0	0
Fe	9807.1	0
Li	167.4	0
Mg	25561.2	0
Mn	721.1	0
Ni	154.9	0
Si	7738.8	0
Zn	1430.1	0
Au	22,0	0
Ir	1021.7	0
Os	11.0	0
Pt	22.4	0
Ru	530.8	0

Figura 25. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo R9 (Escorias fundidora de Aluminio). Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos en el residuo R10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1). Los metales lixiviados en orden decreciente son Ga (1500.9 ± 13.8 mg/Kg), In (4.3 ± 32.8 mg/Kg), a los cuales les corresponden un porcentaje de 0.03% para Ga y 0.0002 % para In, por lo tanto se reduce la carga metálica para este residuo.

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	38609.6	0
Cu	3322.8	0
Fe	2526.3	0
Li	153.6	0
Mg	718.4	0
Mn	63.9	0
Ni	120.0	0
Sn	6838.9	0
Zn	106.0	0
Ga	3829064	1500.9
In	1586685	4.3

Figura 26. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-10 (Residuo regeneración metal liquido-lote 1). Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

En la Figura 27 se muestran los resultados del residuo R11 (Residuo regeneración metal liquido-lote 2). Como se puede observar en este residuo se lixivió Ga (5110.5 ± 13.1 mg/Kg), In (764.02 ± 58.7 mg/Kg) a los cuales les corresponde un porcentaje de 0.07% para Ga y 0.007% para In.

Metales	Concentración de metales en el residuo (mg/Kg)	Metales lixiviados (mg/kg)
Al	72158.0	0
Cr	1161.2	0
Cu	2350.5	0
Fe	5344.0	0
Li	155.5	0
Mg	1412.9	0
Mn	55.9	0
Ni	517.7	0
Sn	57847.8	0
Ga	7579113	5110.5
In	11000000	764.02

Figura 27. Evaluación de la habilidad de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 de lixiviar metales contenidos en el Residuo-11 (Residuo regeneración metal liquido-lote 2). Tabla de concentración de metales lixiviados (mg/Kg)

10 CONCLUSION

Las condiciones en las que se observó una mayor actividad sulfooxidante de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 fue una temperatura de 30°C y un tamaño de inóculo de 2×10^8 UFC/mL.

De los doce residuos ensayados solo en nueve de ellos se mostró una actividad sulfooxidante por *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 al crecer el cultivo en presencia del residuo más azufre ambos al 1 %.

La cuantificación de metales por ICP-OES en los nueve residuos donde se observó actividad microbiana indican que los residuos que presentan mejores resultados en cuanto a lixiviación de metales fueron los residuos R7 (Catalizador-IMP “Desact-ULSD/2010”) y R8 (Catalizador-IMP “CAT_US”) observando la mayor cantidad de metales lixiviado, siendo para el residuo R7 Aluminio, 9.5mg/Kg (0.49%); Fierro, 38.5 mg/Kg (4.37%); Iridio, 0.4 mg/Kg (3.25%); Osmio, 0.2 mg/Kg (4.65%) y Platino, 0.4 mg/Kg (2.65%). Para el residuo R8 Aluminio, 110.7 mg/Kg (0.23%); Fierro, 364.8 mg/Kg (0.83%); Manganeso, 0.7 mg/Kg (0.12%); Titanio, 310.6 mg/Kg (2.86%); Osmio, 0.8 mg/Kg (0.28%); Platino, 0.1 mg/Kg (33.33%) y Rutenio 0.2 mg/Kg (0.13%). Por lo que la cantidad de metales lixivios por *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 depende de la naturaleza y carga metálica del residuo.

La realización de este trabajo contribuyó a la determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM26636 en presencia de residuos contaminados con metales y con ello poder llevar de manera adecuada el tratamiento de biolixiviación.

SUGERENCIA

De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo de la elaboración de este proyecto y de las condiciones óptimas establecidas para el crecimiento de la bacteria, otras temperaturas a la que la bacteria podría tener un buen crecimiento serían a 25°C y 35°C ya que de acuerdo a los experimentos realizados a dichas temperaturas hay producción de sulfatos, el pH disminuye y por lo tanto hay producción de ácido sulfúrico.

11 BIBLIOGRAFÍA

1. Acheampong, M., Meulepas R., Lens P. (2010). Removal of heavy metals and cyanide from gold mine wastewater. *Chemical Technology and Biotechnology*. 590-613.
2. Acuna, A. (2012). Aluminio en el suelo.
3. Agudelo J., Betancur, J., Martínez, W., Castañeda, C. (2002), Biolixiviación de minerales sulfurosos. *Revista Facultad de Ingeniería*, 110-122.
4. Ahemad, M., Kibret M. (2013). Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: a review. *ResearchGate*, 1-9.
5. Cervantes, C., Saldaña, A., Aguilar, F. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 1-8.
6. Díaz, Y., Acosta, S., Barrios, Y., Mustelier, S., Contrera, R., González, F. (2016). Caracterización de un consorcio bacteriano sulfooxidante aislado de un sistema de Biofiltración de gas natural. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 1-7.
7. Dirección General de Equipamiento e Infraestructura en Zonas Urbano-Marginadas. SEDESOL. México. 2013.
8. Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas, Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental. Semarnat. México. 2012.
9. EroskiConsumer. (2001). Metales Pesados. Marzo 2001, de CONSUMER Sitio web: <http://revista.consumer.es/web/es/20010301/medioambiente/27009.php>
10. García, R., Rojas, N., Aburto, J., Hernández, R., Gómez, M. (2014). Bacterial cultures of *Acidithiobacillus thiooxidans* and their use in the treatment of materials containing sulfur-compounds.
11. Gómez, M., Zarco, K., Aburto, J., de León RG., Rojas, N. (2013). Microbial treatment of sulfur-contaminated industrial wastes. NCBI.
12. Gómez, Y., Coto, O., Vázquez, L., Hernández, C. (2000). Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 1-5.
13. Gonzales, Ma., Pastor, A. (2004). Guía sobre suelos contaminados. Zaragoza. 17-20.
14. Govender, E., Harrison, S., Bryan, C. (2015). Effect of physico-chemical and operating conditions on the growth and activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in a simulated heap bioleaching environment. *ELSEVIER*, 1-13.

15. Guerrero, J.J. (1994). Factores ambientales en el manejo de bacterias ferrooxidantes mundo minero, 36.
16. Hernández, S., García, J., Peña, J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 40-43.
17. INEGI. Censos Económicos, Módulo de Medio Ambiente, 2009.
18. Jaishankar, M., Tseten, T. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *NCBI*, 60-72
19. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, 22 de mayo de 2015.
20. Mejía, E., Ospina, J., Osorio, B., Márquez, M., Morales, A. (2011). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 132-143.
21. Nareshkumar, R., Nagendran, R., Parvathi, K. (2007). Bioleaching of heavy metals from contaminated soil using *Acidithiobacillus thiooxidans*: effect of sulfur/soil ratio. *World J Microbiol Biotechnol*, 1-8.
22. NOM-141-SEMARNAT-2003, Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, 13 de septiembre de 2004.
23. NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, 02 de marzo de 2007.
24. NOM-052-SEMARNAT-2005. Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, 23 de junio de 2006.
25. NOM-053-SEMARNAT-1993. Diario Oficial de la Federación, Estados Unidos Mexicanos, 22 de octubre de 1993.
26. Rawlings, D., Kusano T. (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiological Reviews*, 39-55.
27. Raymond Chang. (2007). *Química*. China: McGraw-Hill Interamericana.
28. Rodríguez, M. (2002). Tratamiento de residuos peligrosos. 2009, de *El ergonomista*.

29. Segura Pachón, D. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias ferrooxidantes y sulfooxidantes del área minera de Riotinto. (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, Sevilla.
30. SEMARNAT. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México. 2013.
31. Stavelot, M. (2009). Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile.
32. Suárez, P., Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. Revista: Interciencia, 1-6.
33. Viera, M., Semenza, M., Curutchet, G., Donati, E. (2000). Importancia de *Thiobacillus caldus* en la lixiviación de sulfuros metálicos. IV Coloquio Latinoamericano de Fractura y Fatiga, 1-6
34. Vullo, Diana L.; (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 93-104.
35. Willis, G. (2016). Biorremediación de metales pesados por sulfidogénesis utilizando comunidades y microorganismos sulfato-reductores. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata.
36. Yagnentkovsky, N. (2011). Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata.
37. Yin, H., Zhang, X., Li, X., He, Z., Liang, Y., Guo, X., Hu, Q., Xiao, Y., Cong J., Ma, L., Niu J., Liu, X. (2014). Whole-genome sequencing reveals novel insights into sulfuroxidation in the extremophile *Acidithiobacillus thiooxidans*. *BMC Microbiology*, 1-14.