



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA.

BIOLIXIVIACION DE PIRITAS POR *Acidithiobacillus ferrooxidans*  
Y CEPAS NATIVAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO  
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA.

MAURICE ANDRE MENADIER STAVELOT

PROFESOR GUÍA:

TOMÁS VARGAS VALERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

BLANCA ESCOBAR MIGUEL

FRANCISCO GRACIA CAROCA

SANTIAGO DE CHILE

ABRIL 2009

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL  
QUÍMICO E INGENIERO CIVIL EN  
BIOTECNOLOGÍA.

POR: MAURICE MENADIER STAVELOT

FECHA: 24/04/2009

PROF. GUÍA: Sr. TOMÁS VARGAS V.

“Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas”

El presente trabajo de título tiene por objetivo el estudio de la biolixiviación de pirita por un cultivo puro de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y por un consorcio de cepas nativas provenientes de la solución lixivante de la pilas de biolixiviación de Minera Escondida (PLS). El estudio se efectuó con una muestra de pirita purificada y de fina granulometría proveniente de relaves de Minera Escondida, la cual fue lixiviada en reactores de frascos agitados. El porcentaje de disolución del mineral se determinó a partir del monitoreo del hierro disuelto desde el mineral, cuantificado como la suma del hierro en solución más el hierro precipitado como jarositas. Los resultados de conversión del mineral en el tiempo se analizaron según el modelo del núcleo sin reaccionar. Se comparó también la eficiencia de la adherencia a pirita y la capacidad de oxidar azufre de ambos tipos de microorganismos.

Los resultados indicaron que la cinética de biolixiviación de pirita con *At. ferrooxidans* en soluciones con 2,4g/l de férrico se comporta de acuerdo a un control por difusión. El tiempo para alcanzar disolución total del sulfuro,  $\tau$ , en estas condiciones es de 833 días. Al aumentar la concentración de ion férrico a 5g/l la cinética de disolución de la pirita con este microorganismo pasa a ser controlada por reacción química y el valor de  $\tau$  se reduce a 141 días. Por otra parte la cinética de biolixiviación de pirita con las cepas nativas en soluciones con 1,8g/l de férrico se comporta de acuerdo a un control por reacción química y el valor de  $\tau$  en estas condiciones es de 122 días.

Los experimentos de adherencia mostraron que el 100% de las cepas nativas se adhiere a pirita mientras que la adherencia máxima de *At. ferrooxidans* alcanza a solo un 30% de los microorganismos presentes. Por otra parte la capacidad oxidativa de azufre a sulfato en las cepas nativas se registró de forma inmediata en los experimento de oxidación de azufre, mientras que para *At. ferrooxidans* la actividad se observó posterior a la semana de monitoreo.

Los resultados indican que la velocidad de biolixiviación de la pirita con los microorganismos nativos es mucho mayor que con la cepa pura de *At. ferrooxidans*. Este resultado parece estar determinado por la mayor capacidad de adherencia y de oxidación de azufre de los microorganismos nativos, lo que posibilita una eficiente disolución de subproductos pasivantes desde la superficie de la pirita. Sin embargo, esta capa también puede ser removida en presencia de *At. ferrooxidans* si se aumenta la concentración de ion férrico a 5g/l.

Finalmente, los resultados indicaron que la adherencia bacteriana en el caso de las cepas nativas favorece la disolución de la pirita, alcanzando una recuperación y velocidad de lixiviación más alta que en el caso sin adherencia.

*A mis padres, Julio y María Teresa  
y mis hermanas, Denise y Catherine*

## Agradecimientos

En primer lugar le doy gracias a mi familia por creer en mi y apoyarme en todas mis decisiones. Agradezco a mi madre y padre por confiar en mi y en mis capacidades, y darle la oportunidad y la libertad a su *conchito* de convertirse en un hombre por sus propios medios. A mi hermana Denise por todo el cariño que he recibido de su hermosa familia, y a mi hermana Catherine por mostrarme la fuerza que se necesita para lograr lo que uno quiere.

Gracias a mi pequeña angelita, Florencia, por transportarme con su alegría a esos momentos de infancia en que me bastaba con mi imaginación.

A Nonoy por ser mi compañera y amiga estos últimos años, gracias por soportarme y quererme como nadie nunca antes lo había hecho.

Agradezco a mis compañeros de toda la vida, aquellos que pese a la distancia siguen siendo mis mejores amigos: Claudio, Pashuco, Carlos y todos aquellos de ese ya lejano 4° medio B, Cocomchi 2002.

Gracias a Alejandra, Camila y Ricardo con quienes compartí la enriquecedora experiencia de dirigir el CEIQBT. Por tu amistad e increíble paciencia, gracias Marychanfli. Gracias por su compañía Marce, Panky, Vika y Cuchi-chan. A mis buenos amigos y futuros colegas, Igor y Ronpi. Por su buena onda y obligarme a jugar a la pelota, gracias Chicho, Jano, Sergio, Diego, Carlitos, Jaime y Daniel. A todos ustedes les deseo lo mejor en vuestras vidas.

Agradezco también por esos buenos y entretenidos momentos que viví en la antigua y ya derrumbada salita, lo que me hace recordar a varios que ya portan su título de InJenieros como aquellos que pronto nos seguirán.

Gracias Melanie por tu amistad. Muchas gracias a Emma y a las hermanitas Lazo por su apoyo y hacer más entretenido el trabajo en el laboratorio.

Deseo agradecer también el gran apoyo y los buenos consejos de mi jefe y profesor, Sr. Luis Amestica.

Por último, quisiera agradecer a mis profesores guías, Sr. Tomás Vargas y Sra. Blanca Escobar, por su apoyo y ayuda en el desarrollo de esta memoria.

Sé que hay muchos que se me quedan en el tintero, para todos ustedes mis más sinceros agradecimientos.

# Índice

1. Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1. Aspectos Generales.....	1
1.2. Antecedentes Bibliográficos.....	2
1.2.1. Disulfuro de hierro, Pirita.....	2
1.2.2. Lixiviación bacteriana.....	3
1.2.3. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y otros microorganismos de biolixiviación.....	4
1.2.4. Metabolismo bacteriano.....	5
1.2.5. Estudios de Biolixiviación de Pirita.....	6
1.3. Descripción del Proyecto.....	11
1.4. Objetivos.....	12
1.4.1. Objetivo General.....	12
1.4.2. Objetivos Específicos.....	12
1.5. Alcances.....	12
2. Capítulo 2: Metodología.....	13
2.1. Materiales.....	13
2.2. Métodos.....	14
2.2.1. Biolixiviación de pirita.....	14
2.2.2. Adherencia bacteriana sobre pirita.....	15
2.2.3. Biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana.....	15
2.2.4. Comparación de la generación de sulfato entre <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y cepas nativas.....	16
2.2.5. Métodos analíticos.....	16
3. Capítulo 3: Resultados.....	19
3.1. Adherencia Bacteriana sobre Pirita.....	19
3.2. Capacidad oxidativa de azufre por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y cepas nativas.....	21
3.3. Biolixiviación de Pirita.....	23
3.3.1. Biolixiviación de pirita por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> con concentración de ión férrico inicial: 2,4 g/l.....	23
3.3.2. Biolixiviación de pirita por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> con concentración de ión férrico inicial: 5 g/l.....	26

3.3.3.	Biolixiviación de pirita por cepas nativas provenientes de PLS Minera Escondida con concentración de ión férrico inicial: 1,8 [g/l].	29
3.3.4.	Comparación y análisis de experiencias de biolixiviación.	31
3.4.	Biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana por cepas nativas provenientes de PLS minera Escondida con concentración de ión férrico inicial: 1,8g/l.	34
4.	Capítulo 4: Discusión.	38
4.1.	Biolixiviación de pirita.	38
4.2.	Biolixiviación de pirita sin adherencia.	39
4.3.	Discusiones generales y recomendaciones.	40
5.	Capítulo 5: Conclusiones.	42
6.	Bibliografía.	43
7.	Anexos.	45
A)	Modelo del Núcleo sin Reaccionar.	45
B)	Tablas de datos: Biolixiviación de Pirita.	47
a.	Por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> con concentración de ión férrico inicial: 2,4 g/l. ....	47
b.	Por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> con concentración de ión férrico inicial: 5 g/l. ....	52
c.	Por cepas nativas provenientes de PLS Minera Escondida con concentración de ión férrico inicial: 1,8g/l.	57
C)	Tablas de datos: Adherencia Bacteriana.	58
D)	Tablas de datos: Comparación en la generación de sulfato entre <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y cepas nativas.	59
E)	Tablas de datos: Biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana.	60

## Índice de Figuras.

Figura 1: i) Celda cúbica centrada en las caras de la pirita, $a=0,542[\text{nm}]$ . ii) Celda ortorrómbica de la marcasita, $a=0,444[\text{nm}]$ $b=0,542[\text{nm}]$ $c=0,339$ . .....	2
Figura 2: Esquema de los distintos tipos de lixiviación de un sulfuro según Tributsh (Ballester 2005). .....	4
Figura 3: Mecanismo bacteriano que mejora la tasa de lixiviación de pirita. (Crundwell, 2003)...	7
Figura 4: Esquema del mecanismo de tiosulfato y polisulfuro en biolixiviación de sulfuros metálicos. MS = sulfuro metálico; $M^{2+}$ = ión metálico; $S_2O_3^{2-}$ = tiosulfato; $S_n^{2-}$ = polisulfuro con largo de cadena (n); $S_8$ = azufre elemental; Af, Lf, At= reacciones enzimáticas por <i>At. ferrooxidans</i> , <i>L. ferrooxidans</i> , y/o <i>A. thiooxidans</i> (Sand, 2001). .....	9
Figura 5: Estudio de granulometría de muestra de pirita. ....	13
Figura 6: Esquema de montaje de biolixiviación de pirita sin adherencia, se grafica la presencia del tubo separador que evita el contacto de las bacterias con el mineral de pirita. ....	16
Figura 7: Concentración de <i>At. ferrooxidans</i> en solución a pH 1,6 con agitación a 100rpm y 30°C de temperatura. ....	19
Figura 8: Concentración de cepas nativas en solución a pH 1,6 con agitación a 100rpm y 30°C de temperatura. ....	20
Figura 9: Porcentaje de adherencia bacteriana sobre pirita. ....	21
Figura 10: Variación del pH en el tiempo para experimentos de oxidación de azufre por <i>At. ferrooxidans</i> y cepas nativas a pH 2,3 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	21
Figura 11: Variación de la concentración de ión sulfato en el tiempo para experimentos de oxidación de azufre por <i>At. ferrooxidans</i> y cepas nativas a pH 2,3 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	22
Figura 12: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	23
Figura 13: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	24
Figura 14: Variación de la concentración de fierro total y ión férrico para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	24
Figura 15: Variación de la concentración de fierro total por método de o-fenantrolina y digestión por HCl para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	25
Figura 16: Recuperación de fierro para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	25
Figura 17: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	26

Figura 18: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 5 g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura..	27
Figura 19: Variación de la concentración de fierro total y ión férrico para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	27
Figura 20: Variación de la concentración de fierro total por método de o-fenantrolina y digestión por HCl para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	28
Figura 21: Recuperación de fierro para biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.....	28
Figura 22: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	29
Figura 23: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8 g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura..	30
Figura 24: Variación de la concentración de fierro total por método de o-fenantrolina y digestión por HCl para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.....	30
Figura 25: Recuperación de fierro para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.....	31
Figura 26: Comparación de los resultados en la recuperación de fierro desde la pirita para los diferentes experimentos.....	31
Figura 27: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 2,4g/l de ión férrico en solución.....	32
Figura 28: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por <i>At. ferrooxidans</i> con 5g/l de ión férrico en solución.....	32
Figura 29: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico en solución.....	33
Figura 30: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	34
Figura 31: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	35
Figura 32: Variación del fierro total en solución para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	35
Figura 33: Recuperación de fierro para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura. ....	36
Figura 34: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita sin adherencia por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico en solución. ....	37



Figura 35: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico en solución. ....	37
Figura 36: Esquema de proceso de lixiviación en el tiempo según modelo de núcleo sin reaccionar (Levenspiel). ....	45

## Índice de Tablas

Tabla 1: Algunas propiedades mecánicas y termodinámicas de la pirita y marcasita. ....	2
Tabla 2: Resultados del modelo de núcleo sin reaccionar para los diferentes experimentos de biolixiviación de pirita. ....	33
Tabla 3: Resultados del modelo de núcleo sin reaccionar para lixiviación por cepas nativas. ....	36
Tabla 4: Ecuaciones conversión tiempo del modelo de núcleo sin reaccionar. ....	46
Tabla 5: Tiempos para conversión total según modelo de núcleo sin reaccionar. ....	46
Tabla 6: Potenciales para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> . y 2,4g/l, valores en milivolts. ....	47
Tabla 7: pH para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 2,4g/l. ....	48
Tabla 8: Fe <sup>+2</sup> para biolixiviación por <i>At. fox.</i> y 2,4g/l, valores en ppm. ....	49
Tabla 9: Fe <sup>total</sup> para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 2,4g/l, valores en ppm. ....	50
Tabla 10: Fe <sup>+3</sup> para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 2,4g/l, valores en ppm. ....	51
Tabla 11: Fe <sup>tot</sup> por digestión con HCl y recuperación para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 2,4g/l, valores en ppm ....	51
Tabla 12: Potenciales para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 5g/l, valores en milivolts. ....	52
Tabla 13: pH para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 5g/l. ....	53
Tabla 14: Fe <sup>+2</sup> para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 5g/l, valores en ppm. ....	54
Tabla 15: Fe <sup>total</sup> para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 5g/l, valores en ppm. ....	55
Tabla 16: Fe <sup>+3</sup> para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 5g/l, valores en ppm. ....	56
Tabla 17: Fe <sup>tot</sup> por HCl y recuperación para biolixiviación por <i>At. ferrooxidans</i> y 5g/l, valores en ppm ....	56
Tabla 18: Potenciales para biolixiviación por cepas nativas, valores en milivolts. ....	57
Tabla 19: pH para biolixiviación por cepas nativas. ....	57
Tabla 20: Fe <sup>tot</sup> para biolixiviación por cepas nativas, valores en ppm. ....	57
Tabla 21: Fe <sup>tot</sup> por HCl y recuperación para biolixiviación por cepas nativas, valores en ppm. ..	58
Tabla 22: Adherencia de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> . ....	58
Tabla 23: Adherencia de cepas nativas. ....	58
Tabla 24: pH para ambos experimentos. ....	59
Tabla 25: Concentración de ión sulfato para ambos experimentos, valores en ppm. ....	59
Tabla 26: Promedios obtenidos para biolixiviación sin adherencia por cepas nativas. ....	60

# 1. Capítulo 1: Introducción.

## 1.1. Aspectos Generales.

La importancia económica de la producción de cobre en Chile impulsa el óptimo aprovechamiento de los recursos minerales explotados. El cobre se presenta fundamentalmente en dos formas: como minerales oxidados y como minerales sulfurados. Los primeros son fácilmente solubles por lo que son tratados por medio de lixiviación acida, mientras que los minerales sulfurados, principalmente calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), calcosina ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) y covelina ( $\text{CuS}$ ) en Chile, son insolubles incluso en ácidos concentrados. Es en este contexto que la biolixiviación o lixiviación bacteriana se presenta como una opción para recuperar metales de interés a través de su solubilización bajo la acción directa o indirecta de microorganismos desde, por ejemplo, botaderos y pilas.

Dependiendo de la composición del mineral sulfurado, la biolixiviación es una alternativa ventajosa con respecto a las tecnologías pirometalúrgicas. Si bien la lixiviación bacteriana es más lenta que la pirometalurgia en cuanto a la velocidad de obtención del metal, demanda menores inversiones de capital y menores costos de operación. Además se presenta como una tecnología más limpia que las practicadas comúnmente, debido a que no se emite  $\text{SO}_2$  al ambiente en su periodo de operación (Ballester 2005).

Es así, como la búsqueda de las condiciones óptimas de crecimiento y actividad de los microorganismos involucrados en estos procesos, es decir los parámetros que estimulan o inhiben su acción, se vuelve de vital importancia para la industria. Las mayores tasas de biolixiviación de minerales sulfurados, dentro de ellos el disulfuro de hierro o pirita, se alcanzan a altas temperaturas por la acción de microorganismos termófilos y termófilos moderados. Sin embargo, elevar la temperatura de una pila de lixiviación por inyección de calor a través de aire precalentado u otras alternativas, implica un costo adicional encareciendo el proceso.

La disolución de la pirita genera un calor de reacción considerable que permitiría elevar la temperatura en el interior de la pila permitiendo el desarrollo de microorganismos termófilos, facilitando posteriormente la biolixiviación de la calcopirita y otros sulfuros de cobre. En este contexto, el presente trabajo pretende identificar las condiciones óptimas para la lixiviación de la pirita debido al ataque biológico por una cepa pura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y por un cultivo mixto de cepas nativas provenientes de Minera Escondida.

## 1.2. Antecedentes Bibliográficos.

### 1.2.1. Disulfuro de hierro, Pirita.

El disulfuro de hierro ( $\text{FeS}_2$ ) se puede encontrar en abundancia en yacimientos minerales. Morfológicamente se distinguen dos tipos: la pirita de estructura cúbica y la marcasita de estructura ortorrómbica. Esta diferencia les proporciona además propiedades termodinámicas diferentes.

Tabla 1: Algunas propiedades mecánicas y termodinámicas de la pirita y marcasita.

	Valencia Fe	Color	Densidad [g/cm <sup>3</sup> ]	Dureza [Mohs]	Punto fusión [°C]	$\Delta H_f^\circ$ [KJ/mol]	Cp [J/°Cmol]
<b>Pirita</b>	+2	amarillo-metalico	5	6-6,5	1171	-178,24	62,17
<b>Marcasita</b>	+2	amarillo-bronce	4,88	6-6,5	450	-169,45	62,43

En particular la pirita tiene un 53,4% de azufre y un 46,4% de hierro y es comúnmente conocida como “oro falso” por su brillo y color similar al metal noble. En los yacimientos se pueden encontrar otros minerales con el mismo contenido de hierro y azufre pero asociados a otros elementos, tales como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y la arsenopirita ( $\text{FeAsS}_2$ ). (Lowson 1982).

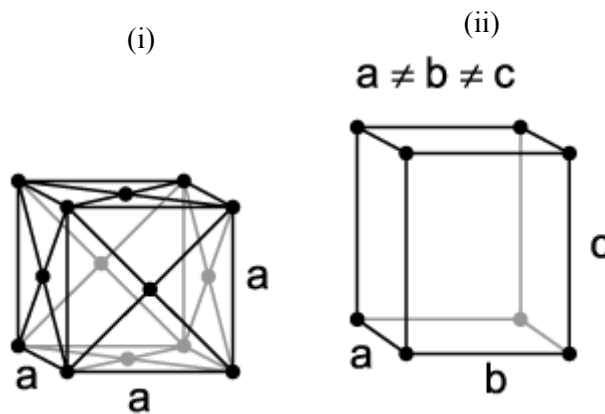
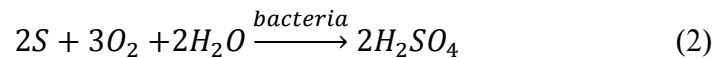
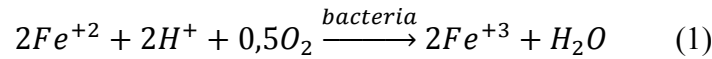


Figura 1: i) Celda cúbica centrada en las caras de la pirita,  $a=0,542[\text{nm}]$ . ii) Celda ortorrómbica de la marcasita,  $a=0,444[\text{nm}]$   $b=0,542[\text{nm}]$   $c=0,339$ .

### 1.2.2. Lixiviación bacteriana.

Los microorganismos presentes en los procesos de biolixiviación tienen un rol catalítico en la oxidación del ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) y del azufre elemental producidos durante la lixiviación química, a ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) e ion sulfato, respectivamente (Ecuación 1 y 2). Los iones férricos corresponden a los agentes químicos oxidantes que disolverán el sulfuro metálico (Ballester 2005; Watling 2006).



Los fundamentos bioquímicos de las reacciones de lixiviación han sido ampliamente estudiados en los últimos años, habiéndose propuesto 2 mecanismos para estos procesos:

- a) El primero consiste en la llamada “lixiviación indirecta” o “mecanismo indirecto”, en que la oxidación del sulfuro metálico se realiza a través de los iones férricos sin mediar contacto entre los microorganismos y la superficie o alguna reacción enzimática, combinada con la oxidación biológica de los iones ferrosos en solución obtenidos de la reacción anterior, como se muestra en la Ecuación 1 (Figura 2) (Watling 2006).
- b) La “lixiviación por contacto” o “mecanismo por contacto” supone que la mayoría de las células se adhieren a la superficie de los minerales sulfurados mediante exo-poli-sacáridos (EPS), lo que se traduce en la disolución del mineral producto de los procesos electroquímicos que tienen lugar en la interfaz entre la pared del microorganismo y la superficie del sulfuro (Figura 1) (Watling 2006).

Se añade a estos mecanismos la “lixiviación cooperativa”, que no es más que la presencia simultánea de los mecanismos anteriores, lo que podría traducirse en un suministro óptimo de energía química a partir de una superficie limitada de sulfuros favoreciendo la supervivencia de las bacterias (Figura 1) (Ballester 2005).

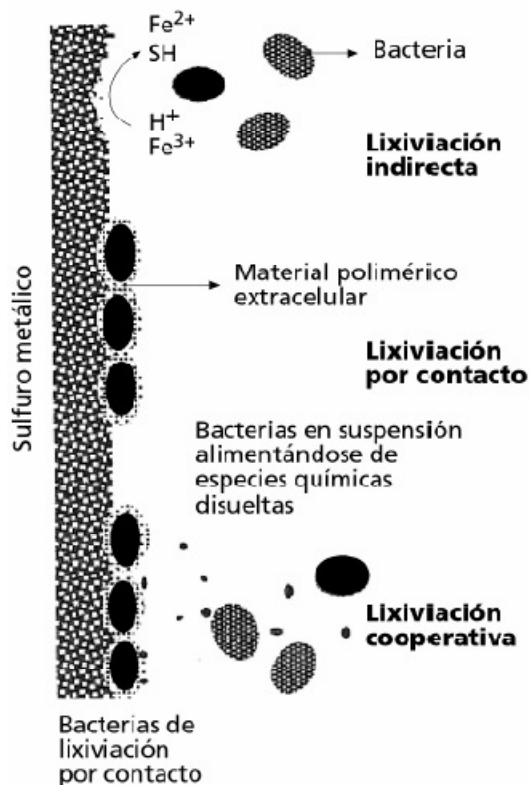


Figura 2: Esquema de los distintos tipos de lixiviación de un sulfuro según Tributsh (Ballester 2005).

### 1.2.3. *Acidithiobacillus ferrooxidans* y otros microorganismos de biolixiviación.

La mayor parte de los microorganismos involucrados en los procesos de biolixiviación se caracterizan por crecer quimiolitotróficamente en ambientes ácidos con pH menor a 3, con alta concentración de iones metálicos y por ser capaces de utilizar el ion ferroso o los compuestos de azufre reducido como fuente de energía (Rawling, 1998; Watling, 2006). Sin embargo, también se pueden encontrar microorganismos heterotróficos cuyo trabajo consiste en eliminar del ambiente los compuestos orgánicos presentes producto de la muerte celular o de desechos metabólicos de los microorganismos quimiolitótrofos (Brierley, 2000).

Los microorganismos asociados a estos procesos se clasifican según la temperatura a la que se desarrollan de forma óptima, encontrándose los mesófilos (temperaturas menores a  $40^{\circ}\text{C}$ ), termófilos moderados (temperaturas entre los  $40^{\circ}\text{C}$  y  $55^{\circ}\text{C}$ ) e hipertermófilos (temperaturas entre los  $55^{\circ}$  y  $85^{\circ}\text{C}$ ) (Brierley, 2000).

*At. ferrooxidans* es una bacteria del género *Acidithiobacilli*, mesófilas y se desarrollan en un rango de pH entre 1,8 y 2,0. Tiene habilidad para oxidar iones ferroso en soluciones de ácido sulfúrico obteniendo la energía necesaria para crecimiento y fijación de  $\text{CO}_2$ . *At. ferrooxidans* es útil principalmente para aplicaciones en la lixiviación de minerales debido a que esta bacteria puede oxidar sulfuros metálicos a sulfatos solubles en soluciones ácidas. La oxidación de materiales sulfurados es mediada por ión férrico el cual en la reacción es reducido químicamente a  $\text{Fe}^{2+}$  y reoxidado por *At. ferrooxidans*. De esta forma durante el proceso de biolixiviación, *At.*

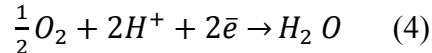
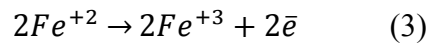
*ferrooxidans* mantiene favorable la razón  $Fe^{3+} / Fe^{2+}$  el cuál se refleja en el relativamente alto potencial redox en la solución de lixiviación (Grishin y Tuovinen, 1988).

Dentro del grupo de las bacterias mesófilas se encuentran también *At. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilium*. En el rango de la termófilas moderadas aparecen el *At. caldus*, *Leptospirillum thermoferrooxidans* y las del género de *Sulfobacillus*. Finalmente, los principales microorganismos termófilos son las arqueas del género *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* y *Sulfisphaera*, entre otras. (Rohwerder, 2003).

#### 1.2.4. Metabolismo bacteriano.

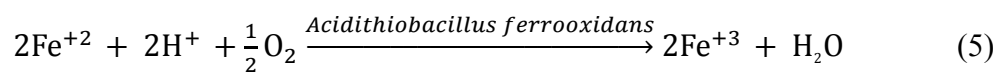
La bacteria utiliza rutas metabólicas que son comunes en organismos quimiolitótrofos. *Acidithiobacillus ferrooxidans* presenta el ciclo de Calvin para fijación de  $CO_2$  y rutas para fijación de nitrógeno y fosfato. El ciclo de Calvin necesita de la formación de ATP y NADPH. Ambas moléculas energéticas son obtenidas para este caso a través de la oxidación de ión ferroso con oxígeno.

Existen dos semi-reacciones que están relacionadas para la oxidación de ión ferroso, estas son:



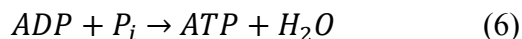
La bacteria no utiliza para su metabolismo al ión ferroso completo, solo utiliza un electrón ya que este ión no logra atravesar la pared celular, sin embargo, a través de ella si pueden pasar protones, moléculas de agua y oxígeno. Aquí comienza el transporte desde el exterior cruzando la pared celular, el transportador recibe el electrón que ha obtenido del ión ferroso y se reduce, para luego oxidarse nuevamente y ceder el electrón al siguiente transportador de la pared celular. De esta manera el electrón va siendo transportado hasta llegar al citoplasma, donde encuentra el oxígeno que es el aceptor final del electrón. Este oxígeno se une a dos protones para formar una molécula de agua, con el consiguiente consumo de protones a consecuencia de esto (Yamanaka,1995). Dentro de los transportadores que participan en este proceso se encuentran: Rusticianina, citocromo c y citocromo a.

Para el caso de la bacteria *At. ferrooxidans*, la oxidación bacteriana de ión ferroso ocurre a través de la siguiente reacción (Domic, 2001):



$$\Delta G = -8.1 \text{ [Kcal/mol]}.$$

Se necesita oxidar 2 moles de ión ferroso para formar un mol de moléculas de adenosíntrifosfato (ATP) tal como sigue:



$$\Delta G = -7.8 \text{ [Kcal/mol]}.$$

### 1.2.5. Estudios de Biolixiviación de Pirita.

Al estudiar la biolixiviación del disulfuro de hierro en sus dos morfologías, marcasita y pirita, se ha observado que la marcasita es menos recalcitrante tanto a la oxidación biológica como a la puramente química en comparación con la pirita (Wang et al, 2007). Esta diferencia se atribuye en relación a la estructura cristalina de cada uno de los minerales y de las propiedades termodinámicas como se mencionó en el capítulo 1.2.1.

En los estudios de Wang la biolixiviación de ambos minerales fue realizada a diferentes rangos de temperatura,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $65 \pm 2^\circ\text{C}$ . En el primer intervalo se utilizaron microorganismos mesofílicos tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, en segundo rango microorganismos termófilos moderados como *Acidithiobacillus caldus* y especies de *Sulfobacillus*. Finalmente, *Sulfolobus metallicus* fue utilizado para el experimento a  $65^\circ\text{C}$ . La disolución tanto de pirita como marcasita fue ampliamente acelerada al incrementar la temperatura desde los estudios a  $22^\circ\text{C}$  hasta los de  $65^\circ\text{C}$ . En el rango de los microorganismos mesófilos la lixiviación de la marcasita alcanzó un valor 5 veces más alto que la pirita. Esta diferencia disminuyó hasta 1,2 veces en la biolixiviación por termófilos y termófilos moderados. En el caso de la marcasita la diferencia en la recuperación de fierro entre los experimentos bióticos y abióticos es bastante baja en las diferentes temperaturas estudiadas. Sin embargo, se aprecia una notoria diferencia en la lixiviación de la pirita, ya que en presencia de bacterias la recuperación de fierro es al menos 4 veces mayor que en ausencia de microorganismos para los diferentes rangos de temperatura.

La lixiviación de pirita ocurre con alta recuperación en presencia y en ausencia de bacterias bajo diversas condiciones de estudio. Análisis de la velocidad de reacción como función de la concentración de ión férrico indican que el orden de la reacción es el mismo en presencia y en ausencia de bacterias, el orden de reacción es 0,5. Sin embargo, el orden de reacción con respecto a la concentración de protones ( $\text{H}^+$ ) es -0,5 en ausencia de bacterias, y -0,39 en presencia de actividad biológica. Esto sugiere que la presencia de bacterias no cambia el mecanismo de lixiviación de pirita, pero en cierta forma afecta el pH en la superficie del mineral (Fowler et al, 1999). En base a estos resultados, los investigadores establecen que la presencia de bacterias, en este caso *At. ferrooxidans*, mejora la velocidad de lixiviación de la pirita, pero no cambia el mecanismo de lixiviación. Holmes et al (1999) demostró que en presencia de bacterias disminuye el potencial mixto, el cual se mantiene constante en ausencia de los microorganismos.

Además, los estudios de Fowler et al (1999) permitieron determinar el orden de reacción en el proceso de lixiviación de pirita, que son datos primordiales para establecer el mecanismo cinético en la química. Además, un detallado mecanismo de la lixiviación de pirita en soluciones con sulfato férrico demostró que los resultados alcanzados en la lixiviación se pueden explicar debido al incremento local del pH en la superficie del mineral como resultado de la actividad bacteriana. La bacteria consume protones ( $H^+$ ) en la oxidación del ión ferroso, y así se incrementa el pH. Si la velocidad de lixiviación de pirita aumenta con el incremento del pH, entonces la presencia de bacterias favorece la disolución del mineral.

Esto significa que el incremento en la lixiviación de pirita es resultado de la cooperación entre los mecanismos de lixiviación directo e indirecto, pues según el mecanismo directo la célula bacteriana debe estar adherida al mineral, sin embargo, la lixiviación es indirecta por la acción de ión férrica sobre los sitios activos del mineral de pirita. El mecanismo se explica según la Figura 3. (Crundwell 2003).

Crundwell (2003) postula que la presencia de bacterias azufre oxidantes en la superficie del mineral permiten aumentar la velocidad de lixiviación de minerales sulfurados. Sus estudios en base al modelo de núcleo sin reaccionar comprobaron que la capa de azufre elemental producto de la lixiviación férrica en ausencia de bacterias oponía resistencia al paso de los iones desde la solución hacia el núcleo de la partícula, siendo así la difusión en las cenizas la etapa limitante del proceso. Al realizar los experimentos en presencia de bacteria la resistencia producida por la capa de azufre no fue detectada, siendo la etapa limitante la reacción química según el modelo. En conclusión la acción bacteriana permite remover la capa de azufre formada convirtiéndola en ácido sulfúricos según la Ecuación 2, disolviendo así la barrera difusional para el paso del ión férrico hacia los sitios activos del mineral.

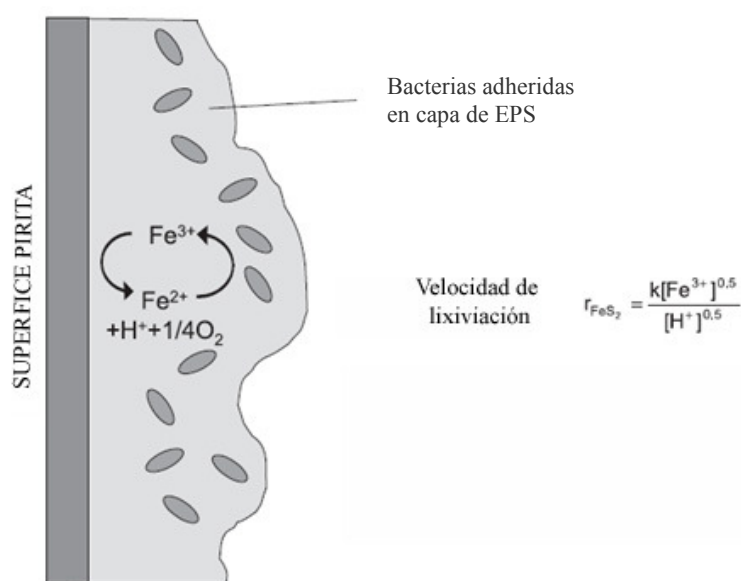


Figura 3: Mecanismo bacteriano que mejora la tasa de lixiviación de pirita. (Crundwell, 2003).



El mecanismo de lixiviación cooperativa ha sido apoyado por los estudios de Rodríguez et al (2003), al proponer que mediante el contacto directo de la bacteria sobre el mineral, existe consumo constante de iones ferrosos los cuales quedaron adsorbidos en la superficie de la pirita como productos de la reacción. Al re-oxidar los iones ferroso a iones férricos mediante el mecanismo indirecto, la bacteria libera el sitio activo utilizado por un ión ferroso permitiendo que el ión férrico regenerado pueda atacar nuevamente este sitio activo. Como todas estas reacciones ocurren en la superficie del mineral los reactantes no tienen barreras difusionales para acercarse a los sitios activos de la pirita.

Los estudios de Sand et al (2001) plantean la hipótesis de que el proceso de biolixiviación de sulfuros metálicos es debido a la acción del ión férrico y/o los protones en solución, mediante el mecanismo indirecto previamente mencionado. La bacteria cumple la función de regenerar los agentes oxidantes y concentrarlos en la interface mineral/solución o mineral/bacteria de tal forma de mejorar la tasa de degradación del mineral. Sand establece que un factor determinante es la delgada capa de exopolimeros producida por las bacterias y que las circunda sobre la superficie del mineral. Es en esta capa donde el proceso químico ocurre causando la disolución del sulfuro metálico. Debido a la concentración de los agentes oxidantes en la interface conlleva en la aceleración del proceso de degradación en presencia de los microorganismos de lixiviación.

Basado en los productos intermediarios del proceso de biolixiviación, Sand propone dos mecanismos indirectos de disolución según el tipo de mineral lixiviado:

- a) Sulfuros como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ), molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ) y tungstenita ( $\text{WS}_2$ ) son degradados exclusivamente por el ión férrico como agente oxidante vía thiosulfato como el intermediario principal de la degradación. Posteriormente, el thiosulfato es degradado en un proceso cíclico hasta la generación de sulfato, con producción de azufre elemental como un producto lateral. Esto explica porque sólo las bacterias hierro-oxidantes son capaces de degradar estos metales sulfurados.
- b) Para el caso de los sulfuros como galena ( $\text{PbS}$ ), esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) son degradados por la acción conjunta de ión férrico y protones. El intermediario principal de este mecanismo son los polisulfuros y azufre elemental (thiosulfato aparece sólo como un producto lateral de la reacción). Estos sulfuros metálicos son degradables por todas las bacterias capaces de oxidar azufre, sin embargo, la cinética de este proceso es dependiente de la concentración de ión férrico.

Los mecanismos indirectos planteados por Sand se presentan en la figura 4.

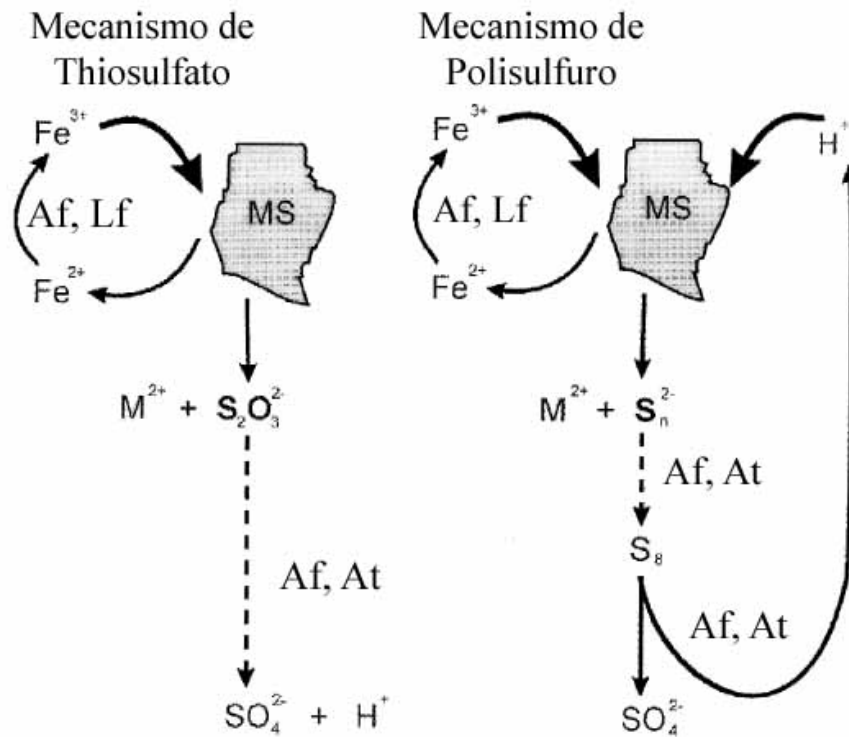
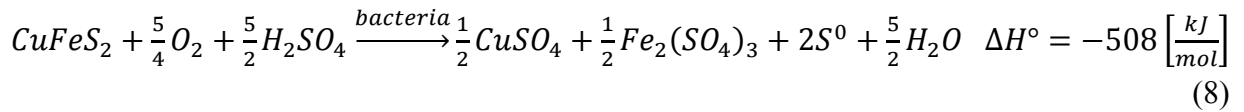
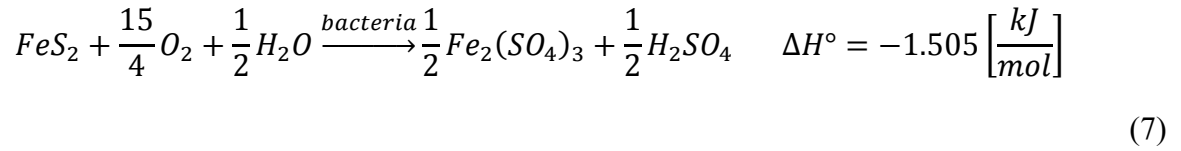


Figura 4: Esquema del mecanismo de thiosulfato y polisulfuro en biolixiviación de sulfuros metálicos. MS = sulfuro metálico;  $M^{2+}$  = ión metálico;  $S_2O_3^{2-}$  = thiosulfato;  $S_n^{2-}$  = polisulfuro con largo de cadena (n);  $S_8$  = azufre elemental; Af, Lf, At= reacciones enzimáticas por *At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, y/o *A. thiooxidans* (Sand, 2001).

Rodríguez et al (2003) establece que existe relación directa entre la tasa de adherencia bacteriana sobre la superficie mineral y la velocidad de disolución de la pirita. En presencia de altos niveles de adherencia en los inicios de sus estudios de biolixiviación obtuvo mayores tasas de disolución durante el proceso que en los casos en que la adherencia fue tardía. También comprobó el efecto inhibitorio de ión férrico sobre el crecimiento bacteriano cuando se encuentra presente en altas concentraciones (>16 g/l). Esto ha permitido demostrar la disminución de la velocidad de lixiviación a medida que transcurre el tiempo, pues la acumulación de ión férrico inhibiría la actividad bacteriana por lo que se comenzaría a acumular los iones ferroso sobre la superficie del mineral como productos de la lixiviación férrica, bloqueando así los sitios activos de la pirita y disminuyendo la disolución de este mineral.

La pirita se puede encontrar en la pilas de lixiviación donde el mineral de interés es la calcopirita, con el fin de recuperar el cobre de estos minerales de baja ley. La calcopirita es recalcitrante a la acción bacteriana en el rango de las mesófilas, pero su disolución aumenta considerablemente a altas temperaturas (60-70°C) donde se favorece el desarrollo y la actividad de los microorganismos termófilos (Petersen y Dixon, 2006).

El calor liberado por la disolución de la pirita y la calcopirita, se presenta en las ecuaciones 7 y 8 respectivamente (Petersen y Dixon, 2002):



De estas reacciones la lixiviación de la pirita se considerablemente más exotérmica que la disolución de la calcopirita, por lo que la energía liberada por la lixiviación de estos minerales permite calentar las pilas, incrementando la temperatura en el interior de estas. Así, si en los inicios de una pila de lixiviación se favorece la disolución de la pirita, se logrará un aumento en la temperatura en el interior dando las condiciones óptimas para el desarrollo de los microorganismos termófilos y termófilos moderados, finalizando en una mayor tasa de disolución de la calcopirita.

### 1.3. Descripción del Proyecto.

El proyecto consiste en el estudio de la biolixiviación de pirita mediada por la acción bacteriana de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas provenientes de PLS de Minera Escondida, con el fin de establecer las condiciones óptimas de disolución del mineral de pirita.

Para esto, se realizarán estudios de la cinética de disolución de la pirita en frascos agitados a 30°C, para así identificar el nivel de recuperación de hierro desde el mineral y determinar la velocidad de reacción y etapa controlante según el modelo de núcleo sin reaccionar.

Con el fin de explicar el comportamiento de la recuperación de hierro en función del tipo de inóculo utilizado, se realizarán pruebas de adherencia bacteriana sobre la pirita y medición del potencial generador de ácido a partir de azufre.

El mecanismo de biolixiviación ha sido ampliamente estudiado, no obstante, no se ha logrado establecer con claridad el rol de la adherencia bacteriana sobre la superficie del mineral en relación a la variación de las tasas de disolución de los minerales sulfurados. Se ha demostrado que el mecanismo predominante es el indirecto, en el cual los microorganismos de lixiviación cumple la función de restablecer el ión férrico consumido como agente oxidante del mineral. Sin embargo, el mecanismo indirecto puede realizarse en cooperación con el mecanismo directo al estar los microorganismos adheridos sobre la superficie del mineral.

Además, se estudiará la importancia de la adherencia de los microorganismos a la superficie de la pirita en relación con la conversión final del mineral, con el fin de establecer si el mecanismo indirecto en ausencia de adherencia bacteriana presenta los mismos niveles de recuperación que en el caso en que los microorganismos se encuentran en contacto físico con la pirita. Para esto, se montará un reactor tipo frasco agitado provisto de un tubo separador, que a través de una membrana permite separar a los microorganismos del mineral dentro de una misma solución.

Este trabajo se centra en la necesidad de determinar las condiciones óptimas de lixiviación de la pirita, con el fin de favorecer su disolución en las pilas industriales, pues el calor emitido por su degradación permite elevar la temperatura en el interior de la pila permitiendo el desarrollo de los microorganismos termófilos moderados los cuales aceleran la recuperación de cobre desde los minerales de baja ley.

## **1.4. Objetivos.**

### **1.4.1. Objetivo General.**

En el presente trabajo se compara la biolixiviación de pirita en presencia de una cepa pura de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y la disolución en presencia de un consorcio de cepas bacterianas nativas provenientes de una pila industrial.

### **1.4.2. Objetivos Específicos.**

Entre los objetivos específicos se encuentran:

- Determinar la velocidad y mecanismo de biolixiviación de pirita en presencia de un cultivo puro de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
- Determinar la velocidad y mecanismo de biolixiviación de pirita en presencia de un cultivo mixto de cepas nativas provenientes de una pila industrial.
- Determinar las condiciones óptimas de biolixiviación de pirita en función del inóculo utilizado y la concentración inicial de ión férrico en solución.
- Determinar la influencia del grado de adherencia bacteriana sobre la velocidad y mecanismo de biolixiviación de pirita.

## **1.5. Alcances.**

Este proyecto pretende establecer alguna comparación entre la biolixiviación de un mineral de pirita por un cultivo puro de *At. ferrooxidans* y la acción coordinada de un cultivo mixto de microorganismos provenientes de un PLS industrial de Minera Escondida. Además, se busca establecer el efecto de la concentración inicial del potencial oxidante (ión férrico) sobre conversión de la pirita.

Para esto, se medirá el aumento del hierro total presente en la solución de biolixiviación de pirita, y así determinar el porcentaje de conversión del mineral.

Mediantes técnicas químicas se determinarán los parámetros fisicoquímicos de las soluciones de biolixiviación, tales como pH, Eh y la concentración de iones presentes  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  y sulfato.

Paralelamente se estudiará el efecto de la adherencia bacteriana sobre la superficie de la pirita, siempre y cuando se cumpla que el potencial electroquímico de la solución sea similar para el caso con adherencia y el sin posibilidad de contacto entre el mineral y las bacterias.

## 2. Capítulo 2: Metodología.

### 2.1. Materiales.

La muestra de pirita utilizada en todos los experimentos realizados proviene de relaves de Minera Escondida, operada por BHP Billiton en la II Región de Antofagasta, Chile. La pirita fue purificada llegando a una muestra con un contenido de hierro del 43,8% p/p. La muestra de pirita en base a un estudio de granulometría realizado en mallas Tyler se identificó que aproximadamente el 90% de la muestra se encuentra entre -140 / +450 mallas, lo que implica un diámetro de partícula entre 0,105 y 0,032[mm]. En la figura 5 se muestra la distribución de tamaño de la muestra.

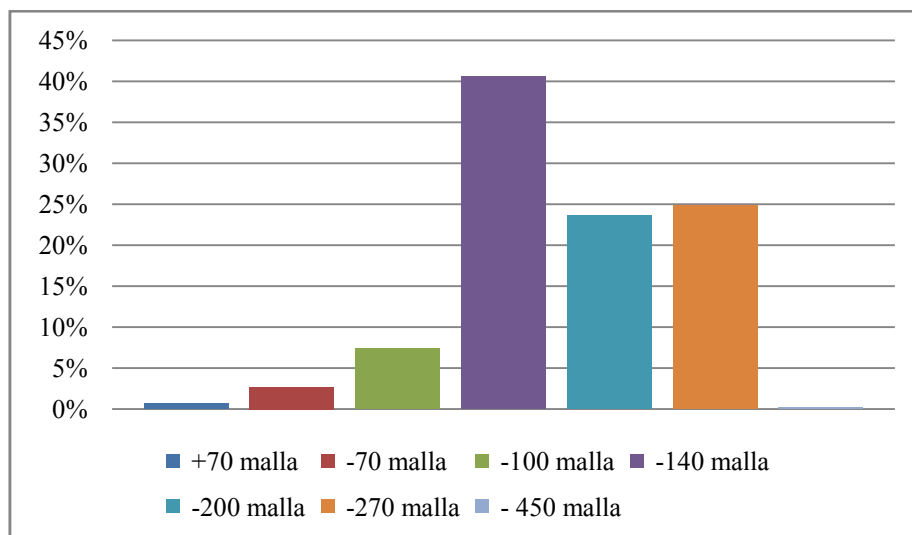


Figura 5: Estudio de granulometría de muestra de pirita.

En los experimentos de biolixiviación de pirita se utilizaron dos cultivos de microorganismos distintos. El primero corresponde a un cultivo puro de *Acidithiobacillus ferrooxidans* cepa ATCC 19859 mantenidas en el laboratorio de Biohidrometalurgia de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. El segundo fue un cultivo de cepas nativas provenientes de una muestra de PLS (pregnant leach solution) de las pilas de lixiviación de Minera Escondida, que según los análisis moleculares realizados por Demergasso et al (2005) existe presencia de microorganismos azufre y hierrooxidantes tales como *At. ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Ferroplasma acidiphilum* y especies del género *Sulfurisphaera* y *Sulfobacillus*.

La preparación de inóculos y los diferentes ensayos de biolixiviación de pirita fueron realizados sobre un medio basal MC pH 1,6 de composición: 0,4 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, y 0,056 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [g/l], ajustado a pH 1,6 con ácido sulfúrico.

Para la cuantificación de hierro por colorimetría e ión sulfato por turbidimetría se utilizó un equipo de espectrofotometría UV marca Agilen modelo 8453 equipado con una lámpara de tungsteno. El pH se midió en un equipo Corning modelo 340 equipado con un electrodo de plata /

cloruro de plata (Ag/AgCl). Para la medición del potencial electroquímico de la solución se utilizó el equipo pH 211 de Hanna instruments, con un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

El recuento de bacterias se realizó en un microscopio marca Nikon modelo Labophot, equipado con filtro para contraste de fase. El aumento de ocular fue de 10X mientras que el objetivo de 40X. El recuento se realizó sobre una cámara Petroff-Hausser de 0,02mm de profundidad.

## **2.2. Métodos.**

### **2.2.1. Biolixiviación de pirita.**

Los experimentos de biolixiviación de pirita se llevaron a cabo en matraces de 250 ml a 100rpm de agitación aproximadamente a 30°C de temperatura. La cantidad de pirita en solución fue de 0,5% p/v. Al medio de cultivo MC pH 1,6 se le agregó sulfato férrico con el fin de ajustar la concentración de ión férrico inicial a 2.4, 5 y 1.8 g/l según el caso. Posteriormente el medio fue esterilizado por filtración.

El inóculo de *At. ferrooxidans* proviene de un cultivo realizado con 4,5ml de una solución de sulfato ferroso al 33% (concentración final 3g/l) esterilizada previamente por filtración y 5ml de un cultivo anterior o de mantención de la cepa bacteriana, todo en un volumen final de 100ml con medio MC pH 1,6 estéril. El cultivo se llevó a agitación a 100rpm y temperatura de 30°C por 48 horas. La concentración de bacterias alcanzada transcurrido este tiempo es aproximadamente  $2 \times 10^8$  bacterias/ml.

Para el caso de las cepas nativas provenientes de Minera Escondida, se colocó en un matraz estéril 20g de mineral granulado proveniente de la mina sin esterilizar con 200ml de PLS. Se llevó a agitación a 100rpm y temperatura de 30°C por aproximadamente una semana o hasta que el potencial de la solución alcanzó los 600mV vs Ag/AgCl. Para recuperar las células se filtró el cultivo bajo vacío en un equipo de filtración con una membrana Millipore de nitrocelulosa de 0,2µm de diámetro. Una vez filtrado el total de la solución, se lavó la membrana con un pequeño volumen de medio MC pH 1,6 sin desmontar del equipo de filtración. Finalmente la membrana utilizada se depositó en el medio de cultivo MC pH 1,6 con ión férrico en solución y se agitó vigorosamente para traspasar la mayor cantidad de células desde la membrana hacia el medio.

En un matraz de 250ml previamente esterilizado se colocaron 40ml de medio de cultivo MC pH 1,6 con ión férrico en solución, luego se agregaron 10ml del inóculo correspondiente y finalmente 0,25g de pirita sin esterilizar. La concentración inicial de microorganismos en solución es de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml.

El experimento fue programado para la toma de siete muestras en un transcurso de 600 horas. Cada muestra está conformada por un control estéril y un ensayo de biolixiviación en

duplicado. En cada instante de medición los matraces correspondientes a una muestra debían ser desmontados para cuantificación de fierro total por el método de digestión con ácido clorhídrico (metodología en capítulo 2.2.5 (c)). Los parámetros medidos para monitorear la biolixiviación de pirita fueron potencial de la solución (E), pH y la concentración de iones de fierro en solución.

### **2.2.2. Adherencia bacteriana sobre pirita.**

En experimentos con un montaje similar a los de la biolixiviación de pirita se registró la adherencia bacteriana sobre el mineral monitoreando en las primeras dos horas de duración del experimento el recuento de la cantidad de microorganismos presentes en solución por microscopía.

En matraces de 100ml se colocaron 0,25g de pirita no estéril en 50ml de medio de cultivo MC pH 1,6 en ausencia de ión férrico inicial. Los matraces se llevaron a agitación de 100rpm y 30°C de temperatura. La concentración inicial de bacterias fue de  $2,5 \times 10^8$  bacterias/ml para *At. ferrooxidans* y  $4 \times 10^7$  bacterias/ml para las cepas nativas.

La observación al microscopio se realiza cargando 8 $\mu$ l de la solución de biolixiviación en una cámara de recuento de Petroff-hausser. Contar cantidad células/ml en microscopio óptico equipado con contraste de fase. Los resultados corresponden sólo a bacterias presentes en la solución; no se puede determinar mediante esta metodología si las bacterias que se cuentan son activas o no.

### **2.2.3. Biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana.**

Los experimentos de biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana se llevaron a cabo en matraces de boca ancha de 250 ml con agitación a 100rpm y 30°C de temperatura. La cantidad de pirita en solución fue de 0,5% p/v. Al medio de cultivo MC pH 1,6 se le agregó sulfato férrico con el fin de ajustar la concentración de ión férrico inicial 1.8 g/l. Posteriormente el medio fue esterilizado por filtración. La preparación del inóculo corresponde a la presentada para los experimentos de biolixiviación de piritas (Capítulo 2.2.1).

En este experimento se preparó un tubo separador que no permite el contacto entre los microorganismos y la pirita en la misma solución. Para esto al tubo en su parte inferior se le colocó una membrana Millipore de policarbonato con diámetro de poro 0,2 $\mu$ m procurando que no presentaran filtraciones. El esquema del montaje se presenta en la figura 6.

En un matraz de 250ml de boca ancha previamente esterilizado se colocaron 80ml de medio de cultivo MC pH 1,6 con 1,8 g/l ión férrico en solución, luego se agregó la pirita sin esterilizar. Finalmente se colocó el tubo antes mencionado dentro del matraz y en su interior se



agregaron los 20ml de inóculo de cepas nativas con una concentración inicial de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml.

El experimento fue programado con una duración de dos semanas (336 horas), cada muestra estaba conformada por un control estéril, un ensayo de biolixiviación (similar al Capítulo 2.2.1) y un ensayo de biolixiviación sin adherencia, todos en duplicado. Los parámetros medidos para monitorear la biolixiviación de pirita fueron potencial de la solución (E), pH y concentración de iones de hierro en solución.

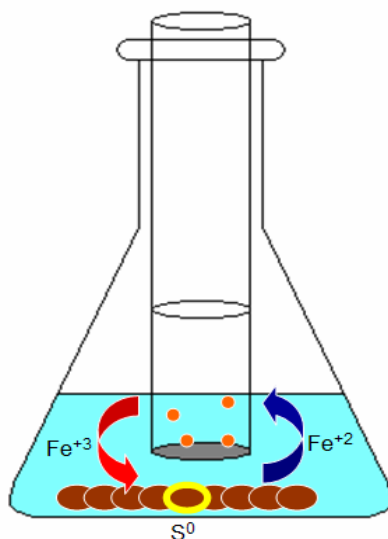


Figura 6: Esquema de montaje de biolixiviación de pirita sin adherencia, se grafica la presencia del tubo separador que evita el contacto de las bacterias con el mineral de pirita.

#### 2.2.4. Comparación de la generación de sulfato entre *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas.

En matraces estériles de 250ml se colocaron 3g de azufre previamente esterilizado en 100ml de medio basal MC pH 2,3 en ausencia de ión férrico. Los experimentos fueron inoculados con *At. ferrooxidans* puro y por otro lado con las cepas nativas provenientes de Minera Escondida con una concentración inicial de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml, ambos experimentos fueron realizados en duplicado con agitación a 100rpm y 30°C de temperatura.

Los parámetros medidos para determinar el potencial oxidativo de azufre de ambos cultivos fueron el pH y el sulfato generado como producto de la acción bacteriana mediante turbidimetría por precipitación de sales de bario.

#### 2.2.5. Métodos analíticos.

**a. Cuantificación de Hierro Total por Colorimetría con o-fenantrolina.**

- Tomar 0,1ml de muestra diluida hasta una concentración máxima de hierro total de 100ppm.
- Agregar 0,1ml de Hidroxilamina y agitar.
- Agregar 0,4ml de Fenantrolina y agitar.
- Agregar 1,9ml de agua destilada y agitar nuevamente.
- Leer absorbancia a 510nm contra blanco.

**b. Cuantificación de ión Ferroso en presencia de ión Férrico por Colorimetría con o-fenantrolina.**

- Tomar 0,1ml de muestra diluida hasta una concentración máxima de 100ppm de ferroso.
- Agregar 1ml de solución NaF 0,5 M y agitar.
- Agregar 0,4ml de Fenantrolina y agitar.
- Agregar 1ml de agua destilada y agitar.
- Leer absorbancia a 510nm contra blanco.

**c. Digestión con Ácido Clorhídrico.**

Con el fin de medir todo el hierro disuelto desde la pirita en cada ensayo de biolixiviación se aplicó este método que permite disolver los precipitados de hierro como hidróxidos o jarositas (Lindström et al, 1992).

Tratamiento de la solución:

- Tomar 2ml de muestra de la solución dentro del matraz.
- Llevar a 20ml de volumen final con HCl 5N.
- Incubar a 60°C por 30 minutos con agitación.
- Finalmente, medir hierro total según el método 2.2.5 (a).

Tratamiento de la pirita:

- Filtrar todo el contenido del matraz de tal forma de recuperar la máxima cantidad de pirita en el papel filtro.
- Romper el papel filtro y recolectar la pirita en un recipiente limpio utilizando 50ml de HCl 5N para desprender el mineral del filtro.
- Incubar la pirita con el ácido a 60°C por minutos con agitación.
- Recuperar la solución ácida filtrando.
- Aforar en matraz de 100ml con agua destilada.
- Finalmente, medir hierro total según el método 2.2.5 (a).

La concentración total de hierro en solución se determina según la siguiente ecuación:

$$Fe^{tot\ HCl} = \frac{Fe^{solución} \cdot V + Fe^{pirita} \cdot 100ml}{V} \quad (9)$$

Donde V corresponde al volumen en [ml] del matraz en el cual se realizó el ensayo.

**d. Cuantificación de Sulfato en Solución por Turbidimetría.**

- En un matraz de aforo de 50 ml colocar Xml de muestra, 5 ml de Glicerina 1:1 y 2,5ml de NaCl 240g/l.
- Aforar con agua desionizada y agitar.
- Utilizar esta solución como blanco, midiendo absorbancia a 500nm.
- Agregar 0,15g de sal de cloruro de bario ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ).
- Agitar por 1 minuto y luego dejar reposar por 3 minutos.
- Leer absorbancia a 500nm inmediatamente.

El volumen de muestra X corresponde a:

- 0,5 ml si la  $[SO_4^{2-}]$  se encuentra entre 1 y 10g/l.
- 5 ml si la  $[SO_4^{2-}]$  se encuentra entre 0,1 y 1g/l.

### 3. Capítulo 3: Resultados.

#### 3.1. Adherencia Bacteriana sobre Pirita.

La adherencia bacteriana sobre la superficie del mineral de pirita se controló en experimentos de frascos agitados, para el caso de *At. ferrooxidans* los resultados de la variación de la concentración de células en la solución se presentan en la figura 7, mientras que para las cepas nativas en la figura 8. La preparación de los experimentos realizó según el capítulo 2.2.2.

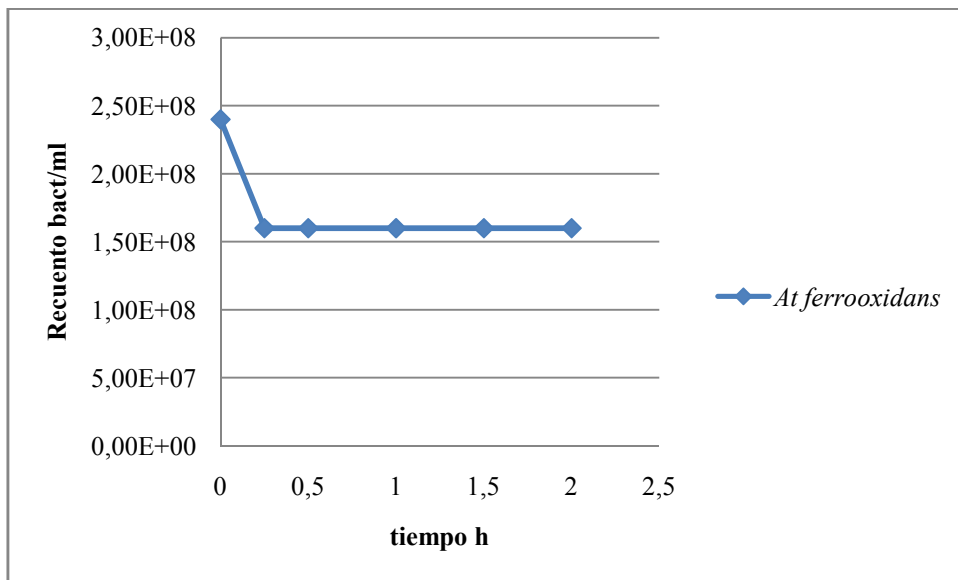
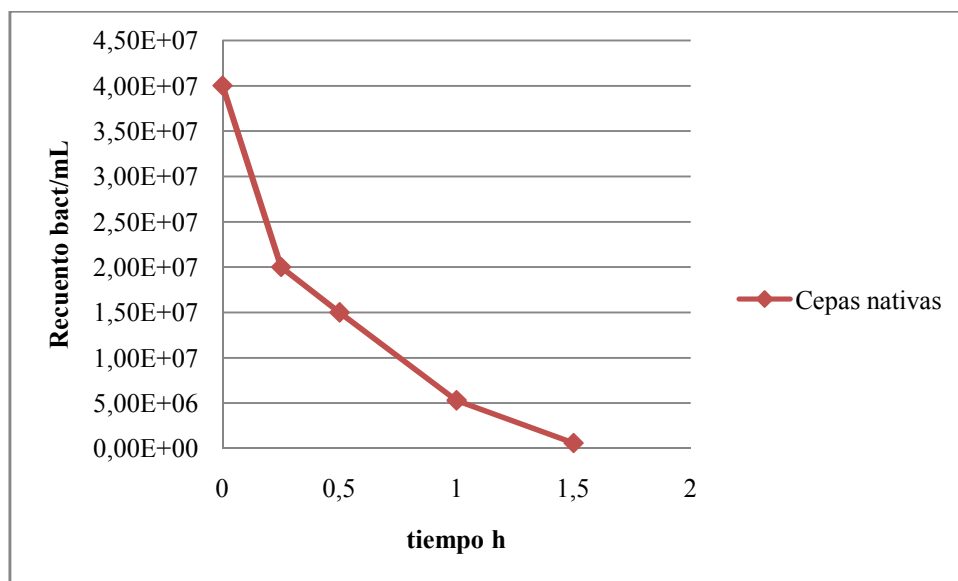


Figura 7: Concentración de *At. ferrooxidans* en solución a pH 1,6 con agitación a 100rpm y 30°C de temperatura.



**Figura 8:** Concentración de cepas nativas en solución a pH 1,6 con agitación a 100rpm y 30°C de temperatura.

Al contactar las cepas nativas con la muestra de pirita, se estima que al cabo de 90 minutos el 98,5% de las células se han adherido al mineral. La adherencia de *At. ferrooxidans* sobre la muestra de pirita es considerablemente más baja al compararla con las cepas nativas proveniente de minera Escondida. En este caso sólo se logra un 33,3% de adherencia de las bacterias sobre el mineral, la cual ocurre durante el instante en que se contactan mineral e inóculo, comparación de adherencia bacteriana en figura 9. En tiempos posteriores (mayor a 15 minutos) la concentración bacteriana en solución no varía. El experimento se monitoreó luego de 24 horas, y la concentración de las bacterias en solución se mantuvo en  $1,6 \times 10^8$  bact/ml. Concluyendo así que la cepa de *At. ferrooxidans* utilizada en el experimento tiene una baja afinidad a crecer sobre la superficie de la pirita.

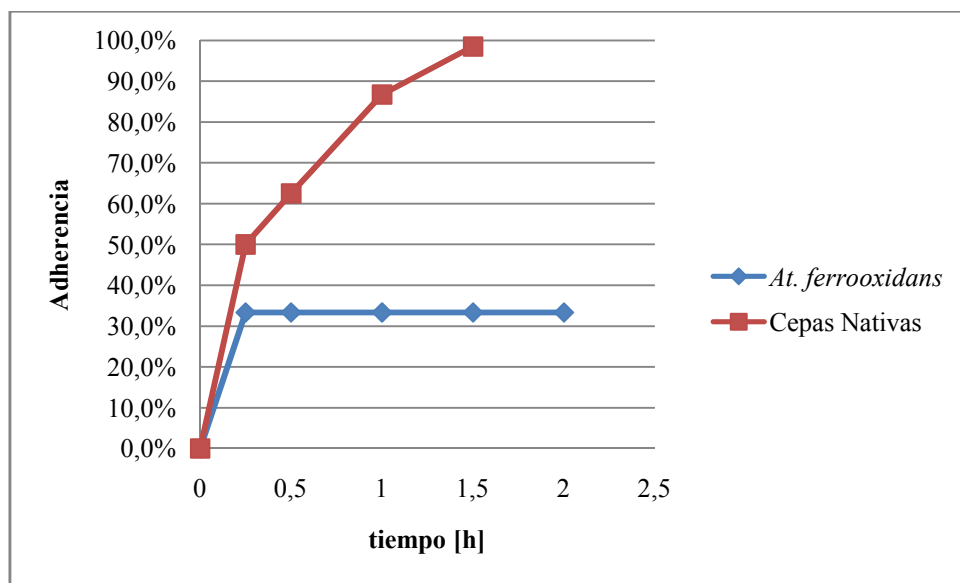


Figura 9: Porcentaje de adherencia bacteriana sobre pirita.

### 3.2. Capacidad oxidativa de azufre por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas.

En el experimento de oxidación de azufre por la acción bacteriana a una concentración inicial de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml, se observó de forma inmediata la actividad de las cepas nativas provenientes de Minera Escondida pues el pH decrece desde el comienzo de la experiencia. En el caso de *At. ferrooxidans* el pH se mantuvo constante hasta la mitad del experimento, para finalmente decrecer a una tasa más elevada que las cepas nativas, alcanzando el mismo valor final de pH igual a 1,2 unidades como se observa en la figura 10.

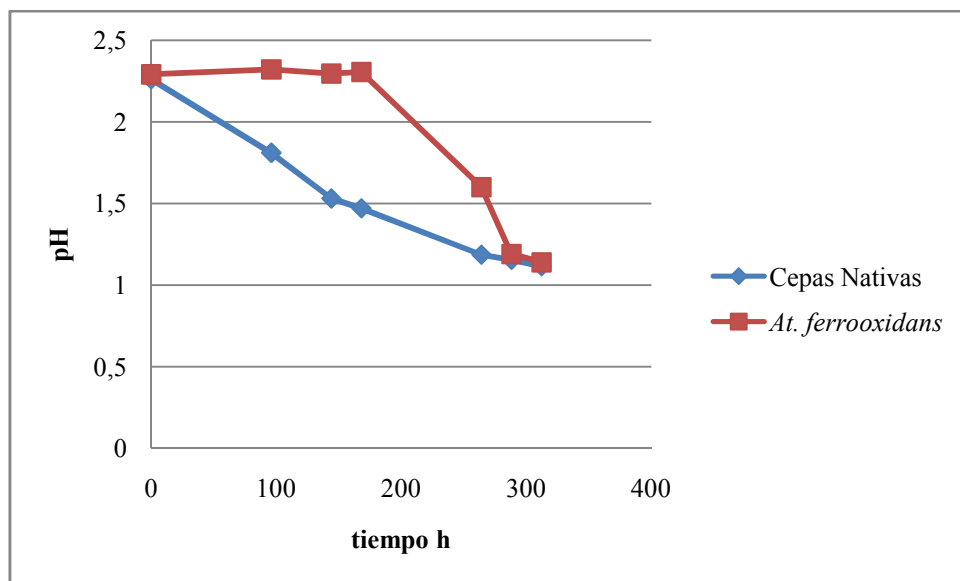


Figura 10: Variación del pH en el tiempo para experimentos de oxidación de azufre por *At. ferrooxidans* y cepas nativas a pH 2,3 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

De forma similar, al cuantificar la generación de sulfato en la solución, el experimento con las cepas nativas presenta actividad de forma inmediata, mientras que *At. ferrooxidans* se mantiene inactivo. Como se observa en la figura 11 en la mitad del experimento el cultivo puro activa su metabolismo oxidante de azufre para alcanzar una concentración de sulfato final idéntica al obtenido por las cepas nativas.

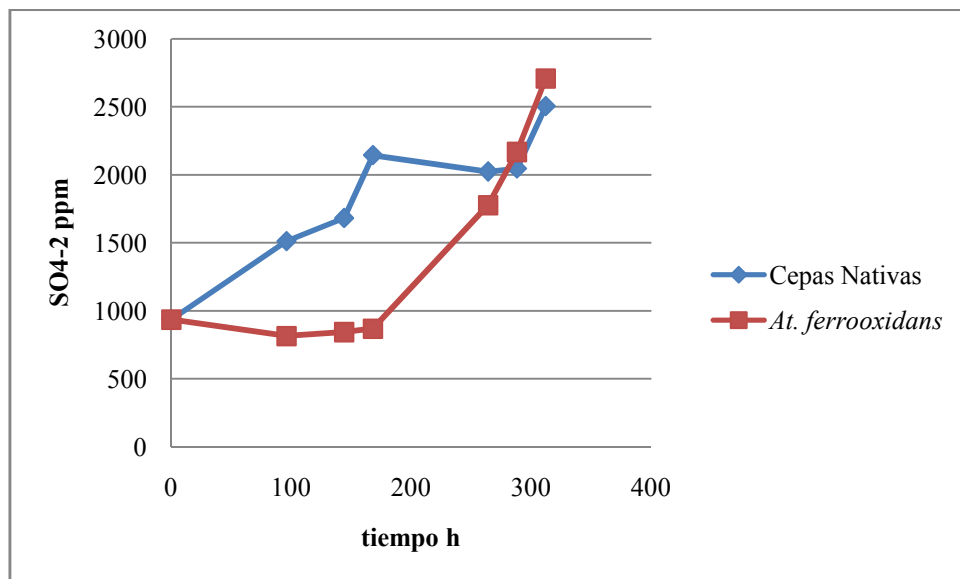


Figura 11: Variación de la concentración de ión sulfato en el tiempo para experimentos de oxidación de azufre por *At. ferrooxidans* y cepas nativas a pH 2,3 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

### 3.3. Biolixiviación de Pirita.

#### 3.3.1. Biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* con concentración de ión férrico inicial: 2,4 g/l.

Como se observa en la figura 12, en los ensayos de biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* el potencial de la solución decrece en las primeras horas de monitoreo, para luego mantenerse relativamente constante a lo largo del experimento. Sin embargo, la acción bacteriana se hace presente al existir una diferencia notoria en el potencial al comparar con el caso de los controles sin inóculo. Cabe mencionar que el incremento observado al final de la experiencia en el caso de los controles se debe a que la muestra de pirita no fue esterilizada inicialmente, por ende durante el transcurso del experimento se pueden haber desarrollado microorganismos que se encontraran en estado de latencia sobre el mineral.

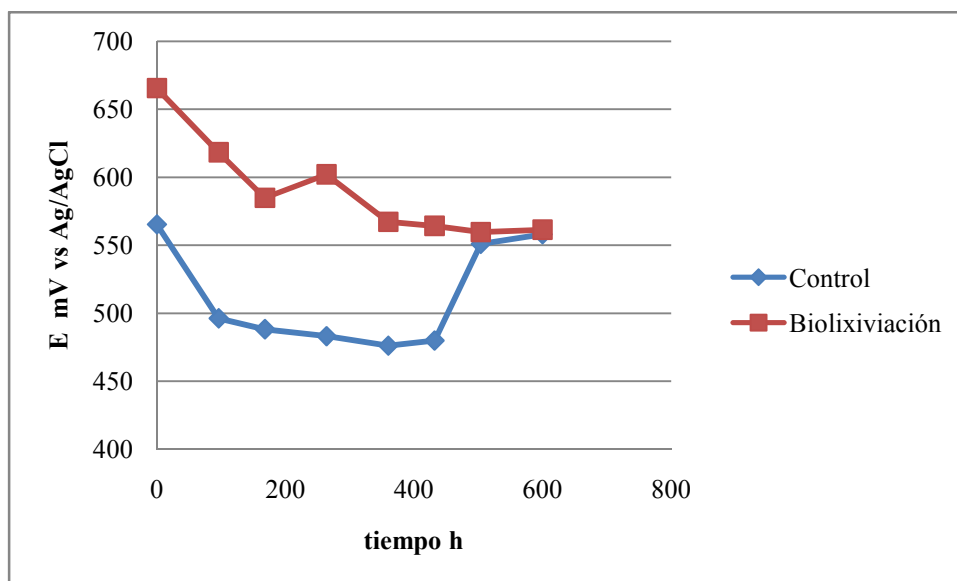


Figura 12: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

El comportamiento del pH se grafica en la figura 13 donde se observa que en ambos ensayos, biolixiviación y control, tiende a decrecer en el tiempo, lo que indica una posible generación de ácido por la actividad bacteriana o también se puede atribuir a la precipitación de hidróxidos férricos como jarositas.



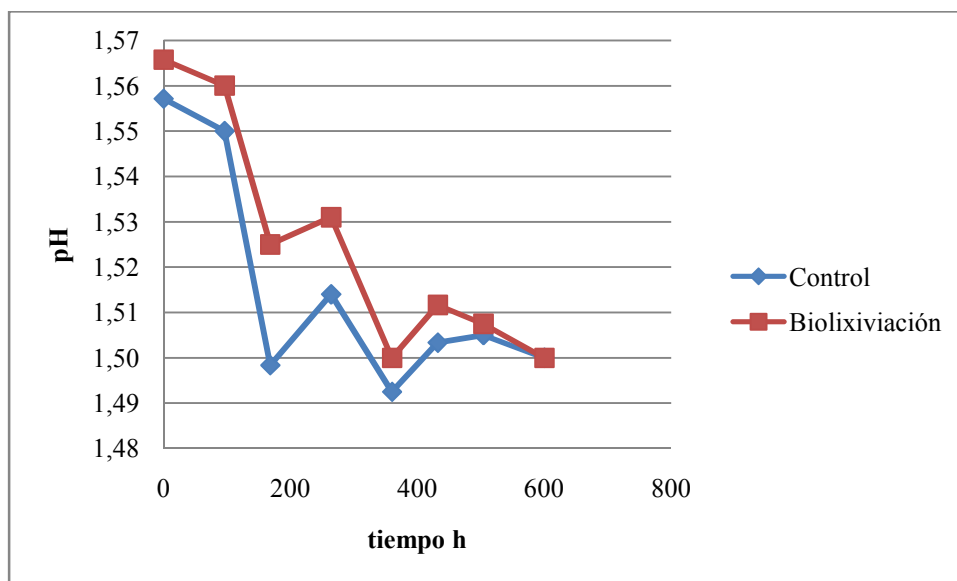


Figura 13: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

El hierro total en solución fue cuantificado por el método colorimétrico con o-fenantrolina. De la figura 14 se observa que el hierro total en ambos ensayos tiende a aumentar con el tiempo. Sin embargo, este método utilizado no permite cuantificar los precipitados férricos que se puedan encontrar en solución.

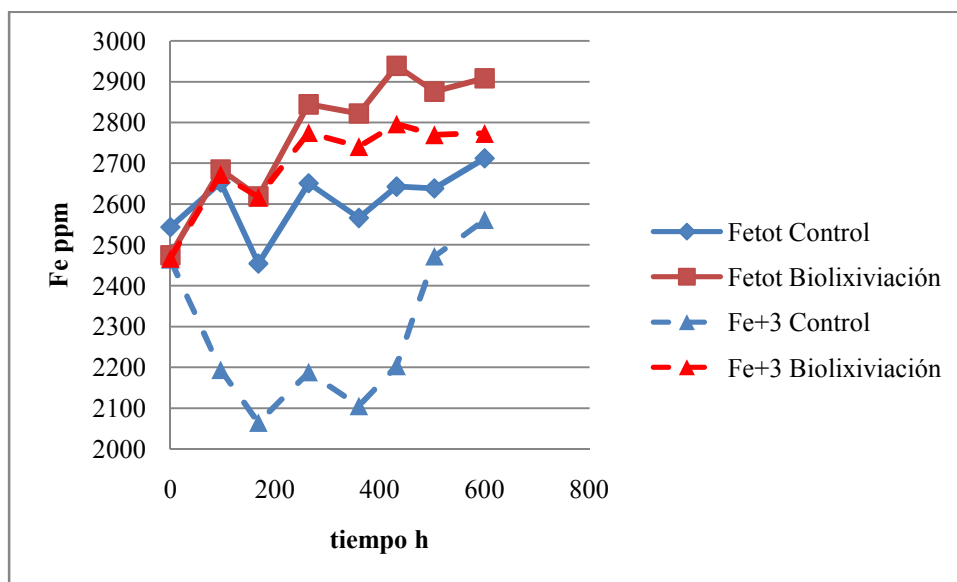


Figura 14: Variación de la concentración de hierro total e ión férrico para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

Con el fin de cuantificar todo el hierro que se encuentre dentro de reactor tipo frasco agitado se implementó el método de digestión con ácido clorhídrico, mediante el cual se disuelven los precipitados de hierro que pueden estar en la solución así como en la superficie del

mineral de pirita. Así, todo el hierro se encuentra soluble para ser cuantificado posteriormente con el método de o-fenantrolina. La diferencia entre ambos métodos se presenta en la figura 15.

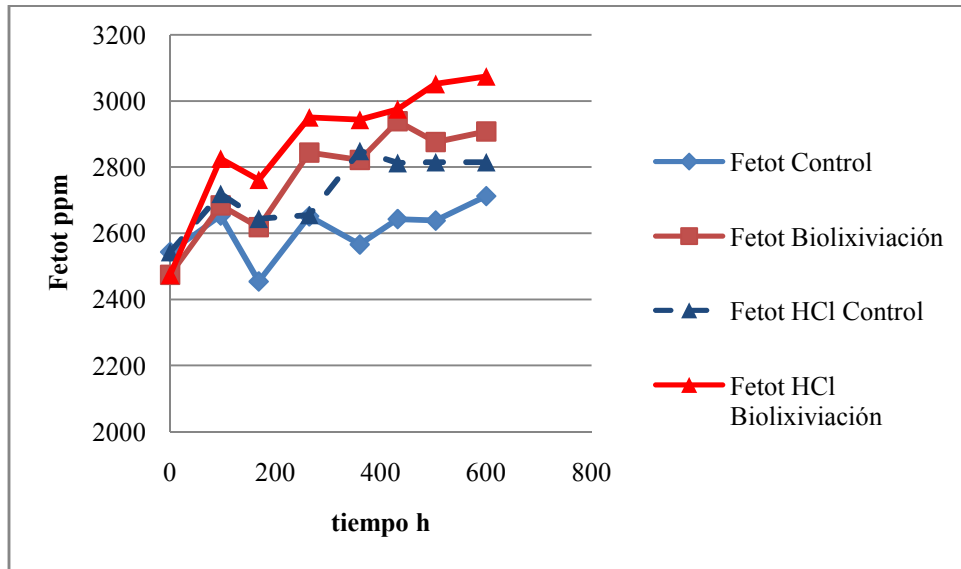


Figura 15: Variación de la concentración de hierro total por método de o-fenantrolina y digestión por HCl para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

La recuperación de hierro desde el mineral de pirita fue de un 27% luego de 600 horas bajo ataque de lixiviación bacteriana. De la figura 16 se observa una notoria diferencia en relación al experimento sin inocular, 14% de recuperación después de 600 horas. Se considera un 100% de recuperación a la disolución de los 0,25g de pirita con un porcentaje del 43,8%p/p de hierro en un volumen de 50ml. Lo que corresponde a un incremento máximo de la concentración de hierro total de 2,19g/l por sobre el valor inicial.

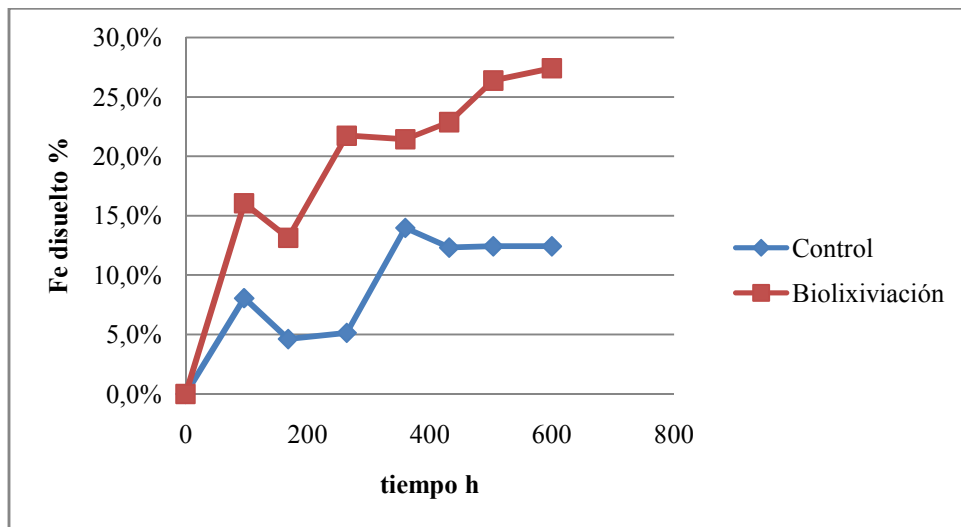


Figura 16: Recuperación de hierro para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 2,4g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

### 3.3.2. Biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* con concentración de ión férrico inicial: 5 g/l.

Para el experimento con concentración inicial de ión férrico en solución de 5g/l se observó que el potencial de la solución comenzó con una baja hasta la mitad del tiempo de monitoreo, para luego recuperarse y alcanzar valores sobre el inicial hacia fines de la experiencia (figura 17). Nuevamente el potencial de los ensayos sin inocular tuvo una caída más abrupta que los que si fueron inoculados, y el incremento en el potencial con el paso del tiempo se podría explicar cómo desarrollo bacteriano ya que la pirita utilizada no fue esterilizada previo a su uso.

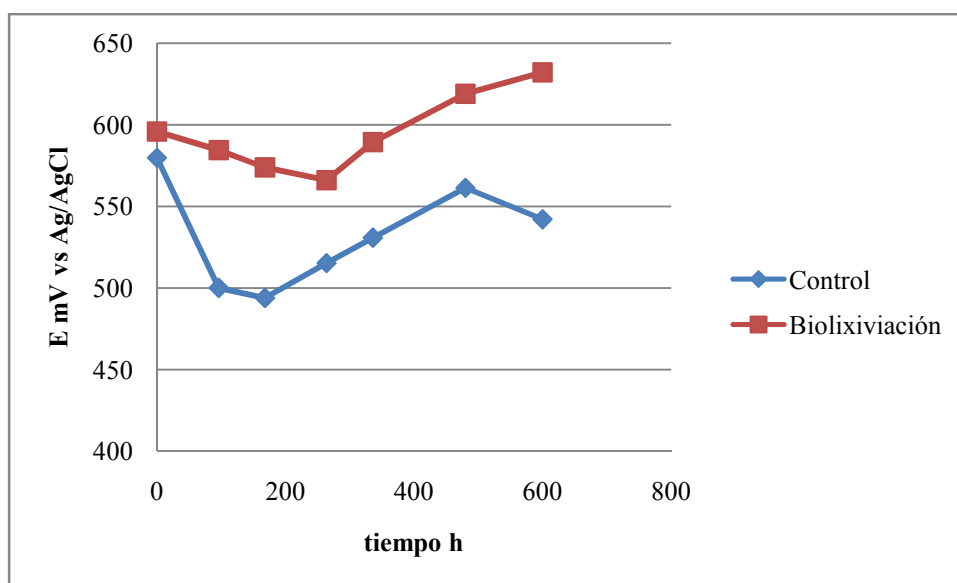


Figura 17: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

En relación al pH se observó una caída de éste hasta mediados de la duración del experimento, lo cual se atribuye a la generación de ácido en esa etapa. El incremento posterior se debe a un consumo de ácido por la acción oxidativa del ión ferroso por *At. ferrooxidans*, lo que coincide con el incremento del potencial de la solución.

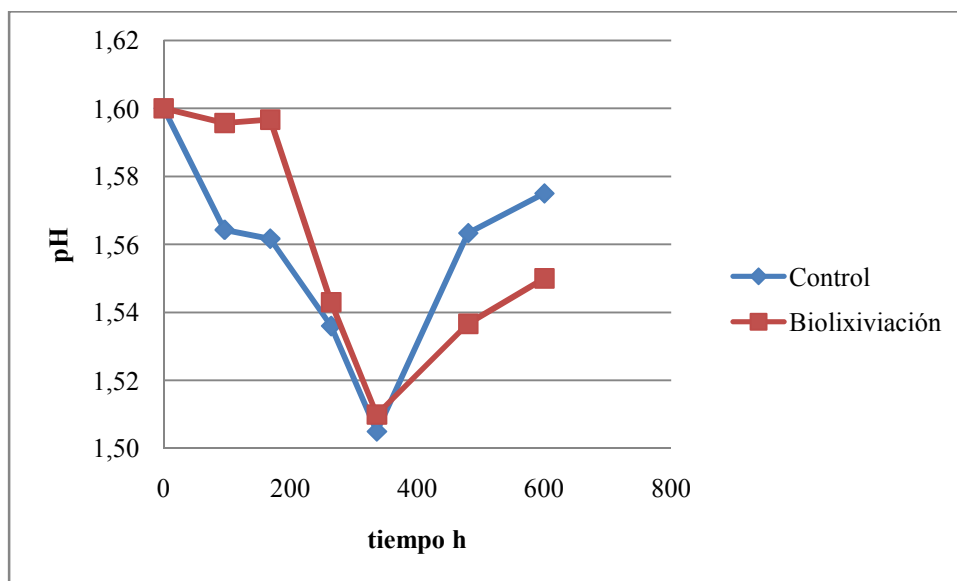


Figura 18: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 5 g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

De la figura 19, nuevamente se observa un incremento en el hierro total disuelto tanto en los experimentos inoculados como en los controles. Con respecto a la precipitación de hidróxidos férricos se observó durante la experiencia la existencia de estas especies. Sin embargo, al finalizar el monitoreo de los experimentos la diferencia en la medición de hierro con los dos métodos antes mencionados fue nula (figura 20).

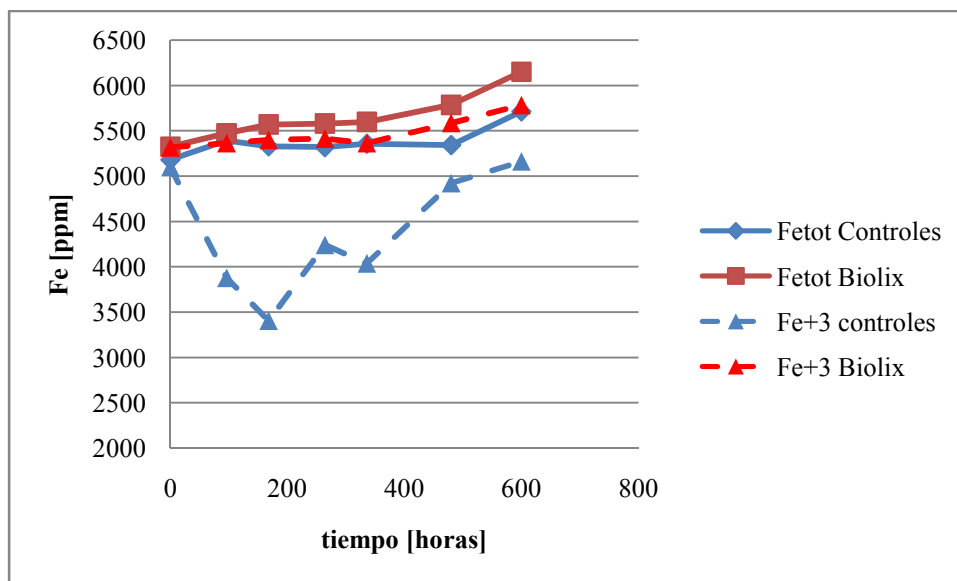


Figura 19: Variación de la concentración de hierro total e ión férrico para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

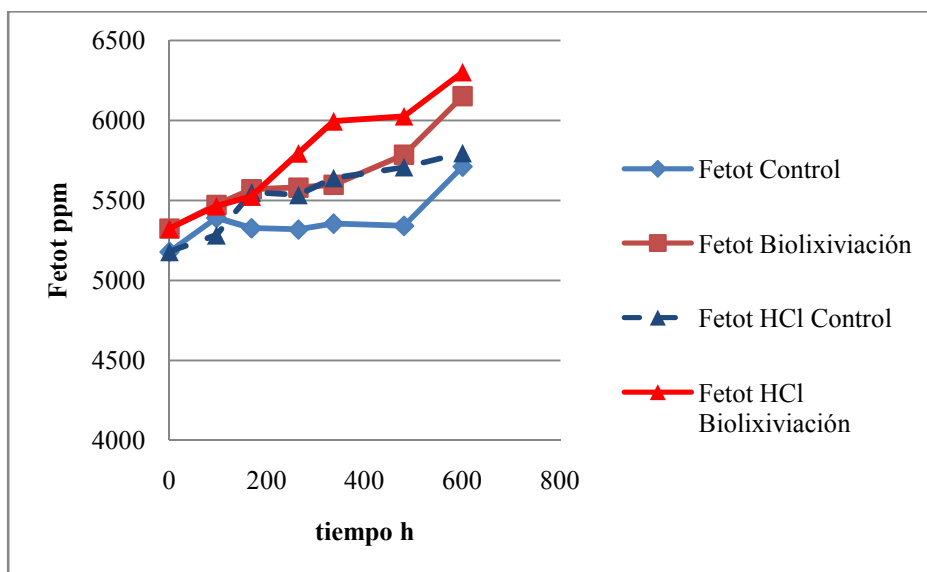


Figura 20: Variación de la concentración de hierro total por método de o-fenantrolina y digestión por HCl para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

La recuperación de hierro desde la pirita se observa en la figura 21 alcanzó un 45% para el caso del experimento inoculado con *At. ferrooxidans*, mientras que el caso sin inocular registró un recuperación cercana al 30%.

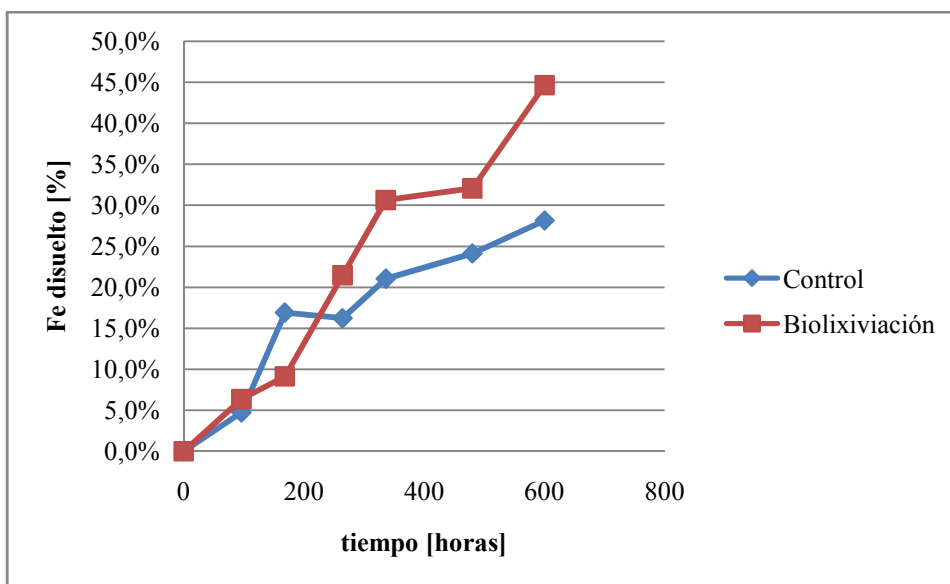


Figura 21: Recuperación de hierro para biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 5g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

### 3.3.3. Biolixiviación de pirita por cepas nativas provenientes de PLS Minera Escondida con concentración de ión férrico inicial: 1,8 [g/l].

En el experimento de biolixiviación de pirita por acción de un consorcio de cepas nativas provenientes de PLS de Minera Escondida se realizó sólo el ensayo de biolixiviación, el experimento control fue omitido en este caso. La concentración bacteriana inicial fue de  $4 \times 10^7$  bacterias/ml.

La biolixiviación de pirita mediada por las cepas nativas presenta actividad desde los inicios de la experiencia, pues como se observa en la figura 22 el potencial de la solución se incrementa rápidamente hasta valores cercanos a los 700mV para luego mantenerse en estos niveles durante toda la experiencia.

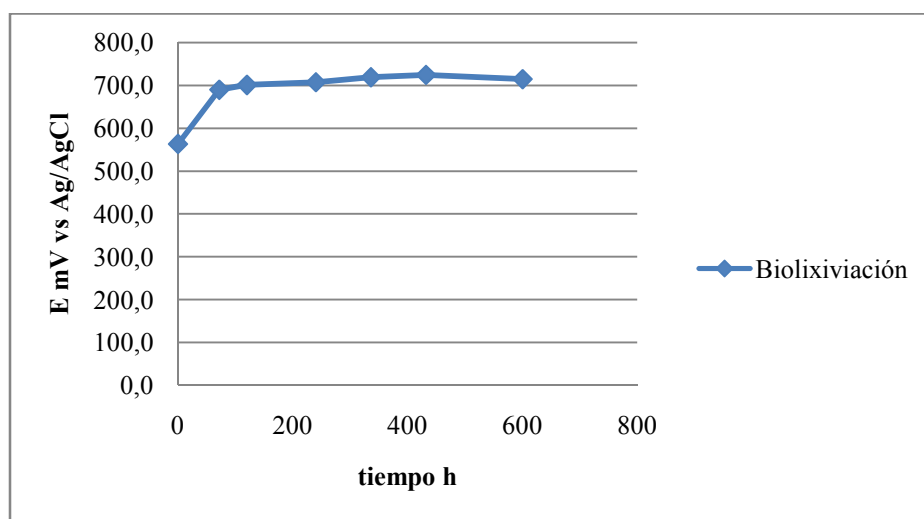


Figura 22: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

Como se observa en la figura 23, el pH presenta un máximo en las primeras 100 horas del estudio el cual se debe al consumo de protones por la oxidación biológica del ión ferroso a ión férrico, posteriormente el pH decrece principalmente por la generación de ácido.

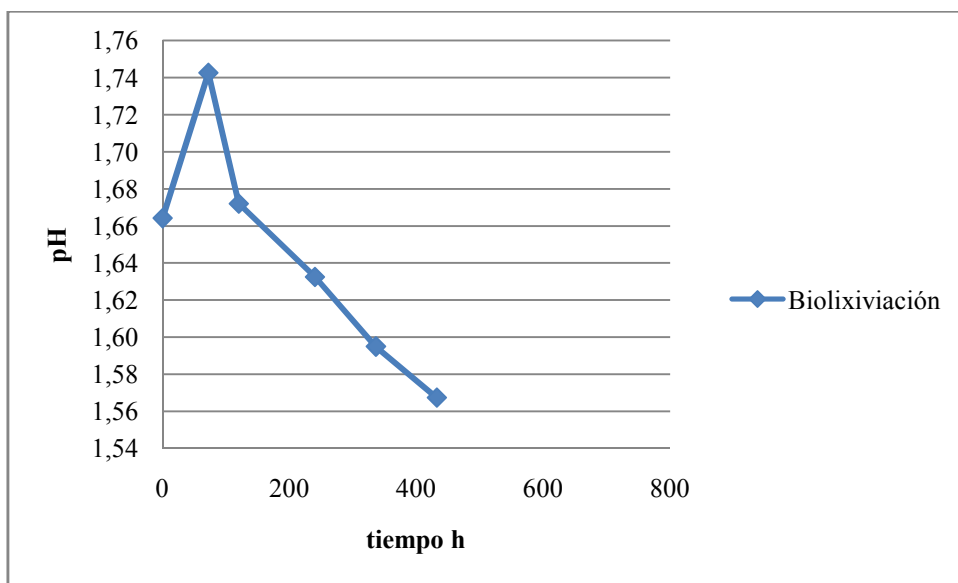


Figura 23: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8 g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

En este experimento el potencial de la solución se mantuvo siempre en valores sobre los 700mV, por ende la mayor cantidad del hierro en la solución se encontraba como ión férrico. La concentración del ión ferroso fue tan baja que no fue posible detectar por el método de la o-fenantrolina. La cuantificación del hierro total en solución por el método de la o-fenantrolina y la digestión con HCl fueron similares como se observa en la figura 24.

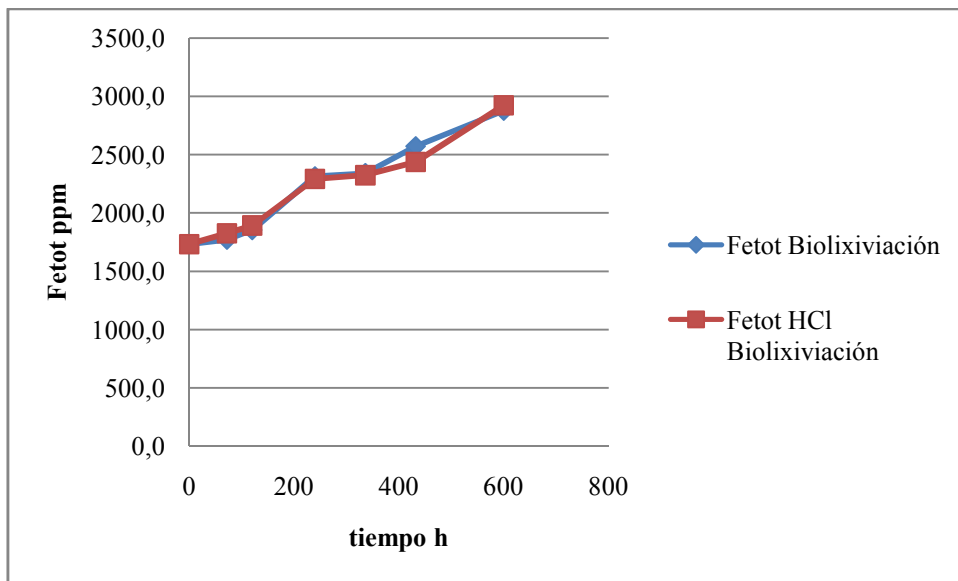


Figura 24: Variación de la concentración de hierro total por método de o-fenantrolina y digestión por HCl para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

La recuperación alcanzada por la acción de las cepas nativas se presenta en la figura 25, la cuál fue del 55% al final de las 600 horas.

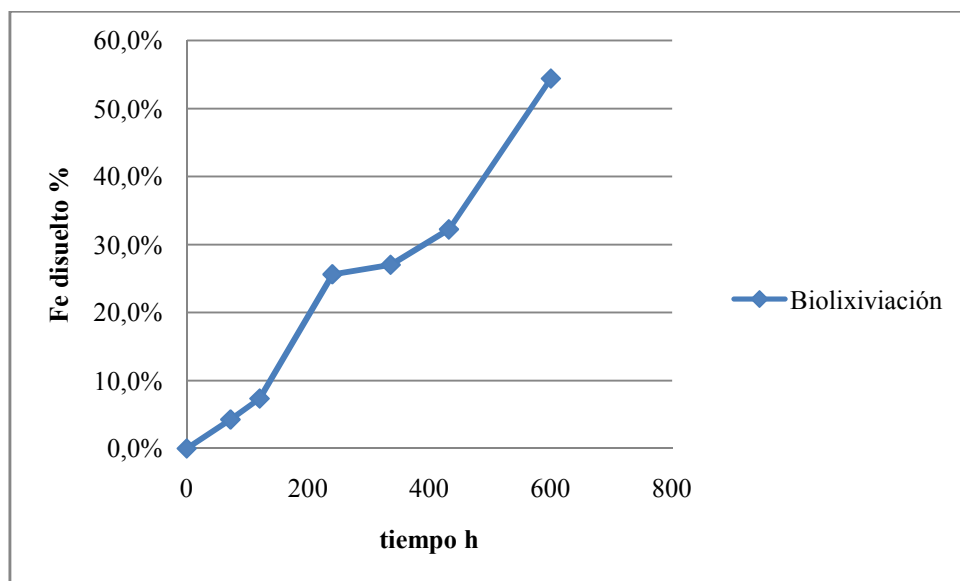


Figura 25: Recuperación de hierro para biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

### 3.3.4. Comparación y análisis de experiencias de biolixiviación.

Del gráfico 16 se observa claramente que cercano a la mitad de la duración del experimento (300 horas) la recuperación es similar para todos los casos. Sin embargo, en tiempos posteriores la recuperación por las cepas nativas sobrepasa a la de 5g/l de ión férrico en solución y más aún el de concentración 2,4g/l, ambas con *At. ferrooxidans*.

Al comparar la biolixiviación sólo por *At. ferrooxidans* el cambio en la velocidad de recuperación coincide con el instante en el que el potencial de los ensayos con 5g/l comienza a aumentar, a diferencia de los de 2,4g/l en los que se mantiene constante a lo largo del experimento.

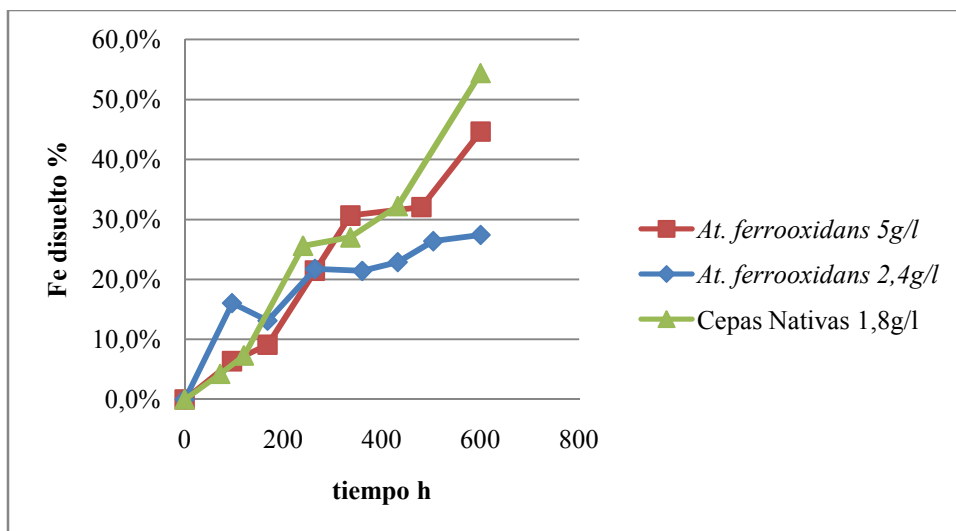


Figura 26: Comparación de los resultados en la recuperación de hierro desde la pirita para los diferentes experimentos.



A partir de los porcentajes de conversión de la pirita en hierro soluble se analiza mediante el modelo de núcleo sin reaccionar (MNSR) cuál es la etapa limitante en el proceso de biolixiviación de la pirita para ambos casos antes mencionados.

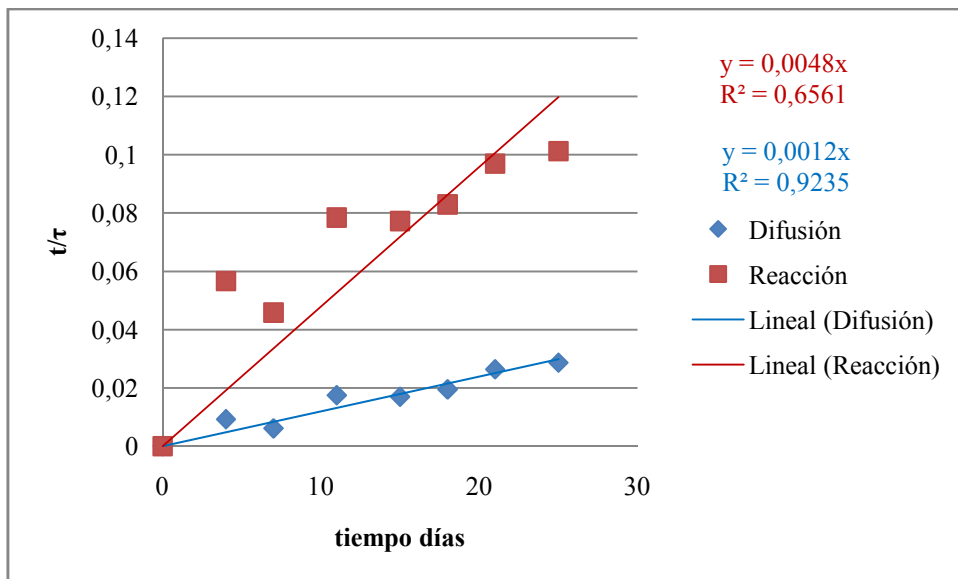


Figura 27: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 2,4g/l de ión férrico en solución.

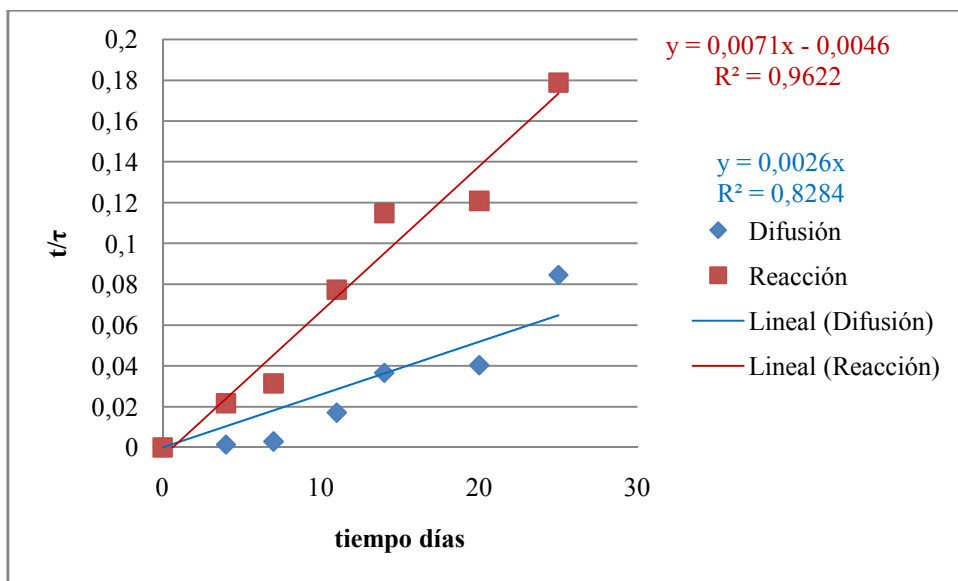


Figura 28: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por *At. ferrooxidans* con 5g/l de ión férrico en solución.

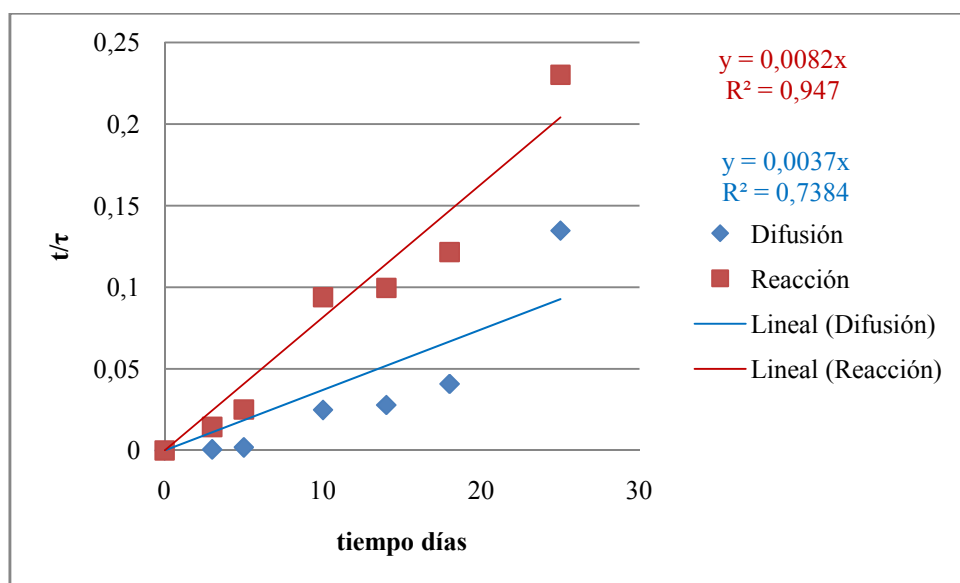


Figura 29: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico en solución.

De la aplicación del modelo de núcleo sin reaccionar se obtiene que la lixiviación de la pirita por *At. ferrooxidans* con una concentración de 2,4g/l de ión férrico en solución está dominada por la resistencia difusional de los productos de la reacción o cenizas. En cambio, para el caso de 5g/l la etapa dominante fue la reacción química. Idénticamente, la lixiviación mediada por las cepas nativas y 1,8g/l de ión férrico en solución fue dominada por la reacción química.

La etapa dominante se determinó en función del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) al aplicar el modelo de difusión y el de reacción. Aquella curva que presentó el  $R^2$  más cercano a la unidad, es la que se ajusta de mejor forma al modelo, por ende la que se asemeja de mejor manera lo ocurrido en la realidad. En la tabla 4 se presenta un resumen de los parámetros del modelo de núcleo sin reaccionar demarcando en color rojo los parámetros de la etapa controlante.

Tabla 2: Resultados del modelo de núcleo sin reaccionar para los diferentes experimentos de biolixiviación de pirita.

Experimento	Velocidad $\times 10^{-3}$ %/día		$\tau$ días		$R^2$	
	Difusión	Reacción	Difusión	Reacción	Difusión	Reacción
<i>At. fox.</i> 2,4g/l	1,2	4,8	833,3	208,3	0,92	0,66
<i>At. fox.</i> 5g/l	3,3	7,1	303,0	140,9	0,83	0,96
Cepas nativas 1,8g/l	3,7	8,2	270,3	122,0	0,74	0,95

Como se observa la lixiviación por *At. ferrooxidans* con concentración de ión férrico igual a 2,4g/l presenta la el mayor tiempo de residencia, 833,3 días. Para el caso de 5g/l de ión férrico en solución el tiempo de residencia disminuye considerablemente a 141 días aproximadamente, el cual es levemente mayor que el obtenido para el caso de las cepas nativas con 1,8g/l de ión

férrico en solución. Así, cuando controla difusión la velocidad de lixiviación es considerablemente menor que cuando controla reacción.

Pese a que la recuperación de las cepas nativas fue de un 55% y la de *At. ferrooxidans* con 5g/l de concentración de ión férrico de un 45% al final de las 600 horas, según el modelo de núcleo sin reaccionar la velocidad de lixiviación de la pirita es similar,  $7,1 \times 10^{-3}$  y  $8,2 \times 10^{-3}$  % recuperación/día.

### 3.4. Biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana por cepas nativas provenientes de PLS minera Escondida con concentración de ión férrico inicial: 1,8g/l.

La experiencia de biolixiviación de pirita por las cepas nativas corresponde a los valores de biolixiviación presentados en el capítulo 3.3.3 correspondientes a las dos primeras semanas de monitoreo, con un inóculo inicial de  $4 \times 10^7$  bacterias/ml. El experimento control se comporta de forma esperada, bajando el potencial durante toda la experiencia por lo que no se detecta contaminación. Para el caso del experimento sin adherencia bacteriana sufre un caída inicial para luego recuperarse y alcanzar potenciales similares a los de la biolixiviación directa, la concentración de microorganismos inicial fue de  $2 \times 10^8$  bacterias/ml (figura 30).

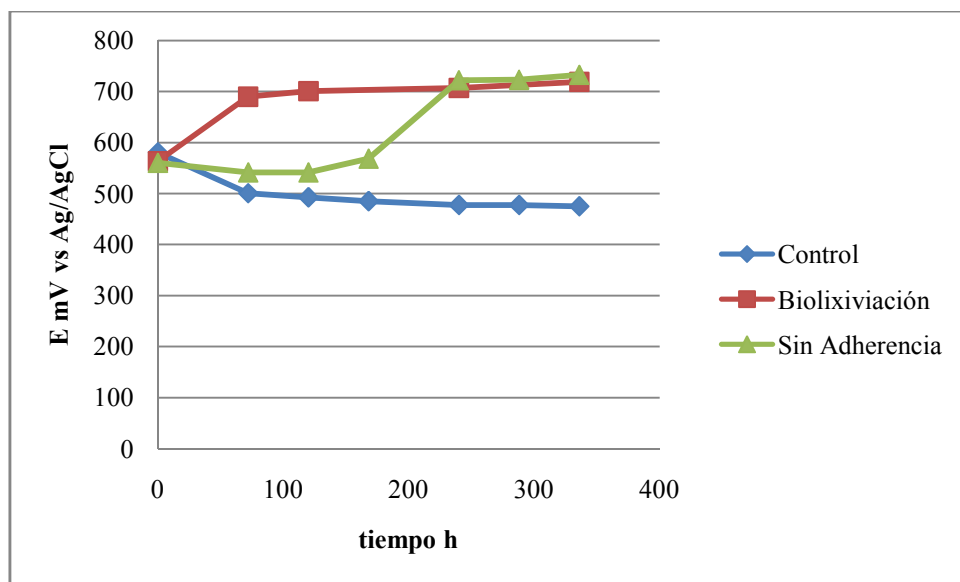


Figura 30: Variación del potencial en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

En el caso del pH para el caso de la biolixiviación directa de la pirita la tendencia es hacia la generación de ácido. En cambio, en los otros dos ensayos el pH disminuye en el inicio del monitoreo para luego incrementar. En el caso de la biolixiviación sin adherencia el incremento del pH se debe al consumo de protones por el metabolismo bacteriano, mientras que en el caso control se atribuye a la precipitación de hidróxidos férricos. Sin embargo, al final del al experiencia los experimentos de biolixiviación con y sin adherencia terminan con pH idénticos

como se observa en la figura 31. La precipitación del hierro en el ensayo control al final de la experiencia se puede observar en la figura 32 como una disminución de la concentración de hierro total en solución.

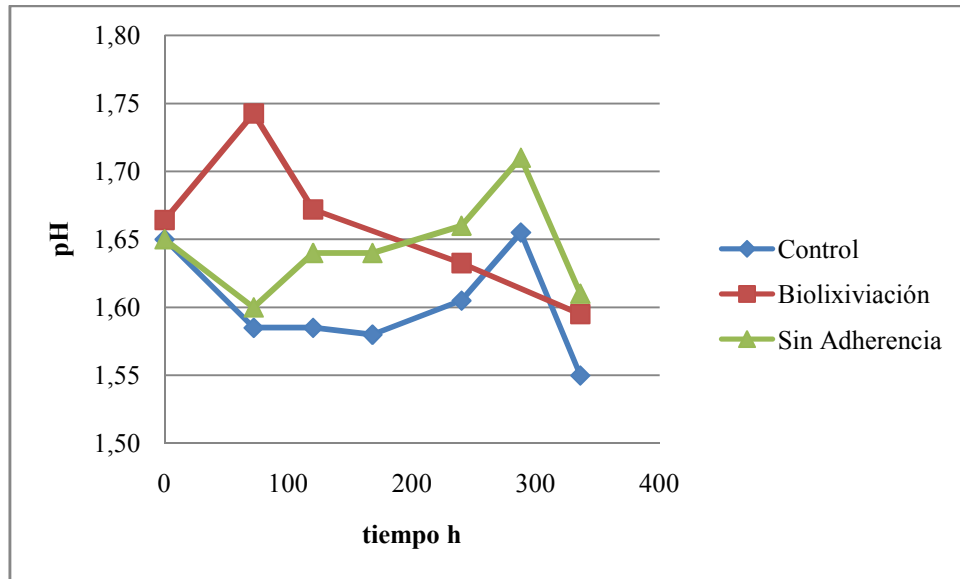


Figura 31: Variación del pH en el tiempo para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

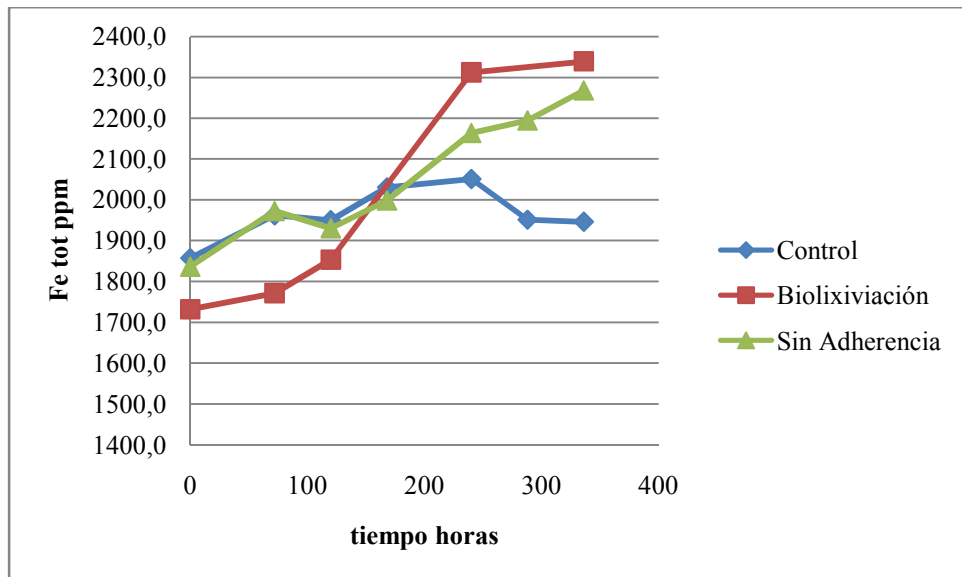


Figura 32: Variación del hierro total en solución para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

La recuperación máxima fue alcanzada por el experimento de biolixiviación por las cepas nativas en contacto con el mineral, llegando a un 28% de disolución del mineral. En el caso del experimento sin adherencia la recuperación llegó a un 20% y es notoriamente mayor al caso control como se aprecia en la figura 33.

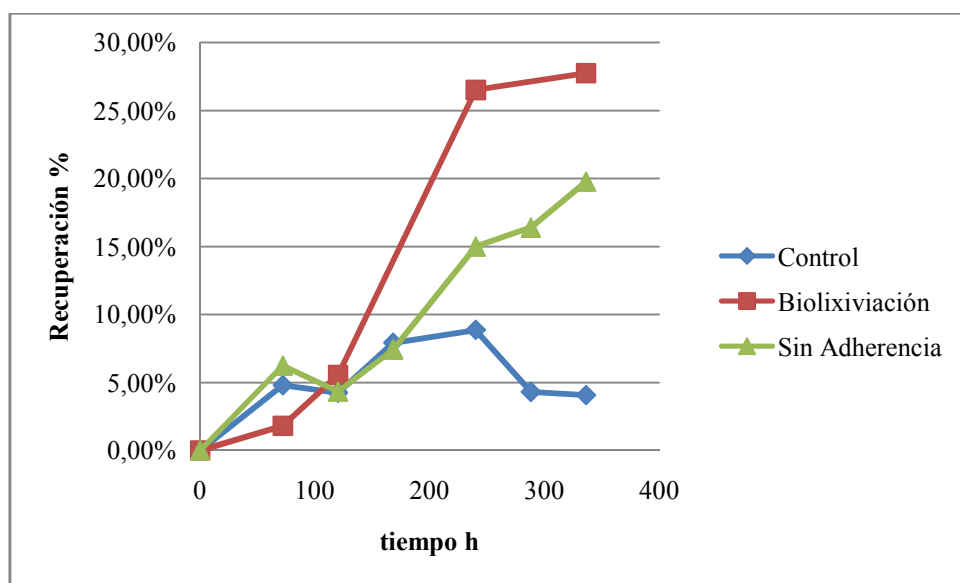


Figura 33: Recuperación de hierro para biolixiviación de pirita por cepas nativas sin adherencia con 1,8g/l de ión férrico inicial en solución a pH 1,6 con 100rpm de agitación y 30°C de temperatura.

De los resultados obtenidos se observa que al utilizar las cepas nativas provenientes del PLS de Minera Escondida se logra el propósito de mantener un potencial similar dentro del reactor para los casos en que las bacterias se pueden adherir sobre el mineral como en el que las bacterias se encuentran aisladas dentro del tubo. El tener idéntico potencial implica que el poder oxidante es el mismo en ambos experimentos, por ende los resultados son comparables.

Al aplicar el modelo de núcleo sin reaccionar (figuras 34 y 35) se obtiene que tanto en la biolixiviación de pirita con y sin adherencia están controladas por la reacción química. La velocidad de disolución del mineral es menor en el caso sin adherencia,  $4,8 \times 10^{-3}$ % recuperación/día, lo que se atribuye a período de tiempo en el que el potencial se mantuvo bajo el potencial del experimento de biolixiviación con posibilidad de adherencia que alcanzó un  $7,7 \times 10^{-3}$ % recuperación/ml.

Tabla 3: Resultados del modelo de núcleo sin reaccionar para lixiviación por cepas nativas.

Experimento	Velocidad $\times 10^{-3}$ %/día		$\tau$ días		$R^2$	
	Difusión	Reacción	Difusión	Reacción	Difusión	Reacción
<b>Sin adherencia</b>	0,8	4,8	1250	208	0,81	0,94
<b>Biolixiviación</b>	2,1	7,7	476	130	0,83	0,89

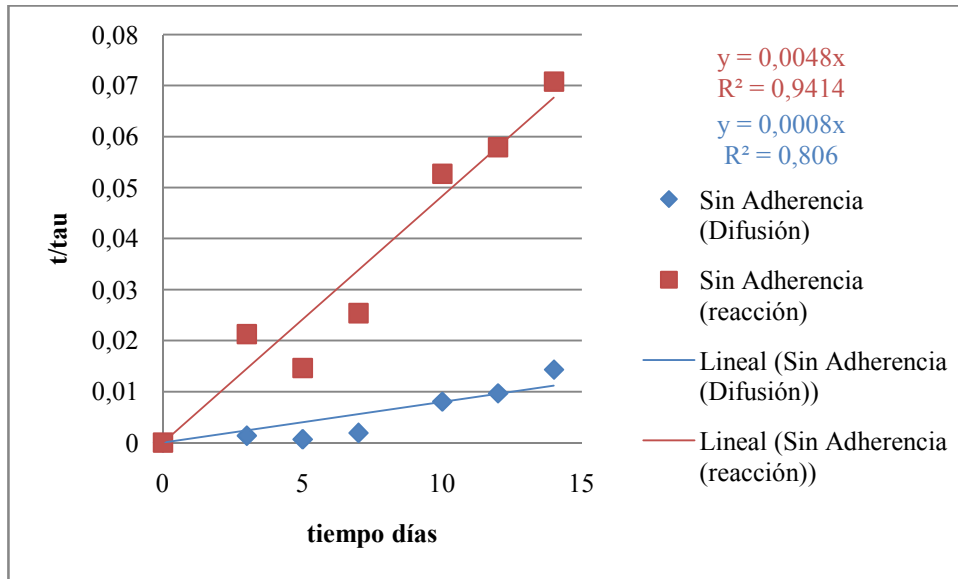


Figura 34: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita sin adherencia por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico en solución.

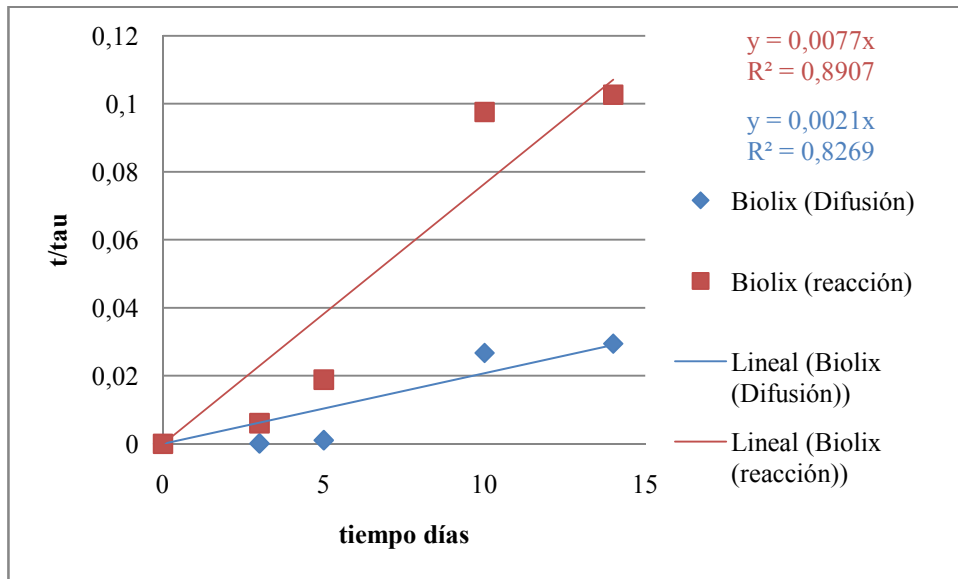


Figura 35: Modelo de núcleo sin reaccionar sobre resultados de biolixiviación de pirita por cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico en solución.

## 4. Capítulo 4: Discusión.

### 4.1. Biolixiviación de pirita.

Al comparar los resultados de la biolixiviación de pirita por la acción de *At. ferrooxidans* puro y cepas nativas provenientes de PLS de Minera Escondida se observa una notoria ventaja de utilizar el cultivo mixto por sobre el cultivo puro, pues el tiempo requerido para un 100% de lixiviación ( $\tau$ ) alcanzado por las cepas nativas en presencia de 1,8g/l de ión férrico fue 122 días con un 55% de recuperación al final de las 600 horas.

El  $\tau$  que más se acerca al presentado anteriormente se registró para la lixiviación con *At. ferrooxidans* para una concentración ión férrico de 5g/l, e igual a 141 días con una recuperación de 45% al final de las 600 horas. Es decir, se necesitó un incremento considerable de la concentración inicial del agente oxidante (2,5 veces aproximadamente) para tener resultados cercanos a los del cultivo mixto.

De la aplicación del modelo de núcleo sin reaccionar a los resultados de la experiencia de biolixiviación de pirita se obtuvo que para el cultivo con *At. ferrooxidans* y 2,4g/l de ión férrico inicial en solución la etapa controlante fue la difusión en las cenizas o productos de la reacción. En cambio, para la experiencia con 5g/l de ión férrico y en presencia de la cepa pura de *At. ferrooxidans* la etapa controlante pasó a ser la reacción química.

Para el caso de concentraciones similares de ión férrico en solución, 1,8g/l para las cepas nativas y 2,4g/l para *At. ferrooxidans*, la diferencia en la etapa controlante se puede atribuir a la baja adherencia registrada sobre el mineral por la cepa pura el cual sólo se adhirió en un 33% con un tiempo de monitoreo de hasta 24 horas. En cambio, las cepas nativas alcanzan casi un 100% de adherencia en sólo 90 minutos. Esto coincide con los resultados presentados por Rodríguez et al. (2003) quien registró bajas tasas de biolixiviación de pirita cuando la adherencia de *At. ferrooxidans* es tardía. El efecto de la adherencia de las bacterias en estos experimentos en que se permite el contacto entre las bacterias y el mineral, se puede otorgar principalmente a la capacidad azufre oxidante de los microorganismos involucrados.

Según el mecanismo del thiosulfato para la degradación de la pirita propuesta por Sand, la adherencia de los microorganismos es necesaria con el fin de concentrar los agentes oxidantes sobre la superficie del mineral. El producto de azufre principal de la disolución corresponde al sulfato o ácido sulfúrico, siendo el azufre elemental un producto lateral. La acción azufre oxidante bacteriana actúa sobre este azufre oxidándolo a sulfato.

Para el caso de *At. ferrooxidans* el metabolismo azufre-oxidante parecía encontrarse en un estado de latencia pues en el experimento de generación de sulfato a partir de azufre elemental la concentración de este ión comenzó a aumentar recién pasada una semana del inicio de la experiencia, y un similar comportamiento ocurrió con la disminución del pH. Por otra parte, las

cepas nativas registraron actividad oxidativa inmediata. El metabolismo azufre-oxidante de *At. ferrooxidans* es constitutivo. Sin embargo, como esta bacteria se cultiva en un medio con única fuente energética el ión ferroso, el metabolismo hierro-oxidante se ve inducido y predomina por sobre el azufre-oxidante.

En las experiencias de biolixiviación de pirita realizadas, nuevamente la fuente energética inicial es el ión ferroso generado por la lixiviación férrica, por ende la oxidación de los productos de azufre elemental que se depositan sobre la superficie del mineral difícilmente fueron utilizados por *At. ferrooxidans* como fuente energética, ya que este metabolismo se encontraba inhibido o atenuado.

Para el caso de las cepas nativas existe presencia de bacterias mesófilas que tienen ambos metabolismos oxidativos (*At. ferrooxidans*), hierro y azufre, pero también se encuentran microorganismos que usan sólo uno de estos sustratos como fuente de electrones, tal es el caso del *Leptospirillum ferrooxidans* que sólo capta electrones del ión ferroso y las bacterias del género *Sulfobacillus* que los obtiene del azufre. Por ende, la capacidad del cultivo nativo de disolver la barrera difusional propuesta por la capa de azufre elemental sobre la pirita se debe a esta variedad de microorganismos presentes forzando los metabolismos hierro-oxidante y azufre-oxidante para la sobrevivencia de las distintas cepas.

El ensayo de biolixiviación por *At. ferrooxidans* con 5g/l de ión férrico en solución presentó control por reacción química a diferencia de su similar con 2,4g/l. Esta diferencia se puede conceder a el mayor poder oxidante presente en la solución, y a que el inóculo utilizado para el caso de 5g/l proviene de las bacterias utilizadas en el experimento con 2,4g/l, por ende, estas bacterias pueden haber re-potenciado su actividad oxidativa de azufre al haber estado expuestos al azufre producido sobre la pirita en el experimento anterior.

#### **4.2. Biolixiviación de pirita sin adherencia.**

La presencia de la membrana entre la pirita y los microorganismos de biolixiviación opone una resistencia adicional al proceso de disolución del mineral. Esto se afirma en base a la diferencia existente entre los potenciales de los experimentos con y sin adherencia, diferencia que se distingue claramente al inicio de la experiencia de biolixiviación con las cepas nativas con 1,8g/l de ión férrico en solución. La disolución mediada por las cepas nativas presentaron resultados favorables, pues pese a que en los inicios de la experiencia los potenciales entre el experimento de biolixiviación con adherencia y el sin adherencia eran distintos, con el transcurso del tiempo estos se igualaron hasta el final de la experiencia. El mantener los potenciales iguales en ambos experimentos permite comparar el nivel de disolución de pirita bajo un mismo poder oxidante, detectando claramente el efecto que tiene la adherencia en el proceso de biolixiviación.



De los resultados del modelo para la biolixiviación por las cepas nativas se obtuvo que en ambos casos la etapa dominante fuera reacción química, alcanzando un tiempo de disolución igual a 130 días para el caso con posibilidad de adherencia y de 208 días para el caso en que las bacterias se encontraban separadas del mineral. Según el mecanismo del tiosulfato la adherencia bacteriana favorece la velocidad de biolixiviación, la que concuerda con los resultados expuestos, pues al permitir la adherencia de los microorganismos sobre la superficie del mineral existe una disminución del tiempo requerido para disolución total del sulfuro.

Para el caso del experimento sin adherencia bacteriana la etapa controlante fue la reacción química, por ende debe haber existido disolución de los subproductos pasivantes formados por la lixiviación férrica del mineral pese a la separación física existente entre los microorganismos y la superficie del mineral donde ocurre la disolución. Esto se puede atribuir a que la formación de los productos de azufre elemental provienen del ciclo del tiosulfato propuesto por Sand, en que los intermediarios de la reacción previo a la formación del azufre son solubles y pueden haber traspasado a través de la membrana y así contactarse con los microorganismos azufre-oxidantes presentes dentro del cultivo mixto inoculado en el interior del tubo separador.

Como se observa estos valores de  $\tau$  son mayores que los registrados para los experimentos de biolixiviación de pirita por cepas nativas por 600 horas. No obstante, es importante recalcar que el tiempo de monitoreo para los experimentos sin adherencia fue de 14 días alcanzando un recuperación máxima cercana al 28% para la biolixiviación por cepas nativas, mientras que para los otros fue de 25 días con una recuperación del 50% con el mismo inóculo antes mencionado, por lo que estos últimos modelan mejor el proceso y los resultados obtenidos para la velocidad de lixiviación son más representativos.

### **4.3. Discusiones generales y recomendaciones.**

Es importante mencionar que los experimentos realizados requirieron un exhaustivo monitoreo de la concentración de fierro en solución, pues la precipitación del ión férrico como jarositas disminuye el porcentaje de recuperación al medir la concentración de este ión sólo por el método de la o-fenantrolina. Debido a esto, se implementó el método de la digestión con ácido clorhídrico 5N, mediante el cual se pudo determinar el fierro total presente como sulfato férrico en solución y precipitados en la solución o sobre el mineral.

Sin embargo, la utilización de este método implicó que el experimento se realizara en varias copias, pues en cada instante de medición un grupo de matraces debía ser detenido para aplicar la digestión ácida, mientras los otros matraces continuaban en estudio. Esto provoca que los datos iniciales tengan una menor desviación del promedio calculado, ya que corresponden al promedio de siete ensayos en duplicado. En cambio, los datos finales corresponden a un solo ensayo en duplicado.

Para el caso de los estudios de biolixiviación sin adherencia el tratamiento con ácido clorhídrico 5N no fue realizado pues no se disponía de una suficiente cantidad de tubos separadores para realizar la cantidad de muestras y sus duplicados. Esto dificultó la medición del hierro total en la solución, debido a la precipitación de ión férrico como jarosita.

Se recomienda seguir trabajando sobre el diseño del reactor con tubo separador utilizado para los experimentos de biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana, de tal forma de maximizar el área de transferencia mediante la membrana, pero procurando que no existan fugas del inóculo desde el tubo hacia el matraz.

Los estudios de biolixiviación realizados en este trabajo fueron sobre una muestra de pirita con granulometría fina y bastante purificada, ya que provenía de los relaves de Minera Escondida. En base a esto, los experimentos realizados no son capaces de representar lo que ocurre en una pila industrial de biolixiviación, pues no se está considerando la forma nativa del mineral ni la ganga presente.

En una roca de mineral la pirita se puede encontrar atrapada en el interior de esta, por lo que las barreras difusionales para los reactivos de la biolixiviación son aún mayores que los expuestos en este trabajo. Más aún, la adherencia de los microorganismos sobre la pirita se encuentra limitada en forma física por la masa de ganga que rodea al mineral.

Es por esto que el estudio del efecto que tiene la adherencia de las bacterias al mineral es necesario, y se debe continuar su estudio con el fin de poder esclarecer que tan importante es el mecanismo por contacto directo en los procesos de biolixiviación.

## 5. Capítulo 5: Conclusiones.

La biolixiviación de pirita mediada por la acción metabólica de *At. ferrooxidans* está controlada por la difusión del agente oxidante a través de los subproductos de la reacción y requiere un tiempo para su disolución total de 833 días ante una concentración inicial de ión férrico en solución de 2,4g/l. Al aumentar al doble la concentración del ión oxidante, 5g/l el tiempo disminuye en 6 veces llegando a 141 días. Por ende, se concluye que en la biolixiviación por la cepa pura al incrementar la concentración del ión férrico en la solución, se favorece para la conversión final de la pirita, pasando de un 27% de recuperación a un 45%.

La utilización de un cultivo mixto de cepas nativas provenientes de PLS de Minera Escondida presentaron los mejores rendimientos tanto en conversión como del tiempo de biolixiviación de la pirita, 55% y 122 días, respectivamente. Lo anterior se atribuye a la alta actividad azufre oxidante presentada por las cepas nativas que permite disminuir las barreras difusionales existentes por la generación de productos insolubles en la reacción de disolución de la pirita. Esto se complementa con la baja tasa de adherencia presentada por el cultivo puro de *At. ferrooxidans* (33,3%) en comparación con la cepas nativas (~100%).

En relación a los experimentos de biolixiviación sin adherencia, se observó que el hecho de que los microorganismos de Escondida no pudieran adherirse a la superficie de la pirita implicó una menor recuperación de hierro y una menor velocidad de lixiviación al comparar con el caso de la biolixiviación con posibilidad de contacto.

Por ende, se establece que la adherencia bacteriana sobre el mineral puro de pirita influye positivamente en la lixiviación de éste.

## 6. Bibliografía.

Ballester, A. (2005). "Mecanismo de biolixiviación". En: "Fundamentos y perspectivas de las tecnologías biomineras" Editado por Acevedo F. y Gentina J.C. 1ª Edición, Ediciones Universitarias de Valparaíso, Valparaíso, 9-24.

Brierley, J.A. (2000). "2000 Wadsworth award lecture: Expanding role of microbiology in metallurgical processes". *Mining Engineering* 52: 49-53.

Crundwell, F.K. (2003). "How do bacteria interact with minerals?". *Hydrometallurgy* 71: 71-81.

Demergasso, C., Galleguillos, P., Escudero, L., Zepeda, V., Castillo, D., Casamayor, E. (2005). "Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap". *Hydrometallurgy* 80: 241-253.

Fowler, T.A., Holmes, P.R., Crundwell, F.K. (1999). "Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*". *Applied and Environmental Microbiology* Vol 65 N°7: 2987-2993.

Holmes, P.R., Fowler, T.A., Crundwell, F.K. (1999). "The mechanism of bacterial action in the leaching of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*: an electrochemical study". *J. Electrochem. Soc.* 146: 2906-2912.

Levenspiel, O. (1993). "Ingeniería de las Reacciones Químicas". Reverté Ediciones S.A. México D.F. 397-411.

Lindström, B. et al. (1992). "Solid-Phase products of bacterial oxidation of arsenical pyrite". *Applied and environmental microbiology* Vol 58 N°3: 1046-1049.

Lowson, R. (1982). "Aqueous oxidation of pyrite by molecular oxygen". *Chemical Reviews* Vol 82 N° 5: 461-497.

Petersen, J., Dixon, D. (2002). "Thermophilic heap leaching of a chalcopyrite concentrate". *Minerals Engineering* 15: 777-785.

Petersen, J., Dixon, D. (2006). "Competitive bioleaching of pyrite and chalcopyrite". *Hydrometallurgy* 83: 40-49.

Rawling, D.E. (1998). "Industrial practice and the biology of leaching of metals from ores: The 1997 Pan labs lecture". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 268-274.

Rawling, D.E. (2002). "Mining using microbes". *Annual Review Microbiology* 56: 65-91.

Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W. (2003). "Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation". *Applied Microbiological Biotechnology* 63: 239-248.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M.L. González, F., Muñoz, J.A. (2003). “New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature”. *Hydrometallurgy* 71: 37-46.

Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P., Schippers, A. (2001). “(Bio)chemistry of bacterial leaching – direct vs. indirect bioleaching” *Hydrometallurgy* 59: 159-175.

Wang, H., Bigham, J., Touvinen, O. (2007). “Oxidation of marcasite and pyrite by iron-oxidizing bacteria and archea”. *Hydrometallurgy* 88: 127-131.

Watling, H.R. (2006). “The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – A review”. *Hydrometallurgy* 84: 81-108.

Yamanaka, T. (1995). “Molecular aspects of the electron transfer system which participates in the oxidation of ferrous ion by *Thiobacillus ferrooxidans*”. *FEMS Microbiology Reviews* 17. 401-413.

## 7. Anexos.

### A) Modelo del Núcleo sin Reaccionar.

En el mecanismo de lixiviación basado en el modelo del núcleo sin reaccionar se pueden distinguir las siguientes etapas:

1. Difusión de los reactivos lixiviantes ( $H^+$ ,  $Fe^{+3}$ ) a través de la capa límite del fluido hacia la superficie de la partícula.
2. Los reactivos lixiviantes difunden en el interior de la partícula hacia la zona de reacción.
3. Se realiza la reacción química, formándose los productos.
4. Los productos solubles de la reacción ( $Fe^{+2}$ ) difunden a través de la ceniza hacia la superficie de la partícula.
5. Los productos solubles difunden a través de la capa límite hacia el seno de la solución.

Por otra parte, las resistencias de las distintas etapas suelen ser muy diferentes; en tales casos hemos de tener en cuenta que la etapa que presente mayor resistencia constituye la etapa controlante de la velocidad de lixiviación.

La velocidad de lixiviación es inicialmente alta ya que el reactivo ataca directamente a los minerales de pirita presentes en la superficie de la partícula. Con el tiempo la velocidad de lixiviación decae porque la superficie de reacción está cada vez más alejada de la superficie de la partícula y entonces los reactivos y productos toman más tiempo en desplazarse al interior de la partícula.

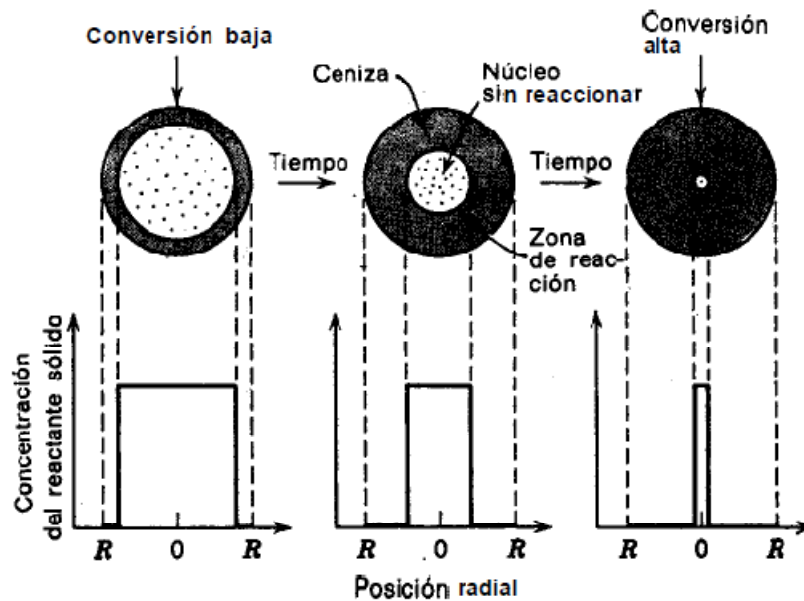


Figura 36: Esquema de proceso de lixiviación en el tiempo según modelo de núcleo sin reaccionar (Levenspiel).

A continuación se muestran las ecuaciones de conversión tiempo para partículas esféricas de tamaño constante según el modelo del núcleo sin reaccionar (Levenspiel).

**Tabla 4: Ecuaciones conversión tiempo del modelo de núcleo sin reaccionar.**

Conversión	Control por la difusión en la película	Control por la difusión en las cenizas	Control por la reacción
$X_b = 1 - \left(\frac{r_c}{R}\right)^2$	$\frac{t}{\tau} = X_b$	$\frac{t}{\tau} = 1 - 3(1 - X_b)^{2/3} + 2(1 - X_b)$	$\frac{t}{\tau} = 1 - (1 - X_b)^{1/3}$

Donde  $X_b$  corresponde a la conversión alcanza por la partícula en cierto instante de tiempo ( $t$ ). La partícula esférica tiene un radio constante durante todo el proceso de tamaño ( $R$ ) Sin embargo, el radio del núcleo sin reaccionar ( $r_c$ ) disminuye con la acción de los agentes lixiviantes en el tiempo. Cuando el radio del núcleo llega a cero, es decir, a un 100% de conversión el tiempo transcurrido corresponde a  $\tau$  el cual depende de la resistencia que controla el proceso de lixiviación del mineral.

**Tabla 5: Tiempos para conversión total según modelo de núcleo sin reaccionar.**

Control por la difusión en la película	Control por la difusión en las cenizas	Control por la reacción
$\tau = \frac{\rho_b R}{3bk_y C_{Ag}}$	$\tau = \frac{\rho_b R^2}{6bD_e C_{Ag}}$	$\tau = \frac{\rho_b R}{bk_s C_{Ag}}$

Los parámetros de las ecuaciones son:  $\rho_b$ , densidad molar del sustrato a lixiviar;  $b$ , constante estequiométrica de la pirita en la reacción de biolixiviación;  $k_y$ , coeficiente de transferencia de masa;  $D_e$ , coeficiente de difusión en la ceniza y  $C_{Ag}$  es la concentración del reactante en la superficie del mineral.

## B) Tablas de datos: Biolixiviación de Pirita.

### a. Por *Acidithiobacillus ferrooxidans* con concentración de ión férrico inicial: 2,4 g/l.

Tabla 6: Potenciales para biolixiviación por *At. ferrooxidans*. y 2,4g/l, valores en milivolts.

Fecha	24-nov	28-nov	01-dic	05-dic	09-dic	12-dic	15-dic	19-dic
tiempo [horas]	0	96	168	264	360	432	504	600
C1	562	499						
M1.1	673	619						
M1.2	674	618						
C2	562	498	493					
M2.1	665	610	585					
M2.2	670	617	590					
C3	556	495	487	483				
M3.1	665	618	588	599				
M3.2	671	619	590	605				
C4	565	496	486	484	480			
M4.1	667	622	590	598	567			
M4.2	666	619	590	602	566			
C5	583	496	488	481	475	477		
M5.1	667	619	590	600	562	561		
M5.2	667	622	596	605	571	566		
C6	564	495	489	481	476	477	552	
M6.1	653	618	594	601	566	563	558	
M6.2	656	620	595	605	568	564	559	
C7	565	495	487	487	474	486	550	558
M7.1	663	621	602	605	572	571	567	568
M7.2	659	615	509	601	566	561	555	555
PROMEDIOS								
Control	565	496	488	483	476	480	551	558
Biolix	665	618	585	602	567	564	560	562



**Tabla 7: pH para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 2,4g/l.**

Fecha	24-nov	28-nov	01-dic	05-dic	09-dic	12-dic	15-dic	19-dic
tiempo [horas]	0	96	168	264	360	432	504	600
C1	1,55	1,55						
M1.1	1,55	1,58						
M1.2	1,55	1,57						
C2	1,55	1,6	1,5					
M2.1	1,57	1,57	1,52					
M2.2	1,56	1,57	1,52					
C3	1,55	1,54	1,5	1,52				
M3.1	1,58	1,56	1,55	1,55				
M3.2	1,55	1,56	1,54	1,52				
C4	1,58	1,54	1,5	1,51	1,52			
M4.1	1,57	1,55	1,52	1,52	1,52			
M4.2	1,58	1,56	1,51	1,52	1,48			
C5	1,56	1,55	1,5	1,5	1,47	1,5		
M5.1	1,56	1,56	1,51	1,56	1,49	1,5		
M5.2	1,56	1,56	1,54	1,53	1,49	1,51		
C6	1,56	1,54	1,49	1,51	1,48	1,5	1,51	
M6.1	1,56	1,56	1,52	1,52	1,48	1,52	1,51	
M6.2	1,61	1,54	1,54	1,52	1,5	1,51	1,51	
C7	1,55	1,53	1,5	1,53	1,5	1,51	1,5	1,5
M7.1	1,56	1,54	1,52	1,52	1,51	1,51	1,5	1,5
M7.2	1,56	1,56	1,51	1,55	1,53	1,52	1,51	1,5
PROMEDIOS								
Control	1,56	1,55	1,50	1,51	1,49	1,50	1,51	1,50
Biolix	1,57	1,56	1,53	1,53	1,50	1,51	1,51	1,50

**Tabla 8: Fe<sup>+2</sup> para biolixiviación por *At. fox.* y 2,4g/l, valores en ppm.**

Fecha	24-nov	28-nov	01-dic	05-dic	09-dic	12-dic	15-dic	19-dic
tiempo [horas]	0	96	168	264	360	432	504	600
C1	87	436						
M1.1	18	17						
M1.2	4	11						
C2	87	449	414					
M2.1	8	17	1					
M2.2	8	9	1					
C3	100	451	349	474				
M3.1	5	6	0	72				
M3.2	4	27	1	61				
C4	81	495	368	461	409			
M4.1	3	6	2	76	84			
M4.2	14	8	3	68	87			
C5	50	457	407	432	492	431	16	
M5.1	12	11	3	76	86	110		
M5.2	2	9	1	60	74	93		
C6	81	473	362	476	469	462	172	
M6.1	9	14	1	73	78	102	140	
M6.2	7	6	1	66	77	97	127	
C7	71	453	439	472	474	425	161	151
M7.1	8	8	0	63	71	80	110	111
M7.2	3	14	4	75	89	108	147	155
PROMEDIOS								
Control	80	459	390	463	461	439	116	151
Biolix	7	12	1	69	81	98	131	133

**Tabla 9. Fe<sup>total</sup> para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 2,4g/l, valores en ppm.**

Fecha	24-nov	28-nov	01-dic	05-dic	09-dic	12-dic	15-dic	19-dic
tiempo [horas]	0	96	168	264	360	432	504	600
C1	2715	3121						
M1.1	2402	2778						
M1.2	2626	2897						
C2	2572	2592	2472					
M2.1	2490	2574	2595					
M2.2	2515	2768	2528					
C3	2456	2567	2447	2501				
M3.1	2429	2664	2418	2808				
M3.2	2507	2943	2629	2834				
C4	2613	2596	2411	2735	2517			
M4.1	2476	2617	2588	3186	2883			
M4.2	2323	2694	2622	2883	2852			
C5	2542	2567	2460	2660	2573	2659		
M5.1	2473	2690	2676	2665	2834	3047		
M5.2	2421	2552	2560	3022	2791	2860		
C6	2489	2560	2454	2752	2643	2632	2561	
M6.1	2439	2610	2516	2858	3050	2904	2855	
M6.2	2320	2579	2611	2827	2775	2943	3032	
C7	2415	2566	2481	2604	2529	2637	2715	2712
M7.1	2478	2602	2558	2697	2730	2863	2895	2908
M7.2	2742	2609	3119	2658	2656	2749	2820	2905
PROMEDIOS								
Control	2543	2653	2454	2651	2566	2643	2638	2712
Biolix	2474	2684	2618	2844	2822	2938	2875	2908

**Tabla 10: Fe<sup>+3</sup> para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 2,4g/l, valores en ppm.**

Fecha	24-nov	28-nov	01-dic	05-dic	09-dic	12-dic	15-dic	19-dic
tiempo [horas]	0	96	168	264	360	432	504	600
C1	2628	2685						
M1.1	2384	2761						
M1.2	2621	2887						
C2	2486	2143	2057					
M2.1	2482	2556	2594					
M2.2	2508	2758	2528					
C3	2356	2116	2097	2027				
M3.1	2424	2658	2418	2736				
M3.2	2504	2917	2628	2773				
C4	2532	2101	2043	2274	2108			
M4.1	2473	2610	2586	3110	2799			
M4.2	2309	2687	2619	2815	2765			
C5	2492	2110	2052	2228	2082	2228		
M5.1	2461	2680	2674	2590	2748	2937		
M5.2	2419	2543	2559	2962	2718	2767		
C6	2408	2087	2093	2276	2174	2170	2389	
M6.1	2430	2595	2515	2785	2972	2802	2715	
M6.2	2313	2573	2610	2760	2699	2846	2906	
C7	2344	2113	2042	2132	2055	2211	2554	2561
M7.1	2470	2594	2558	2634	2660	2783	2785	2797
M7.2	2740	2596	3115	2583	2566	2641	2673	2749
PROMEDIOS								
Controles	2464	2194	2064	2188	2105	2203	2471	2561
Biolix	2467	2673	2617	2775	2741	2796	2770	2773

**Tabla 11: Fe<sup>tot</sup> por digestión con HCl y recuperación para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 2,4g/l, valores en ppm**

Fecha	24-nov	28-nov	01-dic	05-dic	09-dic	12-dic	15-dic	19-dic
tiempo [horas]	0	96	168	264	360	432	504	600
<b>Fe tot HCl</b>								
<b>Control</b>	2543	2719	2644	2656	2849	2813	2815	2815
<b>Biolix</b>	2474	2825	2762	2950	2943	2975	3051	3074
<b>Recuperación</b>								
<b>Control</b>	0,0%	8,1%	4,6%	5,1%	14,0%	12,3%	12,4%	12,4%
<b>Biolix</b>	0,0%	16,0%	13,1%	21,7%	21,4%	22,9%	26,4%	27,4%

**b. Por *Acidithiobacillus ferrooxidans* con concentración de ión férrico inicial: 5 g/l.**

**Tabla 12: Potenciales para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 5g/l, valores en milivolts.**

Fecha	23-dic	27-dic	30-dic	03-ene	06-ene	12-ene	17-ene
tiempo [horas]	0	96	168	264	336	480	600
C1	584	504					
M1.1	596	579					
M1.2	596	579					
C2	579	502	497				
M2.1	593	585	575				
M2.2	595	580	571				
C3	581	500	493	553			
M3.1	595	583	571	564			
M3.2	595	584	573	566			
C4	583	500	495	490	516		
M4.1	595	585	575	568	583		
M4.2	597	586	572	567	578		
C5	576	498	492	503	564	578	
M5.1	599	589	576	568	573	571	
M5.2	593	587	572	565	721	740	
C6	578	498	493	486	491	559	547
M6.1	596	589	578	568	569	560	547
M6.2	596	592	578	572	569	560	550
C7	577	498	493	544	552	547	537
M7.1	597	580	573	564	564	735	745
M7.2	597	584	571	558	557	547	686
PROMEDIOS							
Control	580	500	494	515	531	561	542
Biolix	596	584	574	566	589	619	632

**Tabla 13: pH para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 5g/l.**

Fecha	23-dic	27-dic	30-dic	03-ene	06-ene	12-ene	17-ene
tiempo [horas]	0	96	168	264	336	480	600
C1	1,6	1,54					
M1.1	1,6	1,59					
M1.2	1,6	1,61					
C2	1,6	1,55	1,56				
M2.1	1,6	1,59	1,6				
M2.2	1,6	1,58	1,6				
C3	1,6	1,55	1,56	1,56			
M3.1	1,6	1,59	1,58	1,52			
M3.2	1,6	1,59	1,61	1,55			
C4	1,6	1,57	1,56	1,5	1,47		
M4.1	1,6	1,59	1,6	1,53	1,53		
M4.2	1,6	1,61	1,62	1,53	1,51		
C5	1,6	1,57	1,56	1,54	1,52	1,56	
M5.1	1,6	1,6	1,59	1,55	1,51	1,56	
M5.2	1,6	1,61	1,59	1,57	1,51	1,52	
C6	1,6	1,6	1,56	1,52	1,5	1,57	1,59
M6.1	1,6	1,61	1,6	1,54	1,52	1,55	1,57
M6.2	1,6	1,61	1,59	1,56	1,52	1,56	1,57
C7	1,6	1,57	1,57	1,56	1,53	1,56	1,56
M7.1	1,6	1,61	1,59	1,54	1,51	1,53	1,56
M7.2	1,6	1,55	1,59	1,54	1,47	1,5	1,5
PROMEDIOS							
Control	1,60	1,56	1,56	1,54	1,51	1,56	1,58
Biolix	1,60	1,60	1,60	1,54	1,51	1,54	1,55

**Tabla 14: Fe<sup>+2</sup> para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 5g/l, valores en ppm.**

Fecha	23-dic	27-dic	30-dic	03-ene	06-ene	12-ene	17-ene
tiempo [horas]	0	96	168	264	336	480	600
C1	87	1418					
M1.1	18	134					
M1.2	4	119					
C2	87	1524	1869				
M2.1	8	92	127				
M2.2	8	117	164				
C3	100	1538	1982	162			
M3.1	5	87	232	115			
M3.2	4	119	154	233			
C4	81	1433	1850	1583	2145		
M4.1	3	112	143	121	232		
M4.2	14	119	170	167	238		
C5	50	1604	1951	1260	344	370	
M5.1	12	118	193	132	232	264	
M5.2	2	106	181	222	23	29	
C6	81	1530	1910	2115	2438	446	606
M6.1	9	86	153	141	233	274	392
M6.2	7	137	167	202	377	269	363
C7	71	1543	1958	267	338	438	492
M7.1	8	75	195	164	221	22	94
M7.2	3	127	173	170	310	411	73
PROMEDIOS							
Control	80	1513	1920	1077	1316	418	549
Biolix	7	111	171	167	233	212	231

**Tabla 15: Fe<sup>total</sup> para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 5g/l, valores en ppm.**

Fecha	23-dic	27-dic	30-dic	03-ene	06-ene	12-ene	17-ene
tiempo [horas]	0	96	168	264	336	480	600
C1	5158	5617					
M1.1	5221	5389					
M1.2	5344	5527					
C2	5183	5326	5267				
M2.1	5169	5443	5508				
M2.2	5377	5509	5622				
C3	5280	5501	5381	5200			
M3.1	5275	5563	5604	4394			
M3.2	5540	5353	5625	6657			
C4	5133	5218	5267	5198	5194		
M4.1	5258	5377	5462	5530	5608		
M4.2	5303	5497	5556	5567	5468		
C5	5172	5313	5443	5409	5516	5169	
M5.1	5224	5232	5563	5553	5517	5747	
M5.2	5581	5470	5578	5675	5445	5947	
C6	5043	5363	5294	5375	5284	5380	5666
M6.1	5159	5508	5656	5476	5669	5844	5980
M6.2	5864	5512	5505	5660	5677	5712	5820
C7	5283	5399	5303	5408	5427	5474	5755
M7.1	5127	5576	5613	5658	5699	5766	6321
M7.2	5107	5656	5545	5637	5699	5766	5932
PROMEDIOS							
Control	5179	5391	5326	5318	5355	5341	5711
Biolix	5325	5472	5570	5580	5598	5786	6150



**Tabla 16: Fe<sup>+3</sup> para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 5g/l, valores en ppm.**

Fecha	23-dic	27-dic	30-dic	03-ene	06-ene	12-ene	17-ene
tiempo [horas]	0	96	168	264	336	480	600
C1	5071	4200					
M1.1	5203	5255					
M1.2	5340	5408					
C2	5096	3802	3398				
M2.1	5161	5351	5381				
M2.2	5369	5392	5458				
C3	5180	3963	3399	5038			
M3.1	5270	5476	5372	4279			
M3.2	5536	5234	5471	6424			
C4	5052	3785	3417	3615	3049		
M4.1	5255	5265	5319	5409	5376		
M4.2	5289	5379	5386	5400	5230		
C5	5122	3708	3492	4149	5172	4799	
M5.1	5212	5114	5370	5421	5286	5483	
M5.2	5579	5364	5397	5452	5422	5918	
C6	4961	3833	3384	3261	2845	4934	5061
M6.1	5150	5422	5503	5335	5436	5570	5587
M6.2	5857	5375	5338	5458	5300	5444	5456
C7	5212	3856	3345	5141	5089	5036	5264
M7.1	5118	5501	5418	5494	5479	5744	6227
M7.2	5104	5530	5372	5467	5389	5355	5858
PROMEDIOS							
Control	5099	3878	3406	4241	4039	4923	5162
Biolix	5317	5362	5399	5414	5365	5585	5782

**Tabla 17: Fe<sup>tot</sup> por HCl y recuperación para biolixiviación por *At. ferrooxidans* y 5g/l, valores en ppm**

Fecha	23-dic	27-dic	30-dic	03-ene	06-ene	12-ene	17-ene
tiempo [horas]	0	96	168	264	336	480	600
<b>Fe tot HCl</b>							
<b>Control [ppm]</b>	5179	5282	5549	5534	5639	5707	5795
<b>Biolix [ppm]</b>	5325	5464	5524	5794	5995	6026	6302
<b>Recuperación</b>							
<b>Control</b>	0,0%	4,7%	16,9%	16,2%	21,1%	24,1%	28,1%
<b>Biolix</b>	0,0%	6,4%	9,1%	21,5%	30,6%	32,0%	44,6%

**c. Por cepas nativas provenientes de PLS Minera Escondida con concentración de ión férrico inicial: 1,8g/l.**

**Tabla 18: Potenciales para biolixiviación por cepas nativas, valores en milivolts.**

Fecha	tiempo [horas]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PROMEDIO
14-11-2008	0	580	580	559	563	561	556	559	556	564	562	566	554	563
17-11-2008	72	577	687	691	699	698	699	702	706	704	706	704	705	690
19-11-2008	120			692	695	694	706	706	711	704	706	709	687	701
24-11-2008	240					690	699	707	711	711	713	711	716	707
28-11-2008	336							707	723	721	719	730	714	719
02-12-2008	432									722	718	725	732	724
09-12-2008	600											713	716	715

**Tabla 19: pH para biolixiviación por cepas nativas.**

Fecha	Tiempo [horas]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PROMEDIO
14-11-2008	0	1,66	1,63	1,65	1,63	1,71	1,65	1,66	1,66	1,67	1,66	1,69	1,7	1,66
17-11-2008	72	1,75	1,78	1,72	1,75	1,76	1,72	1,72	1,75	1,76	1,76	1,75	1,69	1,74
19-11-2008	120			1,66	1,62	1,65	1,63	1,73	1,69	1,63	1,69	1,7	1,72	1,67
24-11-2008	240					1,68	1,66	1,62	1,61	1,65	1,59	1,64	1,61	1,63
28-11-2008	336							1,57	1,61	1,63	1,59	1,6	1,57	1,60
02-12-2008	432									1,65	1,58	1,54	1,5	1,57

**Tabla 20: Fe<sup>tot</sup> para biolixiviación por cepas nativas, valores en ppm.**

Fe <sup>tot</sup>	Tiempo [horas]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PROM
14-11-2008	0	1696	1746	1680	1734	1684	1700	1736	1686	1746	1822	1809	1744	1732
17-11-2008	72	1812	1697	1690	1746	1739	1820	1765	1815	1755	1829	1800	1788	1771
19-11-2008	120			1774	1890	1768	1918	1799	1929	1879	1875	1902	1797	1853
24-11-2008	240					2182	2289	2159	2538	2246	2506	2291	2284	2312
28-11-2008	336							2200	2297	2273	2392	2339	2532	2339
02-12-2008	432									2373	2399	2707	2806	2571
09-12-2008	600											2690	3060	2875

Tabla 21: Fe<sup>tot</sup> por HCl y recuperación para biolixiviación por cepas nativas, valores en ppm.

tiempo [horas]	Fetot HCl	Recuperación
0	1731,9	0,0%
72	1824,9	4,3%
120	1892,3	7,3%
240	2292,1	25,6%
336	2323,0	27,0%
432	2436,8	32,2%
600	2922,0	54,4%

### C) Tablas de datos: Adherencia Bacteriana.

Tabla 22: Adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

tiempo h	Cel/ml	% Adherido
0	2,40E+08	0,0%
0,25	1,60E+08	33,3%
0,5	1,60E+08	33,3%
1	1,60E+08	33,3%
1,5	1,60E+08	33,3%
2	1,60E+08	33,3%
24	1,60E+08	33,3%

Tabla 23: Adherencia de cepas nativas.

Frasco 1		Frasco 2		PROMEDIO	
t min	Cel/ml	t min	Cel/ml	Cel/ml	%
0	4,00E+07	0	4,00E+07	4,00E+07	0,00%
15	2,00E+07	15	2,00E+07	2,00E+07	50,00%
30	1,00E+07	30	2,00E+07	1,50E+07	62,50%
60	3,10E+06	60	7,50E+06	5,30E+06	86,75%
90	6,00E+05	90	6,00E+05	6,00E+05	98,50%

**D) Tablas de datos: Comparación en la generación de sulfato entre *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas.**

**Tabla 24: pH para ambos experimentos.**

tiempo [días]	0	4	6	7	11	12	13
<b>Cepas nativas</b>							
<b>1</b>	2,25	1,78	1,49	1,39	1,05	1,1	1,02
<b>2</b>	2,27	1,84	1,57	1,55	1,32	1,21	1,21
<b>PROMEDIO</b>	2,26	1,81	1,53	1,47	1,19	1,16	1,12
<b><i>At. fox.</i></b>							
<b>1</b>	2,29	2,31	2,3	2,28	1,73	1,24	1,16
<b>2</b>	2,29	2,33	2,29	2,33	1,47	1,14	1,12
<b>PROMEDIO</b>	2,29	2,32	2,30	2,31	1,6	1,19	1,14

**Tabla 25: Concentración de ión sulfato para ambos experimentos, valores en ppm.**

tiempo [días]	0	4	6	7	11	12	13
<b>Cepas Nativas</b>							
<b>1</b>	935,7	1585,8	1748,7	2446,5	2030,5	2089,9	2620,9
<b>2</b>	935,7	1437,5	1614,1	1841,4	2016,3	2001,2	2386,4
<b>PROMEDIO</b>	935,7	1511,7	1681,4	2144,0	2023,4	2045,6	2503,7
<b><i>At. fox.</i></b>							
<b>1</b>	935,7	794,7	799,6	854,4	1494,0	2344,0	2732,6
<b>2</b>	935,7	835,9	888,4	883,6	2060,8	1992,0	2682,3
<b>PROMEDIO</b>	935,7	815,3	844,0	869,0	1777,4	2168,0	2707,5

## E) Tablas de datos: Biolixiviación de pirita sin adherencia bacteriana.

Tabla 26: Promedios obtenidos para biolixiviación sin adherencia por cepas nativas.

<b>Control</b>				
<b>Tiempo horas</b>	<b>Eh mV</b>	<b>pH</b>	<b>Fe<sup>tot</sup> ppm</b>	<b>Recuperación</b>
0	581	1,65	1857,3	0,00%
72	501	1,59	1962,1	4,79%
120	493	1,59	1950,0	4,24%
168	485	1,58	2030,4	7,91%
240	478	1,61	2051,0	8,85%
288	478	1,66	1951,4	4,30%
336	475	1,55	1946,2	4,06%
<b>Sin Adherencia</b>				
<b>Tiempo horas</b>	<b>Eh mV</b>	<b>pH</b>	<b>Fe<sup>tot</sup> ppm</b>	<b>Recuperación</b>
0	560	1,65	1835,8	0,00%
72	541,5	1,6	1972,2	6,23%
120	541,5	1,64	1930,2	4,32%
168	568,5	1,64	1998,1	7,42%
240	722	1,66	2163,6	14,98%
288	723	1,71	2194,2	16,38%
336	732,5	1,61	2268,0	19,75%
<b>Biolix</b>				
<b>Tiempo horas</b>	<b>Eh mV</b>	<b>pH</b>	<b>Fe<sup>tot</sup> ppm</b>	<b>Recuperación</b>
0	563	1,66	1731,9	0,00%
72	690	1,74	1771,3	1,80%
120	701	1,67	1853,2	5,55%
240	707	1,63	2312,0	26,51%
336	719	1,60	2338,9	27,73%