PAUTAS PARA LA UTILIZACION DE MICROORGANISMOS EN LIXIVIACION

RESUMEN

Este artículo está relacionado con el rol especial de la microbiología en las industrias metalúrgicas (lixiviación de metales). Los fenómenos microbiológicos son raramente identificados como tales por el ingeniero o el metalurgista y frecuentemente son explicados como fenómenos misteriosos. Por lo que se plantean en forma clara las técnicas empleadas para aislar, identificar, adaptar las bacterias a operaciones de Lixiviación de minerales y para hacer el trabajo más objetivo se describe y se discute una experiencia realizada con Thiobacillus thiooxidans en la obtención de ácido sulfúrico.

Ing. LUIS MOSCOSO YAÑEZ

Laboratorio Hidrometalúrgico del INCITEMI – Arequipa

1.0 – ANTECEDENTES

1.1 La recuperación del cobre de minerales de baja ley existentes en Perú y Bolivia, llevó a los expertos de la Junta del Acuerdo de Cartagena a pensar en técnicas apropiadas, económicas y fáciles de aplicar para utilizar lo que se estaba perdiendo. Se propuso entonces, un programa andino de desarrollo tecnológico que se adelantaría en estos dos países, en el área de la Hidrometalurgia del Cobre. La Comisión lo aprobó en las Decisiones 86 y 87.

1.2 El Programa delineó tres proyectos :
a) Lixiviación química
b) Lixiviación química y/o bacterial
c) Recuperación del cobre por Intercambio Iónico y Electrodeposición.

1.3 Dentro de las investigaciones que se vienen desarrollando en este Programa, tenemos la identificación, aislamiento y comportamiento de las bacterias; los datos que se obtengan serán de suma importancia, ya que se tendrá mayor información de la actividad bacterial, que permitirá un buen diseño de los botaderos.

2.0 – GENERALIDADES

2.1 Clasificación de Bacterias :

Es muy necesario para contribuir a la identificación de algún organismo desconocido el clasificarlo o lograr una adecuada ubicación taxonómica.

Las bacterias sulfurosas u oxidantes del azufre o compuestos azufrados, pertenecen a la clase Eschizomicetes, son unicelulares, móviles de reproducción indirecta por división, al orden seudomonadales son bastoncitos curvos que se encuentran comprendidos dentro de la familia thiobacteriaceal y el orden thiobacillus.

Se pueden clasificar de acuerdo a sus necesidades de oxígeno o al tipo de nutrientes que necesitan:

A.- **Aeróbicas:** son bacterias que necesitan del oxígeno del aire para poder subsistir.

B. – **Anaeróbicas:** son aquellas bacterias que pueden subsistir solo en medios privados de oxígeno del aire.

Dentro de esta aerobiosis y anaerobiosis, podemos encontrar por ejemplo :

a) **Aeróbicas Estrictas:** son aquellas bacterias que necesitan del oxígeno del aire para poder subsistir y en ausencia de él perecen o desaparecen.

b) **Anaeróbicas Estrictas:** son aquellas que no toleran el oxígeno del aire, toman el oxígeno por fermentación o reacciones de reducción de un subtrato.

c) **Anaeróbicas aerotolerantes o facultativas:** son aquellas que, siendo anaeróbicas, pueden tolerar algo de oxígeno en proporciones muy variables.

Clasificación desde el punto de vista trófico :

a) **Autotróficas:** son bacterias que obtienen los elementos necesarios para sintetizar proteínas necesarias para subsistir de reacciones químicas entre sustancias inorgánicas que emplean como fuente energética.

b) **Heterótrofas:** se nutren de sustancias orgánicas que han sido sintetizadas por otros organismos.

2.2 Identificación de Bacterias :

Es muy importante para identificar bacterias, hacer uso de coloraciones del cuerpo del microorganismo para observar su estructura interna o externa, puesto que las bacterias son incoloras, por lo cual es imposible observar al microscopio y determinar en una primera instancia su morfología.

Las coloraciones pueden ser :

a) Simples: cuando sólo interviene un colorante
b) Compuesta: cuando intervienen dos o más colorantes y se efectúan en varios tiempos.

Coloración de Gram: es una coloración indispensable en bacteriología, además es diferencial para los microorganismos y son :

A. – Gram positivas: son aquellas bacterias que retienen el colorante violeta genciana y no se decoloran por el alcohol; toman un color violeta.

B. – Gram Negativas: son aquellas bacterias que pierden el colorante violeta de genciana por decoloración con alcohol y necesitan ser teñidas por un colorante de

contraste que es la safranina, adquieren una coloración roja.

Fundamento: es diferenciar en dos grupos a las bacterias de acuerdo a la constitución de la cubierta o membrana celular. Así, en el caso de las Gram-Negativas, el colorante ácido safranina reacciona con la gran cantidad de lípidos de la cubierta y forma un complejo de color rojo.

Procedimiento :

a) Preparar un frotis
b) Fijar la preparación a la llama
c) Hacer actuar violeta de genciana más cinco gotas de bicarbonato de sodio en solución durante 1 minuto.
d) Lavar con agua corriente y cubrir la preparación con lugol por 3 minutos.
e) Lavar con agua corriente y decolorar con alcohol de 95º durante 8 segundos.
f) Cubrir el frotis con safranina 3 minutos.
g) Lavar con agua corriente, secar y observar al microscopio.

Coloración de Ziehl-Neelsen: es también una coloración diferente en bacteriología.

Fundamento : hay bacterias que luego de colorearse forman un complejo difícil de decolorar, ya sea con alcohol e incluso con alcohol ácido, por lo cual se les denomina "ácido resistente", toda la cubierta externa de la bacteria adquiere una coloración roja.

Procedimiento :

a) Preparación del frotis
b) Fijar al calor
c) Cubrir la preparación con colorante de Ziehl–Neelsen (fucsina fenicada) y calentar hasta aparición de vapores, durante 5 minutos.
d) Lavar con agua de caño.
e) Decolorar con alcohol ácido (alcohol de 95º al 3 o/o en HCI)
f) Lavar con agua y añadir azul de metileno por un minuto.
g) Lavar, secar y observar al microscopio.

Existen otros procedimientos de coloración que también se pueden emplear.

2.3 Tipos de Nutrientes o Medios de Cultivo :

Son preparaciones estériles que contienen sustancias nutritivas necesarias para el desarrollo del microorganismo, como sales inorgánicas (sulfatos, nitratos, etc.) sustancias orgánicas (carbohidratos, etc.), pectidas, etc.
Estos pueden ser :

A. – **Medios de cultivo Comunes**: se usan para el cultivo y conservación de la mayoría de los gérmenes. Ejem. Agar simple.

B. – **Medios de Cultivos Especiales**: sirven para el cultivo de bacterias exigentes en materiales nutritivos y para aislamiento de gérmenes:

Los medios especiales pueden ser :

a) Mejorados: son los medios básicos más sustancias de alto valor nutritivo.
b) Selectivos o de Diagnóstico: que estimulan el crecimiento de una especie microbiana inhibiendo el desarrollo de otros morfológicamente semejante.
c) Diferenciales : son medios adicionados de indicadores que ponen de manifiesto determinadas propiedades bioquímicas. Ejem. desprendimiento de gas (en casos de fermentación).

Para el cultivo de Bacterias Sulfurosas se emplean dos tipos de nutrientes: Bacto thiobacillus y el 9K de SILVERMAN y LUNDGREN.

a) El Nutriente 9K es un medio de cultivo selectivo porque estimula el crecimiento de una especie que es el thiobacillus ferrooxidans; además puede considerarse como un medio diferencial, porque pone de manifiesto la propiedad que tienen estas bacterias de oxidar el Fierro de ión "ferroso" a "férrico", lo cual se puede observar por el cambio de coloración o por análisis cuantitativo para apreciar la cantidad de fierro oxidado por las bacterias.

   Su constitución es a base de sales : (9K)

   – Sulfato de amonio .....3.00 gramos
   – Sulfato de magnesio 0.50 gramos
   – Cloruro de Potasio .....0.10 gramos
   – Monofosfato de Potasio .....0.39 gramos
   – Sulfato ferroso.....44.00 gramos
   – Nitrato de Calcio .....0.01 gramos

b) Nutriente Bacto thiobacillus, es un medio especial que sirve para estimular el

crecimiento de bacterias exigentes en material nutritivo a base de sales inorgánicas y con una alta concentración de iones hidrógeno, este medio de cultivo permite el desarrollo de todas las bacterias oxidantes del azufre; es decir, es específica para el género thiobacillus y sus numerosas especies.

Su constitución es a base de sales :

- Tiosulfato de sodio .....5.00 gramos
- Sulfato de amonio .....0.40 gramos
- Monofosfato de potasio .....4.00 gramos
- Cloruro de calcio .....0.25 gramos
- Sulfato de magnesio .....0.50 gramos
- Sulfato ferroso .....0.01 gramos

Este medio da muy buenos resultados cuando se emplea en sólido con 1.2 gramos de agar; para observar el crecimiento de las colonias.

2.4 Control de la Población Bacterial :

Una manera de determinar si las bacterias están en un medio propicio para su desarrollo, es observando el crecimiento poblacional, es decir, si hay aumento del número de ellos, esto es debido a que tienen condiciones óptimas para su desarrollo.

Este control se puede hacer por los métodos siguientes :

a) Mediante el empleo de la cámara Neubauer, que permite contar el número de bacterias en un volumen determinado (puede ser bacterias/mm^3).
b) Método Indirecto: es por disoluciones de acuerdo al número de colonias que crecen en una placa; se sabe el número de bacterias vivas en toda el área de la placa, empleando una disolución conocida de cultivo líquido, por ejemplo de 1:100 o de 1:100,000. Se sabe el número de bacterias por cm^3.

3.0 – INTRODUCCION

La lixiviación de minerales sulfurados data de siglos, pero sólo a comienzos de la década del 50 se demostró que las bacterias juegan un papel activo en este proceso de oxidación. Ejemplos de lixiviación bacterial son las operaciones de DUMP leaching en el Sud-Oeste de Estados Unidos (producen el 10 o/o del cobre de EE.UU.) y la lixiviación de minerales de Uranio en Elliot Lake (Ontario Canadá). La importancia del proceso radica en la explotación de fuentes de baja ley con una inversión y costo de operación bajos.

3.1 Los parámetros más importantes que se deben considerar en este tipo de lixiviación son:

a.– Una fuente de substrato (mineral sulfurado o ión ferroso, Pirita si se trata de mineral oxidado).
b.– Suministro de oxígeno, el cual sirve como receptor de electrones en el proceso de oxidación.
c.– Suministro de dióxido de carbono que constituye la única fuente de carbono para el microorganismo.
d.– Suficiente cantidad de nutrientes incluyendo amonio, fosfato y trozos de otros elementos requeridos para el metabolismo del organismo.
e.– Medio ambiente ácido, ya que la bacteria es activa entre pH 1.5 - 3.5.
f.– Agua para el transporte de los nutrientes y como solvente para el sulfato producido.
g.– Influye en la velocidad de lixiviación la temperatura, siendo la óptima 35°C.

3.2 Según las condiciones de lixiviación, el tipo de mineral tratado y de la bacteria usada, el mecanismo de lixiviación bacterial puede ser un ataque directo al mineral sulfurado o bien un mecanismo indirecto en que la bacteria oxida el ión ferroso a férrico, el cual actúa como agente oxidante.

Ataque directo :

a) Calcopirita

$$Cu\ FeS_2 + 4\ O_2 \xrightarrow{Bact.} CuSO_4 + FeSO_4$$

b) Pirita

$$FeSO_2 + H_2O + 3.5\ O_2 \xrightarrow{Bact.} FeSO_4 + H_2SO_4$$

El sulfato ferroso formado como resultado del ataque a la Calcopirita y Pirita, es oxidado por la bacteria a sulfato férrico.

$$4\,FeSO_4 + 2H_2SO_4 + O_2 \text{ ---- } 2\,Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O$$

Ataque Indirecto :

El sulfato férrico formado es un lixiviante efectivo oxidando a los sulfuros como sigue :

a) Calcopirita

$$CuFeS_2 + 2Fe_2(SO_4)_3 + H_2O + 3O_2 \text{ ---- } CuSO_4 + 5FeSO_4 + 2H_2SO_4.$$

b) Pirita

$$FeS_2 + Fe_2(SO_4)_3 \text{ -- } 3\,FeSO_4 + 2S^o$$

El azufre es oxidado a sulfato por la acción bacterial según :

$$S + H_2O + 3/2\,O_2 \text{ ------ } H_2SO_4$$

3.3 Un problema de mucha importancia en la hidrometalurgia, es el mejoramiento de la extracción metálica en las operaciones de lixiviación de los minerales sulfurados de baja ley. Los primeros trabajos fueron hechos por Rudolfs A. Helbronmer en el New Jersey Agricultural Experiment Station. De estos estudios, parece evidente que ciertos microorganismos no-identificados sulfooxidantes eran capaces de convertir la pirita y los sulfuros de zinc en sus respectivos sulfatos. La oxidación bacterial de la pirita ha sido investigada posteriormente, especialmente en relación con las curiosas observaciones hechas con respecto a las corrientes naturales de agua en las proximidades de las formaciones piríticas. En estas aguas conteniendo sulfato ferroso, los sulfatos férricos básicos fueron precipitados, pero simultáneamente el pH del agua se encontró que bajaba rápidamente y el precipitado de color ocre fue lentamente redisuelto, poniendo a las sales férricas en solución.

Un estudio completo de este fenómeno fue efectuado en los estados de West Virginia y Pensilvania, donde los afluentes de minas de carbón bituminoso se reportaron, estar contaminados por las altas acideces y altas concentraciones de Fe.

Esto condujo a la separación en 1949 por A.R. Colmer, K.L. Temple y M.E. Himble de una nueva bacteria autotrófica a partir del hierro, lo cual se demostró caía dentro del género "thiobacillus" que oxidaba el hierro. El nombre específico de th. ferrooxidans fue sugerido para este organismo. Se caracteriza por su habilidad para oxidar el ión ferroso muy rápidamente en soluciones ácidas y su incapacidad para crecer sobre S elemental; sin embargo, es capaz de crecer usando tiosulfato como la única fuente de energía y aumentar la formación de ácido a partir de la pirita.

Sin embargo, M. P. Silverman y D.G. Leundgren, usando "F. Ferrooxidans" han observado una lenta pero significante oxidación de S^o. La otra nueva bacteria "F. Sulfooxidans", fue aislada en 1960 por N.A. Kinsel. Se caracteriza por usar tanto el Fe^{+2} como el S elemental como fuentes de energía.

Aunque una evidencia definitiva del rol de las bacterias en la oxidación de los sulfuros de hierro que estaban presentes en los lechos de carbón ya había sido presentada, un nuevo avance importante hacía la posible aplicación de los microorganismos en la lixiviación de los minerales de baja ley, fue hecho con el descubrimiento que estos microorganismos eran por lo menos responsables parcialmente por el cobre encontrado en solución, en Kenecott Copper; Bingham Canyon en el agua de mina.

Un programa intensivo de investigación experimental fue conducido, en relación con este descubrimiento, en Brigham Young University, bajo el auspicio de Kenecott Copper Corporation. Unos años después, una patente americana, sobre un proceso de lixiviación empleando bacterias oxidantes de fierro fue concedida a Kenecott Copper Corporation. Dos tipos de bacterias autótrofas "th. thiooxidans" y "th, ferrooxidans", han sido identificados en los flujos de lixiviación brotando de los "Dumps" de desechos de roca en Bingham Canyon Utah.

Futuras investigaciones de las características de la oxidación del Fe^{+2} por las bacterias fuertemente acidofílicas, encontradas en algunas aguas de mina de carbón bituminoso de los V.S.A. guiaron a la separación de otras dos bacterias autótrofas oxidantes de fierro, designadas respectivamente como "Ferrobacillus Ferrooxidans" y "ferrobacillus Sulfooxidans". La primera se aisló

en 1954 por N.W. Lesthon y S.A. Braley. Ella oxida el Fe^{+2} al estado férrico rápidamente dentro del rango de pH de 2 – 4.5 aunque fracasa para oxidar el tiosulfato ácido y el S^o elemental.

Estudios similares sobre aislamiento e identificación de las bacterias fueron realizados por U.S. Bureau of Mines en muestras de agua de varias minas de cobre de Arizona. Ellos indicaron la presencia de tres especies. La primera "th. concretivorus" es un organismo oxidante del S^o, muy similar al "Th. thiooxidans", excepto que usa nitratos lo mismo que iones amonio como fuente de nitrógeno. La segunda "Fe. ferrooxidans" la cual usa solamente hierro y la tercera que usa ambos Fe^{+2} y S^o y ha sido colocada con la American Type Culture Colletion en Washington, D.C. bajo el catálogo No. 13728. En Inglaterra, las investigaciones realizadas por el Departamento de Investigaciones Científicas e Industrial deben ser mencionadas; ellos establecieron la presencia de "Fe ferrooxidans" y "th. thiooxidans".

Las bacterias que aquí serán consideradas como ayuda a nuestra experiencia en los procesos de lixiviación, pertenencen al género "thiobacillus".

La especie más conocida es el "thiobacillus thiooxidans". Este microorganismo fue aislado por primera vez del suelo por S.A. Woksman and J.S. Joffe, hace 40 años. Es una bacteria autótrofa, la cual usa el S^o elemental, SO_2 y tiosulfato como fuente de energía y obtiene su carbono del CO_2. Posteriores trabajos de investigación sobre estas bacterias se hicieron debido a las características singulares que presentan, tales como :

a) Su indiferencia a las altas concentraciones de ácido.
b) Su crecimiento más rápido en el rango de pH 2 - 3.

Las bacterias de esta clase prestarían su ayuda en la lixiviación por la producción de ácido sulfúrico a partir del S^o.

3.4 W. W. Leathen y sus colaboradores expresan que la pirita en solución bacteriana de los sulfuros de cobre, cada bacteria tiene su rol específico :

a) Los ferrobacillus ferrooxidans, oxidan los iones ferrosos en iones férricos, pero no oxidan los sulfuros y los thiosulfatos.
b) Los thiobacillus ferrooxidans, tienen un rol semejante a los anteriores, pero además oxidan a los thiosulfatos en ácidos sulfúricos. No oxidan el azufre elemental.
c) Los thiobacillus thiooxidans, por el contrario, oxidan el azufre elemental y los thiosulfatos en ácidos sulfúrico.
En la producción del nitrógeno utilizan los iones amonio. No pueden oxidar los iones ferrosos o utilizar los nitritos como fuente del nitrógeno.
d) Los thiobacillus concretivorus, tienen una acción semejante a la anterior, pero utilizan como fuente del nitrógeno los iones amonio y los iones nitrato, no siendo bien definido su acción sobre los nitritos.
e) Los thiobacillus neopolitamus, utilizan igualmente bien amonio, nitrato y nitrito como fuente del nitrógeno.

3.5 Del resultado de las experiencias realizadas en los diversos minerales sulfurados, se postula tres principales mecanismos de puesta en solución :

A) Absorción del oxígeno y formación de complejos solubles.
B) Formación de productos intermedios.
C) Disolución electroquímica de las superficies.

Como ejemplo del primer mecanismo se ha imaginado un esquema para la pirita basado en la fijación, sobre cada sitio en el retículo del FeS, de una molécula del O_2.

$$FeS_2 \xrightarrow{O_2} FeS_2.O_2 \xrightarrow{O_2} FeS_2.2O_2 \longrightarrow 2\,FeSO_4 + 2S$$

Los investigadores partidarios del segundo mecanismo, postulan un modelo que en su primera etapa conduce al ataque del sulfuro con H_2SO_4 con liberación de hidrógeno sulfurado el que en etapa posterior, se oxida con oxígeno libre o azufre elemental:

$$MS + H_2SO_4 \longrightarrow MSO_4 + H_2S$$

$$2H_2S + O_2 \longrightarrow 2H_2O + 2S$$

4.0 – PARTE EXPERIMENTAL

Las bacterias sulfurosas se encuentran adheridas al mineral durante muchos años y para verificar esto se realizó la siguiente experiencia :

4.1 Se tomó una muestra de agua de lluvia, que lavó el mineral triturado y depositado en el PAD No. 3 de la mina de Cerro Verde y se hizo :

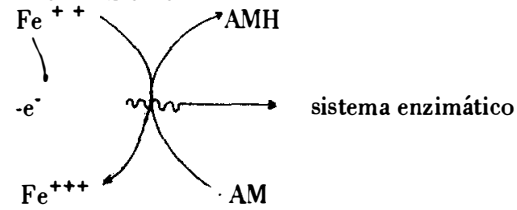
a) Examen a la gota pendiente, en que se observó organismos de diferentes formas, unos algo circulares, y otros alargados y gruesos, otros que presentaban uno de sus extremos abultados; es decir, se observó un gran número de microorganismos y todos ellos presentaban movimiento.
b) La solución tenía pH 4.6.
c) La población 22.3 x 10^8 bacterias/cm^3.
d) La solución presentaba 7 ppm. de cobre.
e) Eran todos microorganismos "gram negativos".

4.2 Oxidación Biológica: se dice que este tipo de bacterias son aeróbicas, tratando de determinar si son bacterias aeróbicas estrictas o facultativas, es que se realizó pruebas, cultivándolas en nutrientes 9K, uno de los cultivos era herméticamente cerrado, en el cual no se observó desarrollo de la población y por el contrario, las bacterias que fueron inoculadas se han capsulado.

En el cultivo con una oxigenación normal, se observa desarrollo de la población de bacterias y además por ser el "nutriente 9K" un medio selectivo, se observa que hubo oxidación del ión ferroso; esto prueba que las bacterias con el oxígeno del ambiente están activadas.

4.3 Acerca de la transferencia de electrones en la oxidación, se ha tratado de probar por una determinación cualitativa, empleando el azul de metileno (aceptor de electrones), lo siguiente :

En el Nutriente 9K



Los electrones liberados del ión ferroso por acción de un sistema enzimático pasan a las moléculas de azul de metileno, las cuales se reducen y decoloran, luego de aceptar los electrones de la oxidación.

Esto nos hace pensar que es el oxígeno del aire el que recibe los electrones de la oxidación para luego formar parte de la molécula de H_2SO_4 producida o para formar parte del vapor de agua que se forma en las paredes de los cultivos.

4.4 Producción de ácido sulfúrico por bacterias, con el objeto de determinar la existencia de la especie thiobacillus thiooxidans en aguas de mina; a partir de las experiencias enunciadas se viene realizando desde hace 108 días, una prueba con inóculo en nutriente 9K (A) y azufre, se espera que esta especie oxide el azufre elemental y produzca ácido sulfúrico.

Condiciones : se esterilizó 2 baterías de 7 erlenmeyers y en cada batería se realizó cultivos empleando (A) Azufre coloidal de 80 o/o de pureza con 0.1 o/o de Fe (B) Azufre molecular (Puro). Estas dos baterías de cultivos se incubaron durante 108 días, a una temperatura

Para A y B (baterías)

Aguas / Cultivo (ml)	CERRO PASCO	CERRO VERDE	INCITEMI	JULCANI	ESTREMA-DOYRO	TORO MOCHO	STA. ROSA
Nutriente 9K (A)	220	220	220	220	220	220	220
Inoculó (ml)	10	10	10	10	10	10	10
Azufre (gr)	1	1	1	1	1	1	1

de 29°C y humedad adecuada con un pH inicial de 2.0 que fue descendiendo hasta llegar en este tiempo a 1.2.

La posible formación de ácido sulfúrico estaría dada por la siguiente ecuación :

$$S + 1\text{-}1/2\,O_2 + H_2O \text{ ------ } H_2SO_4$$

Con un gramo de azufre (puro) puede producirse 3.06 grs.

Con el azufre colidal 80 o/o el ácido sería 2.44 grs.

Los valores obtenidos están dados en anexos A y B y sus respectivas gráficas.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Es de gran importancia tener un conocimiento sobre la clasificación de bacterias, su comportamiento y las técnicas utilizadas para su estudio. Esto permitirá una mejor aplicación de ellas en los procesos que a veces para el ingeniero son un poco oscuros.

5.2 Por las observaciones al microscopio, se ha podido determinar la morfología de la bacteria, son gram-negativas, aeróbicas y ácido resistentes; como resultado se puede afirmar la existencia de thiobacillus thiooxidans.

5.3 Como prueba complementaria una vez aislado el thiobacillus thiooxidans, se le inoculó en solución 9K (A) y se adicionó azufre, produciendo ácido a partir de él.

El azufre coloidal que contenía fierro en pequeña proporción produjo ácido más rápidamente, quizás por la acción oxidante del fierro.

6.0 BIBLIOGRAFIA

1. LUIS MOSCOSO YAÑEZ y MARY HERRERA MALDONADO
Informe No. 019-77-DRS/LAB. "Identificación de thiobacillus" Mayo 1977.

2. J. LANDESINAN D.W. DUNCAN & C.C. WALDEN
"Oxidation of inorganic sulfur compoiends by Washed call suspension of thiobacillus ferrooxidans". Can. J. Microbiol 1966 - 12, 957-64.

3. E. L. BAUER
"The aquons oxidation of elemental sulfur and sulfide ores" M. S. Thesis coll. Mineral sci and Tichn Bull (Montana) 1969, 68, 19-29.

4. A. J. SALLE
"Fundamental Principles of Bacteriology"
McGraw-Hill Book Company – Inc. de Nueva York

5. D. E. HUGHES, E.C. HILL
Microbiología y las Industrias Metalúrgicas. 1969, 68, 30-45

ANEXO A

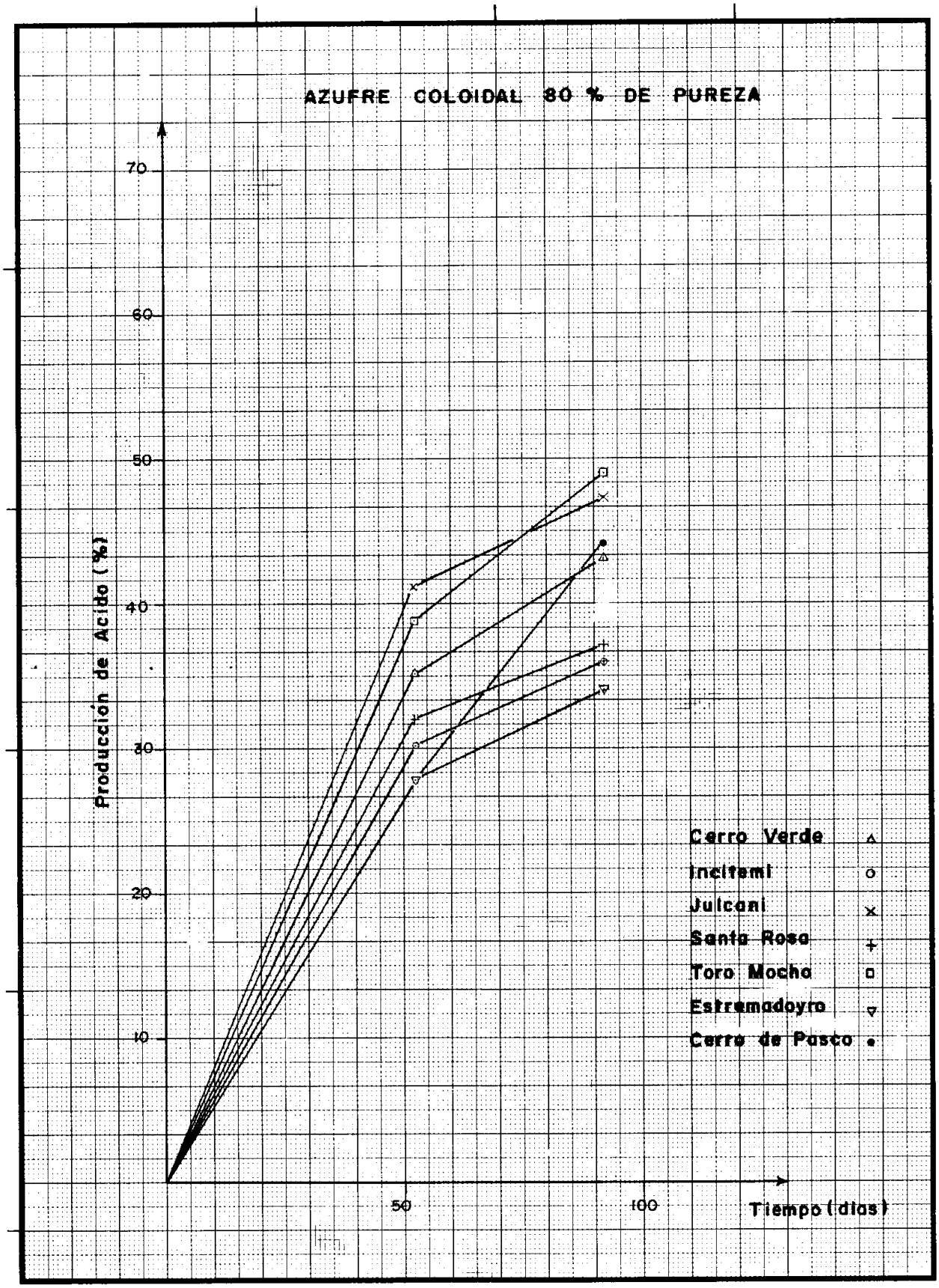
DATOS PARA EL AZUFRE COLOIDAL 80 o/o DE PUREZA

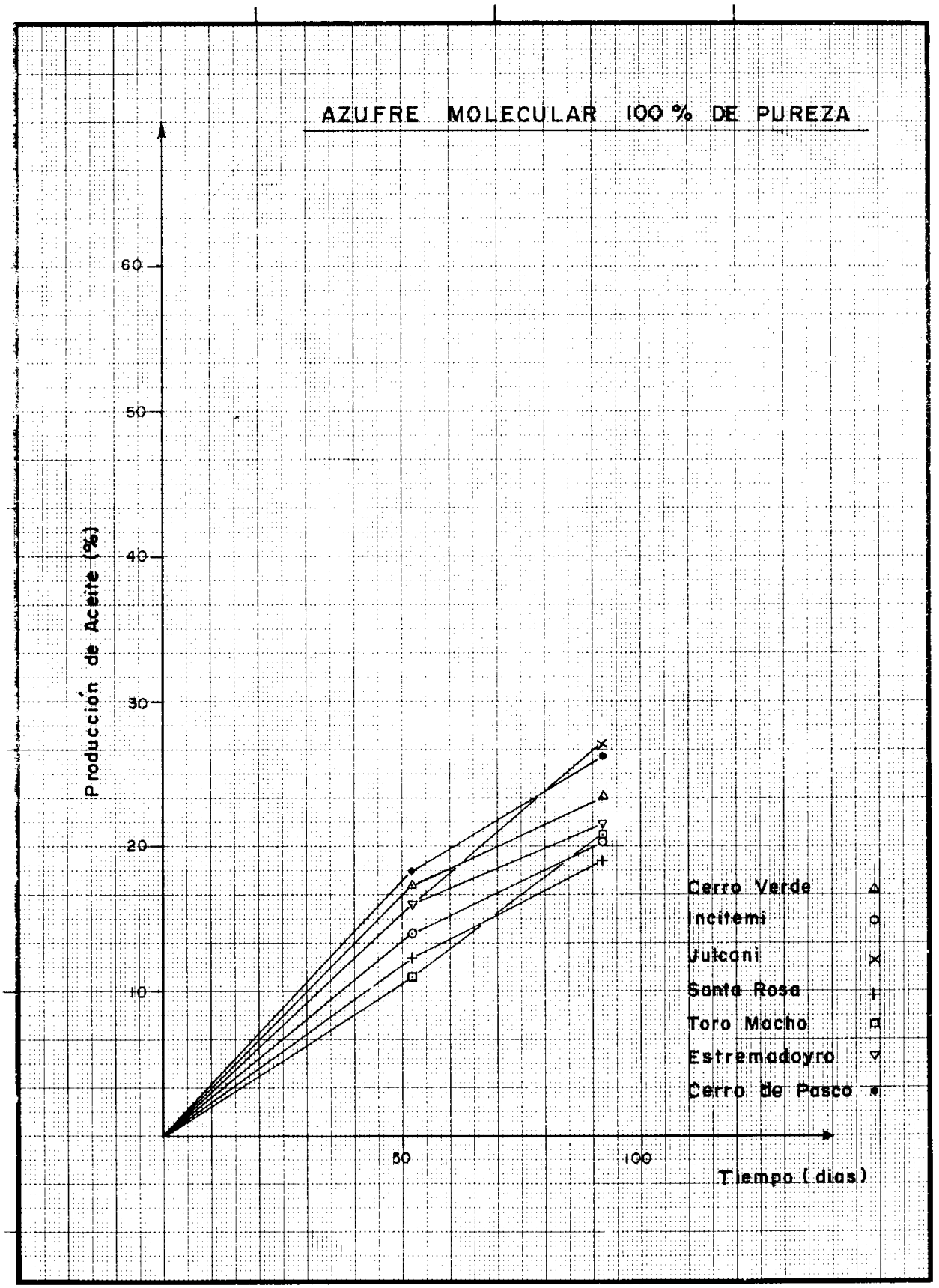
	Acidez Inicial (gr/l) pH=2		Acidez Final (gr/1)		Acidez Producida gr/1)		Acido producido 220 ml.			
							gramos	o/o	Gramos	o/o
Control	1	2	1	2	1	2	Primera		Segunda	
Cerro Verde	0.49	0.49	4.41	5.67	3.92	5.18	0.86	35.20A	1.07	43.90
Incitemi	0.49	0.49	3.85	5.10	3.36	4.61	0.74	30.30o	0.89	36.50
Julcani	0.49	0.49	5.10	6.96	4.61	6.47	1.01	41.40x	1.24	50.80
Santa Rosa	0.49	0.49	4.05	5.18	3.56	4;69	0.78	32.00+	0.91	37.30
Toro Mocho	0.49	0.49	4.86	6.72	4.37	6.23	0.96	39.3. □	1.20	49.20
Estremadoyro	0.49	0.49	3.68	4.86	3.19	4.37	0.70	28.7 ▽	0.84	34.40
Cerro de Pasco	0.49	0.49	3.68	6.23	3.19	5.74	0.70	28.7 •	1.08	44.20

ANEXO B

DATOS PARA EL AZUFRE MOLECULAR 100 o/o PURO

	Acidez Inicial (gr/1) pH=2		Acidez Final (gr/1)		Acidez Producida (gr/1)		Acido Producido 220 ml.			
							gramos	o/o	gramos	o/o
Control	1	2	1	2	1	2	Primera		Segunda	
Cerro Verde	0.49	0.49	2.91	4.29	2.42	3.80	0.53	17.32△	0.73	23.90
Incitemi	0.49	0.49	2.51	3.72	2.02	3.23	0.44	14.38o	0.62	20.30
Julcani	0.49	0.49	2.75	4.86	2.26	4.37	0.50	16.34x	0.82	26.80
Santa Rosa	0.49	0.49	2.19	3.64	1.70	3.15	0.37	12.09+	0.59	19.30
Toro Mocho	0.49	0.49	2.10	3.81	1.61	3.32	0.35	11.44□	0.62	20.60
Estremadoyro	0.49	0.49	2.75	3.89	2.26	3.40	0.50	16.34▽	0.66	21.60
Cerro de Pasco	0.49	0.49	3.00	4.78	2.51	4.29	0.55	17.97•	0.81	26.50


AZUFRE COLOIDAL 80 % DE PUREZA
Producción de Acido (%)
70
60
50
40
30
20
10
50
100
Tiempo (dias)
Cerro Verde
Incitemi
Julcani
Santa Rosa
Toro Mocho
Estremadoyro
Cerro de Pasco


AZUFRE MOLECULAR 100 % DE PUREZA
Producción de Aceite (%)
60
50
40
30
20
10
50
100
Tiempo (dias)
Cerro Verde
Incitemi
Julcani
Santa Rosa
Toro Mocho
Estremadoyro
Cerro de Pasco