



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICA Y MATEMÁTICAS.
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE POBLACIONES BACTERIANAS EN PROCESOS DE
BIOLIXIVIACIÓN MEDIANTE CARD-FISH

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

ALEJANDRA FRANCISCA MORA MATUS

PROFESOR GUÍA:

BLANCA ESCOBAR MIGUEL

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

TOMÁS VARGAS VALERO

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

Santiago de Chile

Abril, 2010

RESUMEN DE LA MEMORIA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: ALEJANDRA MORA MATUS
FECHA: 21/04/2010
PROF. GUÍA: SRA. BLANCA ESCOBAR

“ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE POBLACIONES BACTERIANAS EN PROCESOS DE
BIOLIXIVIACIÓN MEDIANTE CARD-FISH”

El objetivo principal del estudio fue estudiar la dinámica de las distintas poblaciones bacterianas presentes en el cultivo utilizado a lo largo de la biolixiviación de la pirita. Con este fin se decidió implementar la técnica de identificación molecular CARD-FISH, para evaluar tanto la población en la solución de biolixiviación como la adherida al mineral. En particular, se estudiaron las siguientes cepas bacterianas: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.

El trabajo aquí presentado consistió en analizar la biolixiviación de una muestra de pirita pura, durante 600 hrs a 30°C, utilizando un cultivo de microorganismos mixto proveniente de un proceso de biolixiviación de Minera Escondida. Para esto, se monitorearon distintos parámetros de la biolixiviación, como el pH, Eh, Fe(II) en solución, hierro total, sulfato en solución y recuento directo de bacterias en solución.

Los principales resultados obtenidos en este estudio son la determinación de la alta capacidad de adherencia de cultivo (90% de adherencia) y la alta eficiencia extractiva del cultivo utilizado medida como el hierro y azufre recuperado. Además, por medio de CARD-FISH fue posible conocer la abundancia relativa de cada cepa, y así establecer que el microorganismo con mayor capacidad de adherencia, con mayor crecimiento en solución y más abundante hacia al final de la experiencia fue *Af. ferrooxidans*, siendo por estos motivos catalogada como la cepa más eficiente en el proceso de biolixiviación de pirita a 30°C. Del mismo modo se determinó que la bacteria menos eficiente en este experimento fue *S. thermosulfidooxidans*.

Basándose en los resultados obtenidos y en las discusiones propuestas se concluye que la técnica de CARD-FISH fue posible comprender la dinámica de las poblaciones presentes en el proceso de biolixiviación de la pirita, por lo que se recomienda la utilización de esta técnica para el monitoreo de este tipo de operaciones.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a los integrantes de mi familia, por ser un apoyo increíble y maravilloso durante toda mi vida, y en particular a lo largo de estos 6 años de carrera. A mi papá, Juan, por tener siempre una palabra de aliento en los momentos de desesperación, por confiar en mí incondicionalmente y por ser tan buen papá. A mi mamá, Alejandra, que vive en lo más profundo de mi corazón, cuyos valores y recuerdos me han acompañado siempre y a quien espero estar haciendo muy orgullosa con este trabajo de título. A Itxiar, quien con su cariño y paciencia ha venido a llenar los espacios vacíos de nuestra casa, y que siempre me ha traído cafecito en las noches de traspasar por la U. A mis hermanos, Daniel y Carolina, los que han sido una fuente constante de inspiración para mí por su fuerza, constancia e integridad. A todos los Mora, porque se han preocupado por nosotros siempre, nos han venido a acompañar a Santiago cada vez que lo hemos necesitado y porque son, sin duda, la mejor familia del mundo.

También quiero agradecer a mis amigas de toda la vida, en particular a Marisol y a Eileen, porque han estado a mi lado por más de 18 años, me acompañaron en los momentos más difíciles y tristes de mi vida, me hacen reír sin parar y me han aguantado estos 6 años desaparecida de los cumpleaños y eventos sociales. Las quiero con todo mi corazón y sé que no existe en el mundo un par de amigas mejor que ustedes.

Agradezco también a Andrés, quien ha sido mi compañero y Pololo incondicional durante los últimos 4 años de esta hermosa carrera. Tu compañía, amor y paciencia me han ayudado de una manera inconmensurable a ser una mejor estudiante, una mejor Ingeniera, pero por sobre todo a ser una mejor persona. Te amo

Le doy las gracias a mi amiga y compañera de laboratorio Arely, con quien compartí intensamente el 12º semestre. Gracias por esas discusiones eternas tratando de entender lo inexplicable, tanto esfuerzo ha rendido sus frutos en este trabajo. Y gracias por las invitaciones a almorzar a tu casa, o habría terminado por morir de hambre =).

No puedo dejar fuera de estos agradecimientos a Raúl y Poldie, los que estaban en el lab cada vez que necesitaba ayuda de manera desesperada, dispuestos a hacer todo lo necesario para asistirme y siempre, siempre con una sonrisa y una palabra agradable. En último lugar, pero no por eso menos importante, le agradezco a mi profesora guía Blanca Escobar, quien resultó ser una persona muchísimo más maravillosa de lo que yo me podría haber imaginado. Profe, sin usted, jamás lo habría logrado. También agradezco al profesor Tomás Vargas, por estar siempre disponible a ayudarme con el avance de este trabajo.

A todos aquellos que quedaron en el tintero no se ofendan, los quiero mucho igual!

Índice de contenido

Capítulo 1 Introducción.....	1
1.1 Antecedentes Generales.....	1
1.1.1 Biolixiviación de Minerales Sulfurados.....	1
1.2 Antecedentes Bibliográficos.....	3
1.2.1 Biolixiviación de Minerales Sulfurados.....	3
1.2.2 Mecanismos de la Biolixiviación.....	4
1.2.3 Bacterias más frecuentes en los procesos de biolixiviación.....	6
1.2.4 Identificación de Microorganismos mediante CARD-FISH.....	10
1.3 Descripción del Proyecto y Justificación.....	12
1.4 Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivos Específicos.....	13
1.5 Limitaciones y Alcances.....	13
Capítulo 2 Metodología.....	14
2.1 Determinación de la Capacidad de Biolixiviación de Pirita de un cultivo.....	14
2.2 Análisis Químicos realizados a las muestras de biolixiviación.....	15
2.2.1 Determinación del Hierro en solución.....	15
2.2.2 Determinación del Fe(III) precipitado.....	15
2.2.3 Determinación del Sulfato en solución por Turbidimetría.....	16
2.3 Análisis biológicos realizados a las muestras de biolixiviación.....	17
2.3.1 Determinación de la capacidad de Adherencia de un cultivo.....	17
2.3.2 Identificación de las Bacterias por CARD-FISH.....	18
2.4 Ajustes matemáticos de los datos experimentales.....	23
2.4.1 Estudio de capacidad de adherencia a la pirita del cultivo de bacterias nativas.....	23
2.4.2 Determinación de la abundancia relativa de distintas cepas bacterianas presentes en una muestra mediante CARD-FISH.....	23
2.4.3 Estudio sobre la capacidad de adherencia al mineral de distintas cepas bacterianas.....	24
2.4.4 Experimento de Biolixiviación	24
2.4.5 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH.....	26

Capítulo 3 Resultados	28
3.1 Estudio de capacidad de adherencia a la pirita del cultivo de bacterias nativas.	28
3.2 Estudio sobre la capacidad de adherencia al mineral de distintas cepas bacterianas.....	29
3.3 Experimento de Biolixiviación.....	32
3.3.1 Comportamiento del pH y el Eh de la solución.....	32
3.3.2 Comportamiento de los iones Fe(II) y Fe(III), oxidación del Fe(II) por la actividad bacteriana y lixiviación de la pirita medida en el aumento del hierro total.	34
3.3.3 Lixiviación de la pirita medida como la extracción de azufre.....	37
3.4 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH.....	38
3.4.1 Crecimiento Celular en solución.....	38
3.4.2 Análisis de la población bacteriana en solución mediante CARD-FISH.....	41
3.4.3 Crecimiento Celular en el mineral.....	48
Capítulo 4 Discusión.....	51
4.1 Discusiones Parciales.....	51
4.1.1 Estudio de capacidad de adherencia a la pirita del cultivo de bacterias nativas.....	51
4.1.2 Estudio sobre la capacidad de adherencia al mineral de distintas cepas bacterianas.....	51
4.1.3 Experimento de Biolixiviación, Comportamiento del pH y el Eh de la solución	52
4.1.4 Experimento de Biolixiviación, Comportamiento de los iones Fe(II) y Fe(III), oxidación del Fe(II) por la actividad bacteriana y lixiviación de la pirita medida en el aumento del hierro total.....	53
4.1.5 Experimento de Biolixiviación, Lixiviación de la pirita medida como la extracción de azufre.....	54
4.1.6 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH, Crecimiento Celular en solución.....	55
4.1.7 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH, Análisis de la población bacteriana en solución mediante CARD-FISH.....	56
4.1.8 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH, Crecimiento Celular en el mineral.....	58
4.1.9 Sobre la utilización de la técnica de CARD-FISH.....	58
4.2 Discusiones Generales.....	60
Capítulo 5 Conclusiones.....	63

Capítulo 6 Recomendaciones.....	64
Capítulo 7 Bibliografía.....	65
Capítulo 8 Anexos.....	68
8.1 Datos Experimento de Adherencia.....	68
8.2 Datos CARD-FISH de Experimento de Adherencia.....	68
8.3 Datos Experimento de Biolixiviación.....	70
8.4 Datos del análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH.....	73

Índice de tablas

Tabla 1: Área, radio y volumen de la partícula promedio de pirita.....	48
Tabla 2: Propiedades físicas de la pirita y área total disponible para el crecimiento celular.....	48
Tabla 3: Datos de Experimentos de Adherencia. Valores de células en solución para los distintos tiempos estudiados.....	68
Tabla 4: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para At. Ferrooxidans.....	68
Tabla 5: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para At. Thiooxidans.....	69
Tabla 6: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para S.thermosulfidooxidans.....	69
Tabla 7: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para L. ferrooxidans.....	69
Tabla 8: Datos pH del experimento de biolixiviación.....	70
Tabla 9: Datos del Eh en mV del experimento de biolixiviación.....	70
Tabla 10: Monitoreo del Fe(II) durante la biolixiviación de pirita.....	71
Tabla 11: Monitoreo del Hierro total (mg/l) medido con o-fenantrolina durante el experimento.....	71
Tabla 12: Valores del Hierro total (en mg/l) por HCl en experimento de biolixiviación de pirita.....	72
Tabla 13: Monitoreo del sulfato en solución (mg/l) durante el experimento de biolixiviación.....	72
Tabla 14: Datos del crecimiento celular en la solución de biolixiviación y primera corrección propuesta de los datos.....	73
Tabla 15: Datos de crecimiento celular en solución y segunda corrección propuesta para el crecimiento celular.....	73
Tabla 16: Datos CARD-FISH solución de biolixiviación.....	74
Tabla 17: Datos de CARD-FISH del mineral.....	75

Índice de ilustraciones

Figura 1: Mecanismo de biolixiviación del tiosulfato (Sand, W. (2003)). (Af=Acidithiobacillus ferrooxidans, At=Acidithiobacillus thiooxidans, Lf=Leptospirillum ferrooxidans).....	4
Figura 2: Mecanismos de biolixiviación indirecto, por contacto y cooperativo (Tributsch, H. (2001)).....	6
Figura 3: Velocidad de producción de Fe(II) por lixiviación férrica de +53–75 μm de pirita a 10 gr/l junto con la velocidad de oxidación de Fe(II) por At. ferrooxidans y L. ferrooxidans a 150 mg C/l y concentración de hierro total de 12 g/l en función del potencial redox (Vargas and Hansford (2001)).....	9
Figura 4: Esquema del método de identificación CARD-FISH.....	11
Figura 5: Esquema de la diferencia de la tinción de una muestra con DAPI y con tiramida posterior a la hibridación con sondas de DNA marcadas con HRP (CARD-FISH)	11
Figura 6: Recuento de células en solución durante 120 min, y el porcentaje de células adheridas calculado como la diferencia entre las células iniciales y las presentes al momento del conteo	28
Figura 7: Composición del inóculo del cultivo nativo de la Mina Escondida.....	29
Figura 8: Composición de la solución después de 120 min de contacto con pirita	30
Figura 9: Porcentaje de células adheridas después de 120 min de contacto con el mineral, para cada una de las cepas estudiadas.....	30
Figura 10: Comportamiento del pH durante el experimento de biolixiviación de pirita utilizando un cultivo mixto de microorganismos nativos.....	32
Figura 11: Comportamiento del Eh durante el experimento de biolixiviación de pirita utilizando un cultivo mixto de microorganismos nativos	33
Figura 12: Concentración de los iones Fe(II) y Fe(III) y Fe total en solución durante el experimento de biolixiviación de pirita.....	34
Figura 13: Cinética de oxidación del hierro presente en la solución separado en 2 etapas: entre las 0 y las 168 hrs de experimentación y entre las 168 y las 576 hrs de experimentación.....	35
Figura 14: Biolixiviación del Hierro proveniente del mineral de pirita y generación de precipitados de Hierro. El error en el medición del hierro lixiviado corresponde a la desviación estándar de los valores medidos experimentalmente.....	36

Figura 15: Biolixiviación de Azufre desde el mineral de pirita y Azufre Teórico esperado, calculado utilizando el valor del hierro lixiviado durante el experimento.....	37
Figura 16: Crecimiento celular determinado por recuento directo (RD) utilizando un microscopio de contraste de fase y las dos correcciones propuestas.....	38
Figura 17: Recuento de células totales presentes en la solución de biolixiviación, regresión exponencial para las 600 hrs de experimentación y para las primeras 300 hrs	39
Figura 18: Regresión lineal del logaritmo natural del total de células en el tiempo sobre el total de células iniciales para las primeras 300 hrs de experiencia.....	40
Figura 19: Composición de la población bacteriana durante el experimento de biolixiviación de pirita utilizando un consorcio nativo. Las barras de error graficadas corresponden a la desviación estándar de los valores medidos empíricamente.....	41
Figura 20: Composición de la población bacteriana presente en la solución de biolixiviación de pirita a lo largo del experimento, medida como en bacterias totales... ..	42
Figura 21: Crecimiento de <i>At. ferrooxidans</i> , regresión exponencial para las primeras 240 hrs de experiencia. El error corresponde a la desviación estándar de los valores empíricos.....	43
Figura 22: Regresión lineal para la linealización de las 240 hrs iniciales de crecimiento <i>At. ferrooxidans</i>	44
Figura 23: Crecimiento de <i>At. thiooxidans</i> , regresión exponencial a partir de las 72 hrs. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.....	45
Figura 24: Linealización del crecimiento <i>At. thiooxidans</i> a partir de las 72 hrs	45
Figura 25: Crecimiento de <i>S. thermosulfidooxidans</i> , regresión exponencial en el periodo entre las 72 y las 504 hrs del experimento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.....	46
Figura 26: Linealización del crecimiento de <i>S. thermosulfidooxidans</i>	46
Figura 27: Crecimiento de <i>L. ferrooxidans</i> , regresión exponencial para el crecimiento hasta las 504 hrs del experimento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.....	47
Figura 28: Linealización del crecimiento de <i>L. ferrooxidans</i> para las primeras 504 hrs..	47
Figura 29: Partícula de mineral de pirita teñida con DAPI, colonizada con bacterias después de 240 hrs de experimentación.	49
Figura 30: Porcentaje de abundancia en el mineral de las distintas cepas a las 72 hrs y a las 576 hrs de experimentación. Las barras de error corresponden a la desviación	

estándar.....50

Figura 31: Análisis de la población bacteriana adherida al mineral a las 72 horas del experimento. A la izquierda se muestra la tinción con DAPI, y a la derecha la tinción con CARD-FISH para *At. ferrooxidans*.....50

Capítulo 1 Introducción

En Chile una de las principales actividades productivas es la extracción de distintos minerales, en particular el cobre. Durante los últimos 30 años se ha estudiado en el mundo la extracción de cobre y otros minerales mediada por microorganismos, la cual ha sido llamada biolixiviación y ha sido utilizada principalmente para el tratamiento de minerales de baja ley en botaderos y de sulfuros secundarios en pilas. Actualmente en Chile distintas empresas mineras utilizan biolixiviación, pudiendo citarse como los principales ejemplos la Compañía Minera Quebrada Blanca, Cerro Colorado, La Escondida, entre otros, los cuales incluyen bacterias en su proceso de lixiviación del mineral (Brierley y Brierley (2001)).

Este trabajo de título se enfocó en el estudio de la dinámica del crecimiento de las poblaciones bacterianas presentes en la biolixiviación de un mineral sulfurado (Pirita, FeS_2), principalmente en las siguientes especies bacterianas: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, por tratarse de las especies que se encuentran con mayor frecuencia en el cultivo mixto utilizado. Se utilizará la técnica de identificación molecular CARD-FISH para determinar la capacidad de adherencia de estas cepas al mineral y la eficiencia en la biolixiviación de la pirita. Para el estudio del avance de la biolixiviación se monitoreará el pH, Eh, Fe(II), hierro total y sulfato de las soluciones.

1.1 Antecedentes Generales

1.1.1 Biolixiviación de Minerales Sulfurados

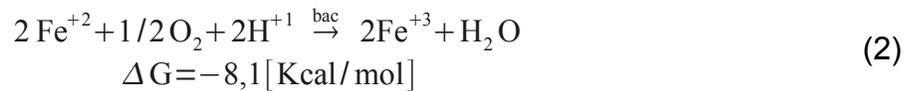
Se entiende por biolixiviación al proceso mediante el cual distintos microorganismos son capaces de catalizar la disolución de un determinado mineral. Hasta el momento se ha demostrado que bacterias de los géneros *Acidithiobacillus*, entre otros, son capaces de biolixiviar distintos minerales sulfurados, entre los que se encuentran FeS_2 , CuFeS_2 , ZnS , PbS (Ehrlich H. (2001)).

En Chile y en el mundo uno de los minerales de cobre más abundantes es la calcopirita (CuFeS_2), cuya ley es más baja que los sulfuros secundarios calcosina (Cu_2S) y covelina (CuS), al tener un menor contenido de cobre. Por otro lado, la calcopirita tradicionalmente se encuentra asociada en los yacimientos a otro mineral sulfurado, la pirita (FeS_2).

Uno de los mecanismos por medio del cual los minerales sulfurados como la pirita son lixiviados se muestra en la ecuación 1. En este caso, el ion férrico (Fe^{+3}) ataca al mineral sulfurado MS, oxidando el compuesto de azufre a azufre elemental y reduciéndose a ion ferroso (Fe^{+2}).



Uno de los principales aportes de las bacterias en el proceso de lixiviación de los minerales es que son capaces de acelerar este proceso por medio de la regeneración del ion férrico a partir del ion Fe(II), obteniendo desde esta reacción, mostrada en la ecuación 2, la energía que necesitan para desarrollarse y fijar CO_2 . Algunas de las cepas bacterianas hierrooxidantes más comunes son *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*.



Además de acelerar la transformación del ferroso a férrico, existen bacterias que poseen el sistema enzimático necesario para catalizar la oxidación de compuestos reducidos de azufre (Ecuación 3) como fuente de energía. La importancia de esta reacción es que es una fuente de protones, los cuales son necesarios para la oxidación del Fe(II), y además evitan la acumulación de azufre elemental en la superficie del mineral, lo cual dificulta la lixiviación del mismo. Entre los microorganismos capaces de acelerar esta reacción se encuentran *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* y *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.



Los microorganismos presentes en la biolixiviación de los minerales no solo se clasifican en hierrooxidantes y azufreoxidantes según la reacción que pueden catalizar. También son clasificadas según el rango de temperatura en el cual son encontradas con mayor frecuencia, y en la que se desarrollan con mayor eficiencia. De este modo se tienen bacterias mesófilas (20-40°C), termófilas moderadas (40-55°C) y termófilas extremas (sobre los 65°C). Por último, los microorganismos que participan en la lixiviación de los minerales pueden ser autótrofos o heterótrofos, según si obtienen su energía a partir de las reacciones de oxidación del mineral o desde los compuestos orgánicos presentes en la solución de biolixiviación.

1.2 Antecedentes Bibliográficos

1.2.1 Biolixiviación de Minerales Sulfurados

1.2.1.1 **Biolixiviación de la Calcopirita**

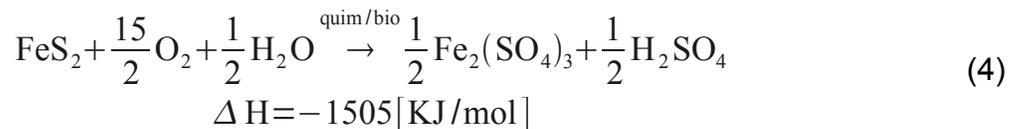
La calcopirita es el mineral de cobre más importante en Chile y el mundo (Pradhan, N. (2008)). Su biolixiviación, al igual que la de otros minerales sulfurados, es llevada a cabo tanto por microorganismos fierrooxidantes como azufreoxidantes. Algunos de los factores que influyen en su biolixiviación son la temperatura, pH, potencial redox y concentración de Fe(III), entre otros. En este contexto, se sabe que la calcopirita no es biolixiviada de manera eficiente por bacterias y arqueas mesófilas (Pradhan, N. (2008)), sin embargo, se ha encontrado que el uso de microorganismos termófilos mejora el proceso en dos aspectos: primero un aumento en la velocidad de reacción debido al incremento de la temperatura, y segundo un incremento en la cantidad de mineral extraído (Brierley y Brierley (1986)), (Pradhan, N. (2008)).

De este modo, con el objeto de aumentar la eficiencia en la biolixiviación de la calcopirita, es necesario encontrar una buena fuente de energía, que permita elevar la temperatura de la pila, facilitando el desarrollo de microorganismos termófilos. Un posible candidato para ésto es el mineral pirita, ya que como se verá a continuación, su lixiviación es una reacción generadora de calor.

1.2.1.2 **Biolixiviación de la Pirita**

La pirita (FeS_2) es un mineral sulfurado de hierro, el cual se encuentra asociado a la calcopirita en las profundidades de los yacimientos de cobre. Al igual que la calcopirita, su lixiviación puede ser acelerada por la acción de microorganismos fierro y azufreoxidantes, los cuales se encuentran de manera natural en el mineral.

La biolixiviación de la pirita genera ácido y calor, como es posible ver en la Ecuación 4, y para que se lleve a cabo es necesaria la presencia del oxígeno, el cual participa en la oxidación del sulfuro.



Entender de manera profunda tanto la lixiviación de la calcopirita como la de la pirita es de vital importancia para poder optimizar estos procesos, y sacar de ellos el máximo provecho económico posible. Para ésto es indispensable investigar tanto a los microorganismos que participan en la catálisis de estas reacciones como las interacciones que existen entre las mismas bacterias. El estudio de la biolixiviación de

la pirita que se realizará en este trabajo es importante ya que este mineral se encuentra comúnmente asociado a la calcopirita en los yacimientos naturales, y su biolixiviación sin duda afecta el rendimiento de la disolución del mineral de cobre, pudiendo favorecerle como una fuente de calor (Pradhan, N. (2008)) o entorpecerla al generar un exceso de ácido y Fe(III) (Xingyu L. et al. (2009)).

1.2.2 Mecanismos de la Biolixiviación

Distintos mecanismos han sido propuestos para explicar la lixiviación bacteriana de los minerales. Entre ellos se encuentran el mecanismo del tiosulfato y el polisulfuro ,propuestos por Sand, los cuales explican el proceso químico mediante el cual los minerales son lixiviados. Además están los mecanismos de biolixiviación por contacto, indirecto y cooperativo, propuestos por Tributsch, los cuales consideran la capacidad de adherencia al mineral que poseen las bacterias. Estas teorías se presentan a continuación.

1.2.2.1 Mecanismo Tiosulfato

Los minerales sulfurados que no son solubles en ácido, como la pirita entre otros, son oxidados por medio de este mecanismo (Schippers et al. (1996)), (Sand, W. (2003)), en el cual el enlace entre el sulfuro y el metal se rompe, generando el ion metálico (Fe(II) en el caso de la pirita) y tiosulfato. Posteriormente, el tiosulfato es oxidado hasta sulfato (Figura 1), sin embargo, en ausencia de bacterias azufreoxidantes se pueden generar cantidades significativas de azufre elemental (Schippers et al. (1999)), (Sand, W. (2003)).

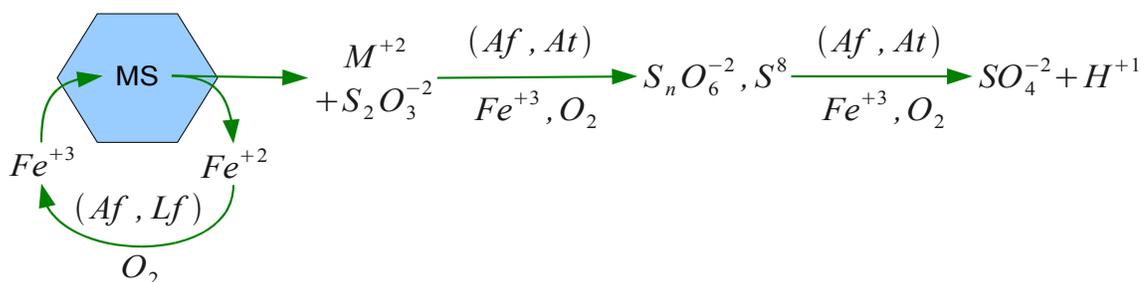


Figura 1: Mecanismo de biolixiviación del tiosulfato (Sand, W. (2003)).
 (Af=Acidithiobacillus ferrooxidans, At=Acidithiobacillus thiooxidans, Lf=Leptospirillum ferrooxidans)

1.2.2.2 Mecanismo del Polisulfuro

Aquellos minerales que que solubles en ácido, como la calcopirita, son lixiviados mediante el método del polisulfuro, en el cual el mineral el disuelto por la acción combinada del ión Fe(III) y de protones, liberándose inicialmente H_2S^+ , el cual luego se oxida a polisulfato (Sand, W. (2003)).

Con respecto a la estrategia que utilizan las bacterias para biolixiviar el mineral, ya sea adhiriéndose a éste, o manteniéndose en solución, existen los siguiente mecanismos propuestos por Tributsch.

1.2.2.3 Mecanismo por Contacto

El mecanismo de contacto considera que muchas células bacterianas se adhieren a la superficie de los minerales sulfurados, lo cual implica que los procesos electroquímicos que disuelven la estructura cristalina de los minerales suceden en la interfase entre la pared celular y la superficie del mineral. Estos procesos electroquímicos son la generación del agente oxidante del mineral, Fe(III), y la oxidación de los compuestos sulfurados a sulfato (Tributsch, H. (2001)).

1.2.2.4 Mecanismo Indirecto

En este caso, la oxidación del Fe(III) es catalizada por bacterias planctónicas, es decir que se encuentran en solución. Posteriormente el ion férrico entra en contacto con el mineral, lixiviándolo. Este mecanismo también es conocido como mecanismo de biolixiviación sin contacto (Tributsch, H. (2001)).

1.2.2.5 Mecanismo Cooperativo

Este mecanismo es simplemente la unión del mecanismo de contacto y el mecanismo indirecto, durante el cual las bacterias adheridas a la superficie del mineral liberan las especies que contienen energía química a la solución de biolixiviación, permitiendo que las bacterias planctónicas se desarrollen (Tributsch, H. (2001)).

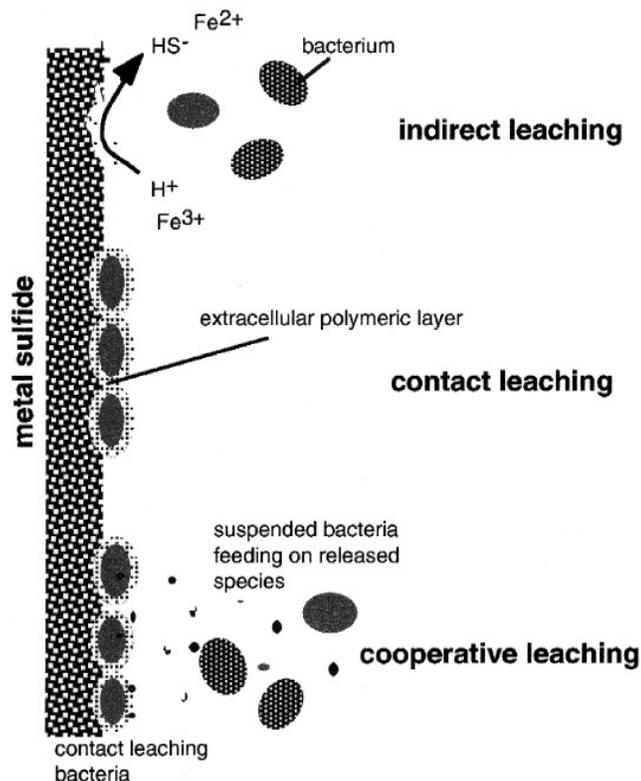


Figura 2: Mecanismos de biolixiviación indirecto, por contacto y cooperativo (Tributsch, H. (2001))

Tanto las bacterias adheridas a la superficie del mineral como aquellas que se encuentran en la solución de biolixiviación son capaces de catalizar las reacciones necesarias para lixiviar la pirita (la oxidación del Fe(II)), sin embargo la presencia de microorganismos adheridos a la superficie permite una oxidación eficiente del sulfuro, evitando así la pasivación del mineral por la acumulación de azufre elemental.

1.2.3 Bacterias más frecuentes en los procesos de biolixiviación

Las bacterias presentes en los procesos naturales de biolixiviación son microorganismos extremófilos acidófilos, ya que son capaces de vivir en condiciones extremas de pH, normalmente bajo pH 3. Además, estas bacterias son capaces de oxidar Fe(II) y/o compuestos de azufre reducidos (Sand, W. (2003)). En particular, en este trabajo se estudió la capacidad de biolixiviación y adherencia a la pirita de un cultivo nativo proveniente de un proceso de biolixiviación de una empresa minera en el cual se encuentran, entre otras, las siguientes especies bacterianas: *At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*.

1.2.3.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Esta es una bacteria Gram-negativa, perteneciente a la familia de las γ -proteobacterias. Es un microorganismo mesófilo, cuya temperatura ideal de desarrollo está entre los 30 y 40°C. Además es un quimiolitótrofo acidófilo, capaz de oxidar tanto Fe(II) (Ecuación 2) como compuestos de azufre reducido (Ecuación 3) en condiciones aeróbicas (Rawlings, D., (1997)). Es también capaz de crecer en condiciones anóxicas oxidando sulfuros o hidrógeno de manera acoplada con la reducción de Fe(III) (Pronk et al. (1992)), (Ohmura et al. (2002)). Además, estudios recientes indican que esta bacteria reduce azufre elemental en el curso de la oxidación anaeróbica del hidrógeno (Ohmura et al. (2002)).

Para modelar la cinética del crecimiento de esta bacteria y la oxidación del ion ferroso, se han propuesto distintas ecuaciones, por ejemplo utilizando crecimiento del tipo Monod, según lo mostrado en la Ecuación 5, mostrada a continuación (Lacey y Lawson (1970)).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [\text{Fe}^{2+}]}{Y_{\text{SX}} K_m + [\text{Fe}^{2+}]} \quad (5)$$

Donde μ representa la velocidad de crecimiento, μ_{\max} el máximo crecimiento posible en las condiciones de cultivo, Y_{SX} es el yield, o la capacidad de generar biomasa a partir del sustrato, K_m la constante de afinidad al sustrato, mientras que $[\text{Fe}^{2+}]$ es la concentración del ion ferroso en solución.

Trabajos posteriores consideran que el crecimiento de *At. ferrooxidans* se ve inhibido por la presencia del ión férrico en solución, lo cual está expresado en la Ecuación 6 (Jones y Kelly (1983)). Además, se ha incluido en nuevas expresiones (Ecuación 7) el hecho que a bajas concentraciones de Fe(II) no habrá crecimiento (Braddock et al. (1984)).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [\text{Fe}^{2+}]}{[\text{Fe}^{2+}] + K_m \left(1 + \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{K_i} \right)} \quad (6)$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} ([\text{Fe}^{2+}] - [\text{Fe}^{2+}]_t)}{K_m + ([\text{Fe}^{2+}] - [\text{Fe}^{2+}]_t)} \quad (7)$$

Donde K_i es la constante de inhibición y $[\text{Fe}^{2+}]_t$ es la concentración umbral de Fe(II) necesaria para que se genere crecimiento celular.

1.2.3.2 *Acidithiobacillus thiooxidans*

Acidithiobacillus thiooxidans al igual que *At. ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa, perteneciente a la familia de las γ -proteobacterias, quimiolitótrofa y su rango de temperatura de crecimiento la clasifica como mesófila (Rawlings, D., (1997)). Además, debido al pH en que se desarrolla, es una bacteria acidófila. Sin embargo, a diferencia de *At. ferrooxidans*, este microorganismo solo es capaz de oxidar compuestos de azufre reducido a sulfato, lo cual corresponde a la reacción mostrada en Ecuación 3 (Rawlings, D., (1997)). Debido a esto, *At. thiooxidans* es incapaz de biolixiviar pirita por si mismo (Rawlings et al. (1999)).

1.2.3.3 *Leptospirillum ferrooxidans*

L. ferrooxidans es una bacteria quimiolitótrofa, mesófila, acidófila. Obtiene la energía necesaria para desarrollarse y fijar el CO₂ únicamente desde la oxidación aeróbica del ion ferroso, correspondiente a la Ecuación 2 (Rawlings, D., (1997)). Por ser un microorganismo fierrooxidante, es capaz de lixiviar la pirita en un cultivo puro (Rawlings et al. (1999)).

Estudios recientes sobre la composición de la comunidad bacteriana en operaciones industriales de biolixiviación que utilizan bajas concentraciones de Fe(II) disuelto presentan cantidades no detectables de *At. ferrooxidans*, mientras que *L. ferrooxidans* y *At. thiooxidans* eran las especies encontradas más importantes (Pizarro et al. (1996)). Esto se debería a que *L. ferrooxidans* tiene una mayor afinidad al ion Fe(II) que *At. ferrooxidans* y es menos inhibido por el ion Fe(III), lo que le permitiría crecer a mayores potenciales redox (Rawlings et al. (1999)).

Sulfobacillus thermosulfidooxidans

Sulfobacillus thermosulfidooxidans es una bacteria Gram-positiva quimiolitótrofa, capaz de oxidar Fe(II) y compuestos de azufre reducido (Ecuaciones 2 y 3), al igual que *At. ferrooxidans*. Es además una bacteria termófila moderada, a diferencia de las otras bacterias estudiadas, siendo su rango óptimo de crecimiento entre los 40 a 55°C (Rawlings, D., (1997)).

1.2.3.4 *Sobre la Dinámica de las Poblaciones bacterianas en procesos de biolixiviación*

Estudios anteriores han comprobado que la eficiencia de la biolixiviación de minerales sulfurados se incrementa considerablemente al utilizar cultivos en los que hay una mezcla de distintos microorganismos en lugar de una cepa pura (Bacelar-Nicolau, P., Johnson, B. (1999)). Además, utilizando técnicas como librería de clones de RNA ribosomal se encontraron cambios en población bacteriana relacionados con modificaciones en las condiciones de biolixiviación de la pirita, como por ejemplo un aumento de bacterias del género *Leptospirillum* al disminuir el pH desde 1,6 a 1,3 y desde 1,0 a 0,9, además de un incremento de *Sulfobacillus* cuando el pH decayó desde 1,3 a 1 (Xingyu L. et al. (2009)).

Durante muchos años se consideró a *At. ferrooxidans* como la bacteria más importante en los procesos de biolixiviación industriales, sin embargo, en investigaciones recientes utilizando técnicas moleculares de identificación se descubrió que en pilas de biolixiviación de cobre operando a bajas concentraciones de Fe(II) las bacterias más importantes eran *L. ferrooxidans* y *At. thiooxidans*, mientras que *At. ferrooxidans* era indetectable. Esta última bacteria solo fue detectada cuando la concentración de Fe(II) aumentó a 5 g/l (Pizarro et al. (1996)). Utilizando una técnica similar se determinó que en la biolixiviación de un mineral de cobre en condiciones de extrema acidez (pH 0,7) nuevamente las bacterias más importantes eran *L. ferrooxidans* y *At. thiooxidans*, mientras que *At. ferrooxidans* no se detectó (Vasquez y Espejo (1997)).

El fenómeno antes descrito se grafica en la Figura 3. Durante la biolixiviación de pirita, la extracción de Fe(II) solo ocurre a velocidades considerablemente altas cuando la proporción de Fe(III)/Fe(II) es alta (es decir a altos potenciales redox por sobre los 800 mV). En estas condiciones *L. ferrooxidans* aún está activo, pero *At. ferrooxidans* muestra una menor capacidad de crecimiento y de oxidar Fe(II) (Vargas and Hansford (2001)).

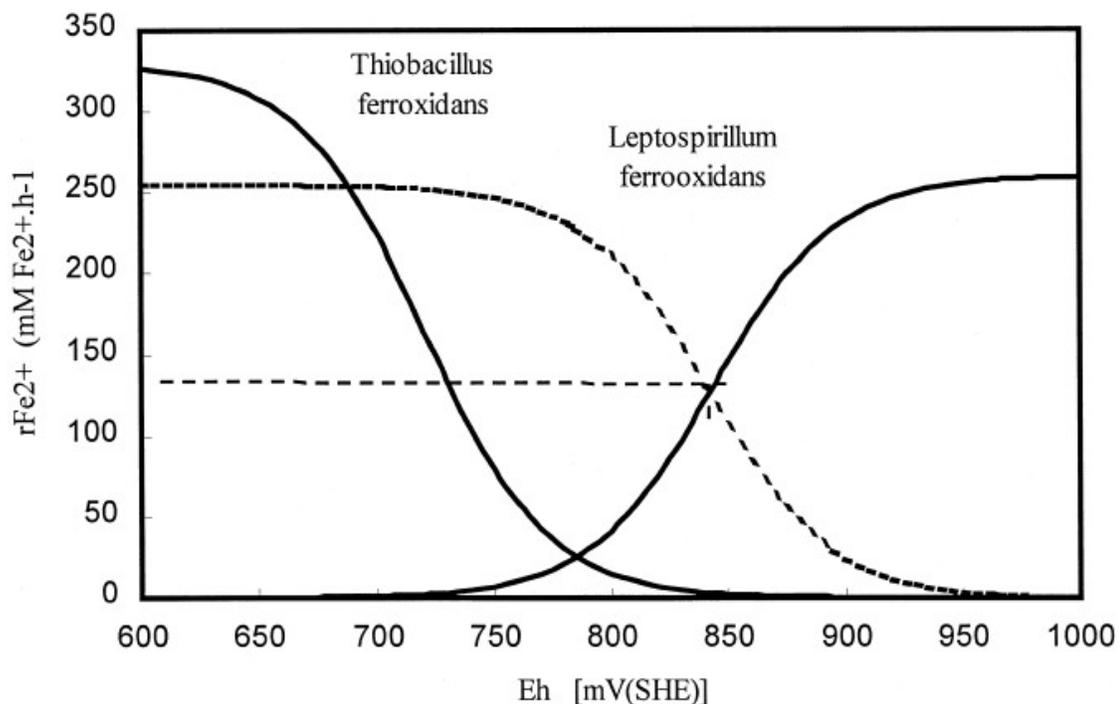


Figura 3: Velocidad de producción de Fe(II) por lixiviación férrica de +53–75 μm de pirita a 10 gr/l junto con la velocidad de oxidación de Fe(II) por *At. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* a 150 mg C/l y concentración de fierro total de 12 g/l en función del potencial redox (Vargas and Hansford (2001)).

El desarrollo y optimización de los procesos de biolixiviación requiere de un mejor entendimiento del mecanismo y cinética del ataque microbiano a los minerales sulfurados (Vargas and Hansford (2001)). Además, la comprensión de la dinámica de

las poblaciones microbianas presentes en los procesos de biolixiviación permitirá eventualmente favorecer el crecimiento de determinados consorcios de microorganismos que permitan tener procesos más eficientes.

Para esto es necesario primero hacer los estudios que permitan tener el conocimiento necesario y desarrollar técnicas de identificación eficientes, lo cual es el objetivo principal de este trabajo. En particular, se estudiarán los cambios de las poblaciones bacterianas a lo largo del proceso de biolixiviación de pirita.

1.2.4 Identificación de Microorganismos mediante CARD-FISH

Varios métodos han sido usados para estudiar la diversidad de los microorganismos presentes en la biolixiviación. Algunos de los métodos moleculares que se han utilizado para estudiar la diversidad de bacterias lixiviantes son hibridación DNA-DNA, secuenciamiento de 16S rRNA, PCR utilizando partidores derivados de la técnica anterior, (Pradhan, N. (2008)) e identificación por medio de T-RFLP (Morales, G. (2006)).

La técnica de CARD-FISH consiste en la unión de la técnica de CARD (Catalyzed Reporter Deposition) en donde la polimerización de una molécula de tiramida marcada con un fluoróforo es catalizada por la enzima HRP (horseradish peroxidase), con la técnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) en donde se identifican microorganismos por medio de una hibridación específica de una molécula de rRNA marcada con un fluoróforo (Pernthaler et al. (2002)).

De este modo, tal como se ve en la Figura 4, en la técnica CARD-FISH se utilizan sondas de rRNA específicas para un determinado microorganismo marcadas con la enzima HRP. Posteriormente se introduce a la célula moléculas de tiramida marcada con un fluoróforo, de modo tal que al ser polimerizadas por la enzima HRP, éstas emiten luz en una determinada frecuencia de onda. De este modo, se produce una amplificación de la señal, obteniéndose así una sensibilidad mucho mayor que la obtenida al utilizar solo FISH (Pernthaler et al. (2002)). Para poder determinar la abundancia relativa de una determinada cepa se realiza una tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), el cual es un fluoróforo que se une al DNA, permitiendo contar las bacterias totales de una muestra. Un esquema de la tinción con DAPI y con CARD-FISH se muestra en la Figura 5.

La utilización de la técnica de CARD-FISH es una de las principales innovaciones de este trabajo. Se espera que este método permita una mejor identificación de los microorganismos, tanto en solución como adheridos al mineral, y de ese modo, facilite la comprensión de la dinámica de las bacterias presentes en el proceso de biolixiviación, y permita relacionar la abundancia y capacidad de adherencia de las distintas cepas estudiadas con su capacidad de biolixiviar la pirita.

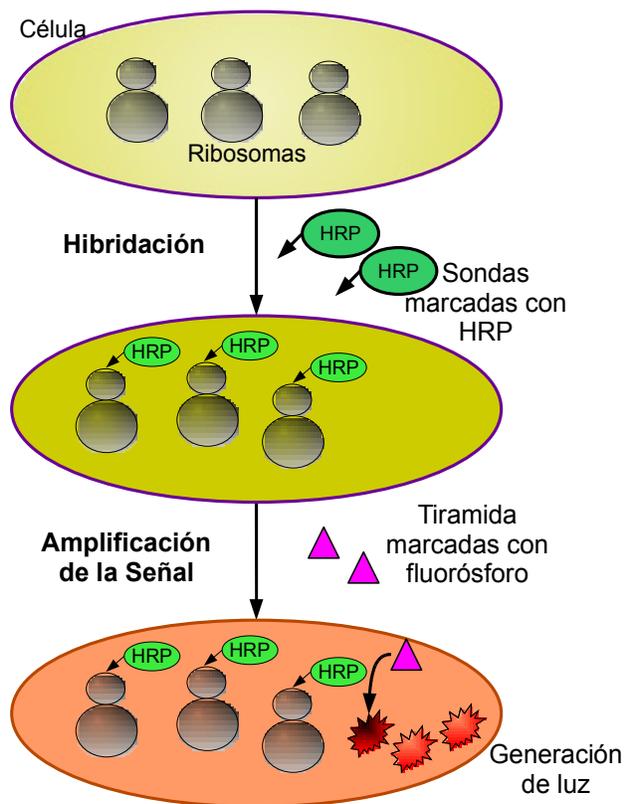


Figura 4: Esquema del método de identificación CARD-FISH

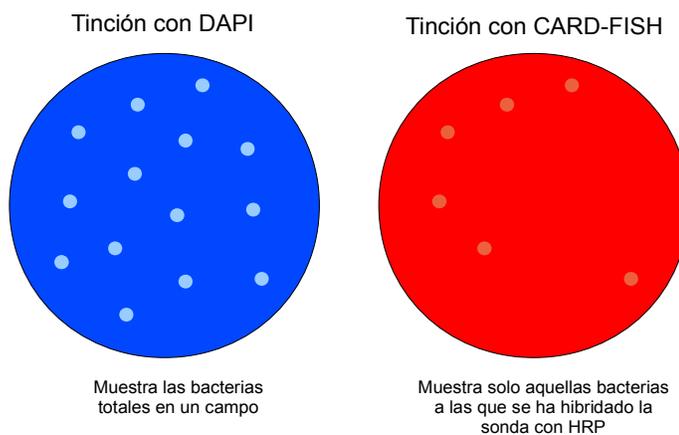


Figura 5: Esquema de la diferencia de la tinción de una muestra con DAPI y con tiramida posterior a la hibridación con sondas de DNA marcadas con HRP (CARD-FISH)

1.3 Descripción del Proyecto y Justificación

El proyecto de memoria para optar al título de Ingeniero Civil en Biotecnología consistió en el estudio de la dinámica bacteriana de microorganismos nativos en el proceso de biolixiviación de una muestra de pirita pura.

Distintos antecedentes bibliográficos señalan que por un lado la biolixiviación de pirita se ve favorecida cuando se utilizan cultivos mixtos de microorganismos en vez de cepas puras (Bacelar-Nicolau, P., Johnson, B. (1999)) y que la composición de las comunidades bacterianas presentes en estos procesos cambia al modificarse las condiciones de la biolixiviación (Xingyu L. et al. (2009)). Considerando que Chile es un país cuyos ingresos dependen fuertemente de la actividad cuprífera, todos los estudios relacionados con la materia son de gran importancia. La biolixiviación es una técnica que está siendo actualmente utilizada en algunos yacimientos mineros, sin embargo es necesario hacerla un proceso más eficiente.

Para el estudio de la dinámica de los microorganismos en la biolixiviación se realizarán experimentos de crecimiento de bacterias nativas de un mineral de pirita y se medirá la capacidad de adherencia y de biolixiviación del mineral. Para identificar a los distintos microorganismos se utilizará la técnica de CARD-FISH. En particular se estudiarán las siguientes cepas bacterianas: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, por ser los más importantes microorganismos presentes en el cultivo mixto utilizado.

El estudio de la dinámica de las poblaciones bacterianas que participan en los procesos de biolixiviación de pirita permitirá generar el conocimiento que eventualmente permita entregarle a estas bacterias las condiciones que necesitan para llevar a cabo la catálisis de la lixiviación del mineral, obteniendo de este modo mejores velocidades de reacción, mayor recuperación de los minerales y menores costos. Además, el estudio de la disolución de la pirita mediada por bacterias es importante ya que esta reacción puede ser una buena fuente de calor y de Fe(III) utilizable en el proceso de biolixiviación de la calcopirita.

1.4 Objetivos

El objetivo general del trabajo de título es obtener una mejor comprensión acerca de las dinámicas de las poblaciones bacterianas nativas en el proceso de biolixiviación de un mineral de pirita.

1.4.1 Objetivos Específicos

- Implementación de la técnica de identificación de microorganismos mediante CARD-FISH en el laboratorio
- Identificación de microorganismos nativos con mejor adherencia a la pirita por medio de CARD-FISH
- Identificación de los microorganismos nativos más eficientes en la biolixiviación de la pirita por medio de CARD-FISH
- Intentar obtener una relación entre la capacidad de adhesión a la pirita y la biolixiviación catalizada por los microorganismos nativos

1.5 Limitaciones y Alcances

Debido a la incapacidad de aislar desde la muestra a los distintos microorganismos nativos será necesario hacer una relación entre abundancia relativa de una determinada bacteria, con la eficiencia en la biolixiviación de la misma. Es decir, se asumirá que aquella bacteria que se presente en mayor concentración es más eficiente en la biolixiviación de la pirita.

La eficiencia del proceso de biolixiviación será medida como el aumento del Hierro total, del Fe(III) y del sulfato en solución, ya que estos son los productos del metabolismo de las bacterias presentes en estos procesos. Además se monitoreará periódicamente el pH y Eh de la solución de biolixiviación, cuyas variaciones también permiten explicar el comportamiento microbiano.

La capacidad de adherencia al mineral del cultivo a estudiar se medirá en función de las células que desaparecen de la solución en los primeros 120 min de contacto con el mineral. Finalmente es importante aclarar que este estudio se realizará a escala de laboratorio.

Capítulo 2 Metodología

2.1 Determinación de la Capacidad de Biolixiviación de Pirita de un cultivo

Materiales y Equipos

- Mineral de pirita purificada, entre -140/+450 mallas.
- Equipo de espectrofotometría UV, marca Agilen modelo 8453, el cual esta equipado con una lámpara de tungsteno. Utilizado para la medición de fierro y sulfato.
- Electrodo de pH, marca Corning modelo 340 con electrodo de Ag/AgCl
- Electrodo de pH, marca Hanna Instruments, modelo 211 con electrodo de Ag/AgCl, para la medición del Eh
- Shaker ambiental
- Materiales necesarios para recuento por CARD-FISH

Microorganismos

El inóculo de bacterias nativas utilizado proviene de una muestra de PLS de un procesos de biolixiviación de Minera Escondida. Este cultivo mixto ha sido mantenido durante 1 año en medio de cultivo con mineral de baja ley proveniente de la misma empresa minera, cuya composición contiene un 0,6% de Cu en forma de Calcosina (Cu_2S) en un 40%, Covelina (CuS) en un 10% y Calcopirita (CuFeS_2) que corresponde al 50% (Galleguillos, P. et al. (2008)).

Diseño del Experimento

El experimento de biolixiviación se realizó utilizando 14 matraces estériles de 200 ml, cada uno con 0,25 g de pirita, 50 ml medio MC previamente esterilizado (0,4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,056 g/L KH_2PO_4 , pH ajustado a 1,6 con H_2SO_4) y 2,5 g/L de Fe(II). Los frascos fueron inoculados con un cultivo enriquecido de bacterias nativas aisladas en el laboratorio, y se mantendrán en un shaker ambiental a 30°C con agitación de 100rpm. Los experimentos se realizaron en duplicado.

Los frascos fueron monitoreados dos veces por semana, durante 4 semanas, midiéndose el pH, Eh, Fe (II), Fe total y sulfato en solución, para lo cual se tomó una muestra de 4 ml, obteniéndose un total de 8 muestreos. Además, en cada medición se retiraba un matraz y su duplicado para cuantificar los precipitados de Fierro, recuento de bacterias totales y el análisis de la población bacteriana en solución y asociada al mineral por medio de la técnica de identificación CARD-FISH.

2.2 Análisis Químicos realizados a las muestras de biolixiviación

2.2.1 Determinación del Hierro en solución

Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro UV marca Agilen
- Fluoruro de Sodio
- Hidroxilamina
- o-fenantrolina

2.2.1.1 *Cuantificación del ión Fe(II) en solución*

- Tomar 0,1 ml de muestra diluída hasta una concentración de 100 ppm de Ferroso
- Agregar 0,4 ml de solución de Fenantrolina. Agitar
- Agregar 2 ml de agua destilada. Agitar
- Leer absorbancia a 510 nm

2.2.1.2 *Medición de Hierro Total*

- Tomar 0,1 ml de muestra diluída hasta una concentración de 100 ppm de Ferroso
- Agregar 0,1 ml de Hidroxilamina. Agitar.
- Agregar 0,4 ml de solución de Fenantrolina. Agitar
- Agregar 1,9 ml de agua destilada. Agitar
- Leer absorbancia a 510 nm

2.2.1.3 *Determinación de Fe(II) en soluciones con alto contenido de Fe(III)*

- Tomar 0,1 ml de muestra sin diluír
- Agregar 1 ml de solución de NaF 0,5M. Agitar.
- Agregar 0,4 ml de solución de Fenantrolina. Agitar
- Agregar 1 ml de agua destilada. Agitar
- Leer absorbancia a 510 nm

2.2.2 Determinación del Fe(III) precipitado

Materiales y Equipos

- Ácido clorhídrico (HCl) 5N
- Espectrofotómetro UV marca Agilen
- Fluoruro de Sodio
- Hidroxilamina
- o-fenantrolina

2.2.2.1 Tratamiento de la solución

- Tomar 2 ml de muestra
- Aforar a 20 ml con HCl 5N
- Incubar a 60°C por 30 min con agitación
- Medir el fierro según lo indicado en la sección 2.2.1.2

2.2.2.2 Tratamiento del mineral

- Filtrar todo el contenido del matraz
- Romper el papel filtro y lavarlo con 50 ml de HCl , con el fin de recuperar la pirita en un recipiente.
- Incubar a 60°C por 60 min con agitación
- Recuperar la solución filtrando
- Aforar a 100 ml con agua destilada
- Medir el fierro según lo indicado en la sección 2.2.1.2

2.2.3 Determinación del Sulfato en solución por Turbidimetría

Materiales y Equipos

- $BaCl_2 \cdot xH_2O$
- NaCl 240 g/L en solución de HCl al 0,3%
- Agua desionizada
- Espectrofotómetro UV marca Agilen
- Glicerina 1:1 filtrada

Método

Eliminación del Fe en solución:

- A 3 ml de la muestra agregar 800 μ l de KOH al 10%. Agitar y dejar reposar por 30 min
- Filtrar la muestra para eliminar el precipitado
- Lavar el filtro con agua desmineralizada hasta completar 20 ml
- Aforar a 25 ml con agua desmineralizada
- Ajustar el pH de la solución a 1,6 utilizando HCl

Medición del Sulfato:

- En un matraz aforado de 50 ml agregar 2 ml de muestra tratada anteriormente
- Agregar 5 ml de glicerina 1:1. Agitar
- Agregar 2,5 ml de NaCl 240 g/L . Agitar
- Aforar a 50 ml con agua des-ionizada. Agitar
- Agregar 0,15 g de $BaCl_2 \cdot xH_2O$. Agitar durante 1 min y dejar reposar por 1 min
- Leer absorbancia a 500nm

2.3 Análisis biológicos realizados a las muestras de biolixiviación

2.3.1 Determinación de la capacidad de Adherencia de un cultivo

Materiales y Equipos

- Pirita
- Inóculo de bacterias nativas
- Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,02mm de profundidad.
- Microscopio de contraste de fases, marca Nikon modelo Labophot.
- Materiales necesarios para la identificación por CARD-FISH

Método

Con el objeto de determinar la capacidad de adherirse a la pirita de las bacterias nativas a estudiar, se realizó un experimento utilizando un matraz de 50 ml, con un volumen de 25 ml de medio MC, 0.25 g de pirita y un inóculo de $2,8 \times 10^8$ bacterias nativas. Luego de contactar las bacterias con el mineral, el matraz es llevado a un agitador ambiental a 30°C, y se mantiene ahí hasta el final de la experiencia. Para determinar la capacidad de adherencia se realiza un conteo de las células en solución, extrayendo 8 µl de la solución, cargándolos en una cámara de conteo Petroff-Hausser y contando las células de la muestra en un microscopio de contraste de fases.

Los conteos se realizan en el momento inmediatamente posterior al contacto con el mineral, es decir en el tiempo cero, y cada 15 min hasta completar los 60 min, y luego cada 30 min hasta completar los 120 min de experiencia. El experimento se realiza en duplicado. Además se realizó un análisis de la población bacteriana inicial y final de la solución mediante CARD-FISH.

2.3.2 Identificación de las Bacterias por CARD-FISH

Materiales y Equipos

- Acromopeptidasa
- Agarosa
- Agua DD (destilada y desionizada)
- Citifluor
- DAPI
- Dextran sulfato
- DNA de esperma de salmón
- Etanol al 96%
- Filtro policarbonato, poro de 0,2 μm
- Formaldeído al 37%
- Formamida
- HCl
- Lisozima
- NaCl
- SDS
- Solución Denhardt
- Sondas de rRNA marcadas con HRP
- Tiramida Cy3
- Tris-HCl [pH 7,5]
- Triton X-100
- tRNA de *E. coli*
- VectaShield
- Estufa
- Horno de hibridación
- Microscopio de epifluorecencia, marca Zeiss, equipado con los filtros de 365nm y 546nm
- Cámara fotográfica Nikon, modelo coolpix 4500, 4 megapíxeles

2.3.2.1 Sondas Utilizadas

- F₂ ferro (*At. ferrooxidans*):
GGA CTT AAC CCA ACA TCT CA (Bustos P. K (2005))
- F₁ lepto (*L. ferrooxidans*):
GGG TGA GTA ATA CAT GGG TG (Bustos P. K (2005))
- F₁ thio (*At. thiooxidans*):
AAG AGG AGC CTA CGT CTG A (Holzer, K (2007))
- F₁ thermo (*S. thermosulfidooxidans*):
GTG CGT AAT ACA TGA TGC AAG TCG (Holzer, K (2007))

2.3.2.2 Protocolo para el tratamiento de las células planctónicas

Este protocolo corresponde al descrito por Pernthaler et al. (2002). Sin embargo, se realizaron algunas modificaciones al mismo, principalmente en cuanto a los volúmenes que se utilizaron.

Traspaso de células desde una suspensión a un soporte

Esta etapa del protocolo permite traspasar las células suspendidas en la solución a un soporte, que en este caso es un filtro de policarbonato.

1. Fijación celular de 5 ml de suspensión con al menos $8 \cdot 10^5$ cel/ml ($4 \cdot 10^6$ cel totales) con formahaldeído al 4% por 1 hora en hielo.
2. Filtrado en membrana de policarbonato.
3. Se sugiere evaluar un trozo de filtro con DAPI 1 μ g/ml para asegurarse de la presencia de las células en la concentración deseada (10^4 a 10^5).
4. Sumergir el filtro en agarosa al 0,2% a 37°C, por ambas caras. Dejar secar sobre un vidrio de reloj a 35°C durante 10 min. El baño del filtro en agarosa protege la integridad de las células a lo largo del proceso.
5. Deshidratar el filtro en etanol al 96%, por 1 minuto a temperatura ambiente.
6. Dejar secar al aire.

Permeabilización de células e inactivación de peroxidasas:

7. Incubar el filtro en una placa Petri pequeña con 1 ml de lizozima (10 mg/ml en 0,05M EDTA, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5), por 60 min a 37°C.
8. Lavar con agua DD, por 1 min.
9. Incubar el filtro en una placa Petri pequeña con 1 ml de acromopeptidasa por 30 min a 37°C (60 U/ml en 0,01 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 8).
10. Lavar con agua DD por 1 min.
11. Incubar el filtro en una placa Petri pequeña con 1 ml de HCl 0,01 M, por 10 min.
12. Lavar el filtro con agua DD, 2 veces, por 1 min.
13. Deshidratar el filtro en etanol al 96%, por 1 minuto a temperatura ambiente.
14. Dejar secar al aire.

Hibridación

15. Cortar los filtros en secciones de 5x5 mm aproximadamente.
16. Bloquear las secciones de filtro con Solución Denhart 5x por 15 min.
17. Depositar entre 2 a 4 secciones en un tubo Eppendorf de 0,2 ml.
18. Mezclar con 200 μ l de buffer de hibridación (0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7,5], 10% dextran sulfato p/v, 0,02% p/v SDS, 55%v/v formamida, Solución Denhardt 5x, 0,5mg/ ml de DNA de esperma de salmón, 0,5mg/ ml de tRNA de *E.coli*) y 1 μ l de sonda de DNA marcada con HRP (repetir este paso para cada sonda correspondiente a cada microorganismo que se desea identificar).
19. Incubar los filtros a 35°C por 2hr, en horno de hibridación.
20. Lavar filtros con agua DD a 37°C por 10 min.

Amplificación de la señal y Evaluación al microscopio

21. Remover el exceso del líquido con papel filtro.
22. Traspasar los filtros a placas petri.
23. Incubar filtros en 1 ml de PBS 1x con 0,05% de Triton X-100, por 15 min.
24. Incubar filtros en mix de sustrato de tiramida (1 parte de tiramida Cy3 en 10 partes de buffer de amplificación, solo lo necesario para cubrir la superficie brillante de la sección, aproximadamente 10 μ l por sección), por 10 min, en la oscuridad.
25. Incubar filtros en 10 ml de PBS 1x con 0,05% de Triton X-100, por 15 min en la oscuridad.
26. Lavar con agua DD, por 1 min.
27. Lavar con etanol al 96% por 1 min.
28. Secar al aire.
29. Teñir con DAPI 1 μ g/ml para evaluar al microscopio.
30. Colocar una sección del filtro sobre un portaobjeto.
31. Cubrir las secciones de filtro con Mountant (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes de 1x PBS con DAPI de concentración final 1 μ g/ml).
32. Colocar un cubreobjeto sobre el filtro, y agregar una gota de aceite de cedro.

Una vez que se tienen los trozos de filtro teñidos con las distintas sondas se procede a la evaluación del mismo, utilizando un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000x (objetivo 100x y ocular 10x). Para la identificación y determinación del porcentaje de las células totales que corresponde a cada cepa se realiza lo siguiente:

- Se realiza un recuento de las células totales presentes en una sección del filtro utilizado. Para esto se evalúa el filtro utilizando un filtro de luz UV con una longitud de onda 365nm, que permite ver las células que han sido teñidas con DAPI (fondo azul, las células se ven azul brillante).
- Para el recuento de células específicas la misma sección del filtro se evalúa utilizando un filtro de luz UV con una longitud de onda 546nm, por medio del cual se podrá determinar la cantidad de células que han sido teñidas con Cy3 (fondo rojo, las células se ven rojo brillante). En esta etapa es necesario fijarse que las células que se están contando estén también presentes al observar la sección con el filtro para DAPI.

2.3.2.3 Protocolo para el tratamiento de las células adheridas al mineral

Fijación de las células

Esta etapa del protocolo permite que las células adheridas al mineral se fijen al mismo.

1. Lavar el mineral 5 veces con medio de cultivo MC.
2. Incubar el mineral en 5 ml de PBS 1x con formahaldeído al 4% por 1 hora en hielo.
3. Separar una porción del mineral para realizar el conteo de células totales con DAPI.
4. Sumergir el mineral en agarosa al 0,2% a 37°C. Dejar secar sobre un vidrio de reloj a 35°C durante 10 min. El baño en agarosa protege la integridad de las células a lo largo del proceso.
5. Traspasar el mineral a un tubo eppendorf de 1,6 ml.
6. Deshidratar con 1 ml de etanol al 96%, por 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Dejar secar al aire.

Permeabilización de células e inactivación de peroxidasas:

8. Incubar con 1 ml de lisozima (10 mg/ml en 0,05M EDTA, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5), por 60 min a 37°C.
9. Lavar con agua DD, por 1 min.
10. Incubar con 1 ml de acromopeptidasa (60 U/ml en 0,01 M NaCl, 0,01 M Tris-HCl pH 8) por 30 min a 37°C.
11. Lavar con agua DD por 1 min.
12. Incubar con 1 ml de HCl 0,01 M, por 10 min.
13. Lavar el filtro con agua DD, 2 veces, por 1 min.
14. Deshidratar en etanol al 96%, por 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Dejar secar al aire.

Hibridación

16. Bloquear el mineral con 1 ml de Solución Denhart 5x por 15 min.
17. Repartir el mineral equitativamente en 4 tubos de 0,2 ml.
18. Mezclar con 200 µl de buffer de hibridación y 0,5 µl de sonda marcada con HRP (repetir este paso para cada sonda correspondiente a cada microorganismo que se desea identificar).
19. Incubar a 35°C por 2 hr, en horno de hibridación.
20. Lavar con agua DD a 37°C por 10 min.

Amplificación de la señal y Evaluación al microscopio

21. Remover el exceso del líquido con papel filtro.
22. Incubar en 200 µl de PBS 1x con 0,05% de Triton X-100, con agitación suave por 15 min.
23. Incubar en 15 µl de mix de sustrato de tiramida (1 parte de tiramida Cy3 en 10 partes de buffer de amplificación), por 10 min, en la oscuridad.

24. Incubar en 200 μ l de PBS 1x con 0,05% de Triton X-100, con agitación suave por 15 min en la oscuridad.
25. Lavar con agua DD, por 1 min.
26. Lavar con etanol al 96% por 1 min.
27. Secar al aire.
28. Teñir con DAPI 1 μ g/ml para evaluar al microscopio.
29. Traspasar el mineral a un porta-objetos.
30. Cubrir el mineral con Mountant (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes de 1x PBS con DAPI de concentración final 1 μ g/ml) y luego colocar el cubreobjetos.
31. Afirnar el cubre-objetos con cinta adhesiva en caso de ser necesario.
32. Utilizar un papel blanco debajo del portaobjeto, para facilitar la observación del mineral y las células en el microscopio.
33. Seguir las mismas indicaciones de evaluación señaladas en la sección anterior. Para determinar las células totales en el mineral es necesario registrar la cantidad de cuadrados de la gradilla del ocular en los cuales se está contando.

2.4 Ajustes matemáticos de los datos experimentales

2.4.1 Estudio de capacidad de adherencia a la piritita del cultivo de bacterias nativas

A partir del recuento de células en la cámara de recuento Petroff-Hausser en un microscopio de contraste de fase se obtiene la cantidad de células presentes en cada cuadrante evaluado. Estos valores se promedian obteniendo las $Cel_t^{contadas}$ utilizadas en la Ecuación 8 para obtener las células totales presentes en la solución. V_{total} corresponde al volumen total de la solución, en ml.

$$Cel_t^{totales} = Cel_t^{contadas} * 2 * 10^7 * V_{total} \quad (8)$$

Cuando se han determinado las células totales para todos los tiempos estudiados, se procede a determinar el porcentaje de células adheridas para cada tiempo. Para esto se utiliza la Ecuación 9, mostrada a continuación.

$$\% \text{ de Adherencia} = \frac{Cel_{t=0}^{totales} - Cel_t^{totales}}{Cel_{t=0}^{totales}} * 100 \quad (9)$$

El porcentaje total de células adheridas corresponde al porcentaje de adherencia en el tiempo 120 min.

2.4.2 Determinación de la abundancia relativa de distintas cepas bacterianas presentes en una muestra mediante CARD-FISH

Para determinar la abundancia relativa de cada cepa por medio de CARD-FISH, es necesario realizar varios conteos de las células positivas y de sus respectivas células totales (para mayor explicación con respecto a determinar células positivas y totales dirigirse al Capítulo 2.3.2). Se calcula el porcentaje de células que corresponden a la cepa estudiada por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Células}_{\text{cepa A}} = \frac{\text{Células teñidas con Cy3}}{\text{Células teñidas con DAPI}} * 100 \quad (10)$$

Se repite el proceso anterior de 4 a 8 veces, y luego se calcula el porcentaje promedio, el cual representará la abundancia relativa de la cepa en la muestra estudiada. El mismo procedimiento se repite para cada una de las cepas, y se procede a normalizar al 95%, esto en base a que las bacterias que se están cuantificando

corresponden al 95% de las células presentes, y el 5% restante correspondería a otros microorganismos que no han sido considerados en este trabajo.

El porcentaje promedio se multiplica por el total de células para determinar la cantidad de bacterias totales de la cepa estudiada.

2.4.3 Estudio sobre la capacidad de adherencia al mineral de distintas cepas bacterianas.

Con la información de la abundancia relativa de cada cepa al inicio del experimento y a los 120 minutos, más el recuento directo de las células en solución en ambos tiempos, es posible determinar el número de bacterias en solución de cada especie ($Cel_{Cepa A}$) y así determinar el porcentaje de células adheridas de cada cepa, según las siguientes fórmulas:

$$Cel_{Cepa A} = Cel_{totales} * \% Cel_{Cepa A} \quad (11)$$

$$\% Cel Adheridas_{Cepa A} = \frac{Cel_{Cepa A \ t=0} - Cel_{Cepa A \ t=120}}{Cel_{Cepa A \ t=0}} * 100 \quad (12)$$

Donde $Cel_{totales}$ corresponde al valor determinado por recuento directo y $\% Cel_{Cepa A}$ corresponde al promedio de los valores calculados con la Ecuación 10 para cada cepa.

2.4.4 Experimento de Biolixiviación

El ajuste que se realiza a los valores empíricos de pH, Fe_{Total} y SO_4^{2-} (\overline{pH}_t , \overline{Fe}_t^{Total} y \overline{SO}_4^{2-}) en solución corresponde simplemente a promediar los valores medidos en un determinado tiempo y sumar lo que se ha eliminado de la solución al momento de tomar la muestra. En el caso del pH la ecuación de ajuste es la siguiente:

$$\overline{pH}_t = pH \left(\frac{10^{-pH_t} * V + \sum_{i=0}^{i=t-1} (10^{-pH_i} - 10^{-pH_{MC}}) * vol_i}{V} \right) \quad (13)$$

Donde V corresponde al volumen total del experimento, vol_i indica el volumen de la muestra del día i , y pH_{MC} corresponde al pH del medio de cultivo, cuya concentración de protones se resta a la eliminada, ya que cada vez que se toma una muestra se reemplaza con un volumen equivalente de medio de cultivo fresco.

Con respecto al tratamiento de los valores de hierro total en solución, solo es necesario agregar el hierro eliminado al tomar la muestra, por lo que la Ecuación utilizada para corregir los valores es la 14.

$$\overline{Fe_t^{Total}} = \frac{Fe_t^{Total} * V + \sum_{i=0}^{i=t-1} (Fe_i^{Total} * vol_i)}{V} \quad (14)$$

Para el cálculo del hierro lixiviado (Fe_t^{lixiv}) desde el mineral es necesario además agregar el hierro que ha precipitado como hidróxido, por lo que el cálculo se realiza utilizando la ecuación 15

$$Fe_t^{lixiv} = (\overline{Fe_t^{Total}} - \overline{Fe_0^{Total}}) * V + Fe_t^{ppdo} \quad (15)$$

Con respecto al sulfato en solución, es necesario agregar el sulfato eliminado al momento de tomar la muestra y considerando que el medio fresco también contiene una cantidad fija de sulfato.

$$\overline{SO_{4\ t}^{-2}} = \frac{SO_{4\ t}^{-2} * V + \sum_{i=0}^{i=t-1} (SO_{4\ i}^{-2} - SO_{4\ i}^{-2MC}) * vol_i}{V} \quad (16)$$

Además, es necesario calcular el azufre lixiviado (S_t^{lixiv}) desde el mineral, para esto se considera que cada mol de sulfato que aparece corresponde a un mol de azufre lixiviado, lo cual se expresa en la ecuación 17. Con el fin de comparar la extracción de azufre con la de hierro se calcula el azufre lixiviado teórico ($S_t^{lixiv\ teo}$), para lo cual se toma en cuenta la proporción de moles azufre y hierro en la pirita (FeS_2), la cual es 2:1. El cálculo del azufre lixiviado teórico se muestra en la ecuación 18.

$$S_t^{lixiv} = (\overline{SO_{4\ t}^{-2}} - \overline{SO_{4\ 0}^{-2}}) * V \frac{PA(S)}{PM(SO_4^{-2})} \quad (17)$$

$$S_t^{lixiv\ teo} = Fe_t^{lixiv} \frac{2 * PA(S)}{PA(Fe)} \quad (18)$$

Donde $PA(S)$ corresponde al peso atómico del azufre, $PM(SO_4^{-2})$ el peso molecular del sulfato y $PA(Fe)$ al peso atómico del hierro.

2.4.5 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH

Para el crecimiento celular en solución durante el experimento de biolixiviación se proponen dos ajustes al valor empírico obtenido por medio del recuento directo ($\overline{Cel}_t^{\text{totales}}$): el primero es simplemente agregar las células eliminadas al momento de tomar la muestra y el segundo es considerar que el crecimiento potencial de las células eliminadas sería el mismo que el mostrado por el cultivo. Ambos ajustes se muestran en las ecuaciones 19 y 20, respectivamente.

$$\overline{Cel}_t^{\text{totales}} = Cel_t^{\text{totales}} * V + \sum_{i=0}^{i=t-1} (Cel_i^{\text{totales}} * vol_i) \quad (19)$$

$$\overline{Cel}_t^{\text{totales}} = Cel_t^{\text{totales}} * V + \sum_{i=0}^{i=t-1} (Cel_i^{\text{totales}} * vol_i * \prod_{j=i+1}^{j=t} \mu_j) \quad (20)$$

$$\mu_t = \frac{Cel_{t-1}^{\text{totales}} * (V - vol_{t-1})}{Cel_t^{\text{totales}} * V} \quad (21)$$

Donde i, j y t representan los tiempos de los distintos muestreos. Una vez que se elige el ajuste que se utilizará, se procede a repetir el mismo procedimiento para cada cepa en cada muestra, considerando que $\overline{Cel}_{t \text{ Cepa A}}^{\text{totales}}$ corresponde a la multiplicación de las células totales en ese momento por la abundancia relativa de esa cepa, y así obtener las 4 curvas de crecimiento de la población en solución de las cepas estudiadas.

Para determinar el μ_{max} del cultivo es necesario considerar que éste se encuentra en la fase exponencial de un cultivo batch, por lo que el número de células x para cada momento sigue la ecuación 22. Para calcular el valor de μ_{max} , se realiza la regresión lineal de la expresión mostrada en la fórmula 23.

$$x = x_0 * e^{(\mu t)} \quad (22)$$

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu_{\text{max}} t \quad (23)$$

Con respecto a la población celular asociada al mineral, lo primero es determinar la superficie total disponible para el crecimiento bacteriano (A_{total}). Para eso se determina el área promedio de las partículas de mineral evaluándolas en el microscopio de epifluorescencia equipado con una gradilla en el ocular de 1cm^2 , con divisiones internas cada 1mm . Se asume que el área promedio medida corresponde a un círculo ($A_{circulo}$) y se despeja su radio (r), desde la ecuación 24, el cual corresponderá al radio de la esfera. Obtenido el radio promedio, este se utiliza para calcular el volumen promedio (V_{esfera}) utilizando la fórmula 25. Considerando que la densidad de la pirita (ρ_{pirita}) utilizada es $2,4\text{g/cm}^3$, y que la masa total (m_{pirita}) utilizada fue $0,25\text{g}$, se puede calcular la cantidad de esferas totales y luego determinar el área total disponible según la ecuación 26.

$$A_{circulo} = \pi r^2 \quad (24)$$

$$V_{esfera} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (25)$$

$$A_{total} = \frac{m_{pirita}}{\rho_{pirita}} \frac{4 \pi r^2}{V_{esfera}} \quad (26)$$

Una vez que se tiene el área disponible para el crecimiento de las células se procede a determinar la cantidad de células por unidad de área promedio, la cual se multiplica por el área total para obtener el número de células adheridas totales al mineral. Para determinar el número de bacterias de cada cepa se repite el mismo procedimiento utilizado para la solución.

Capítulo 3 Resultados

3.1 Estudio de capacidad de adherencia a la pirita del cultivo de bacterias nativas.

En este experimento se contactó un inóculo del cultivo de bacterias nativas de un proceso de biolixiviación industrial con mineral pirita, y se realizaron recuentos directos de bacterias totales hasta completar los 120 minutos de contacto. Tal como se observa en la Figura 6, mostrada a continuación, inicialmente se tienen $2,8 \cdot 10^8$ células totales, las cuales están diluidas en un volumen de 25 ml de medio. Durante los primeros 15 min del experimento el recuento de células en solución cae bruscamente, lo que se traduce en una adherencia inicial del 40% de las células presentes. La velocidad de desaparición de las células va disminuyendo a medida que avanza el tiempo, de modo que al cabo de 90 min el recuento de células llega a su mínimo, que es $2,5 \cdot 10^7$ células totales suspendidas, lo que implica una adherencia del 90% de las células inoculadas.

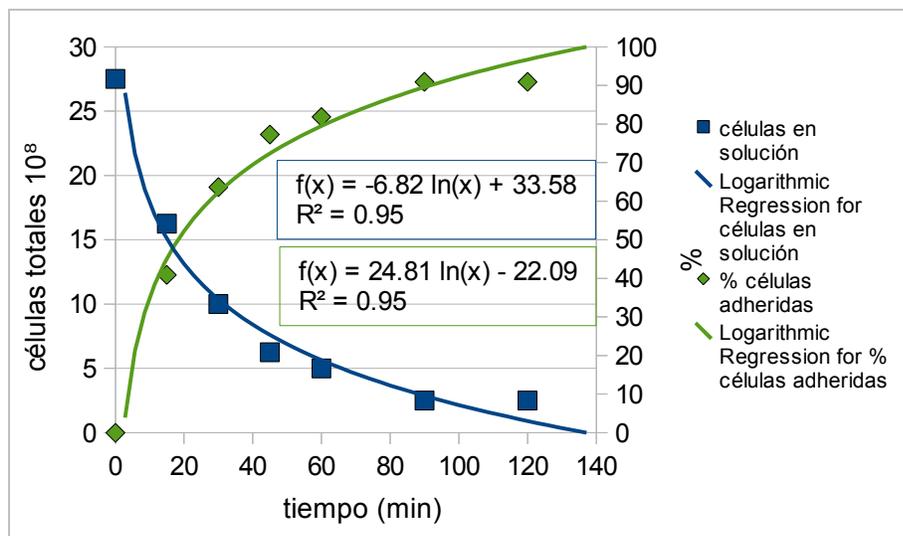


Figura 6: Recuento de células en solución durante 120 min, y el porcentaje de células adheridas calculado como la diferencia entre las células iniciales y las presentes al momento del conteo

La línea de tendencia que mejor describe la curva de adherencia es un logaritmo, con un R^2 de 0,95.

3.2 Estudio sobre la capacidad de adherencia al mineral de distintas cepas bacterianas.

En la segunda etapa del experimento presentado en la sección anterior corresponde identificar cuál de las distintas especies bacterianas presentes en el inóculo inicial tenía una mayor capacidad de adherencia. Para esto se tomó una muestra de la solución inicial (antes del contacto) y otra muestra a los 120 min del experimento. Ambas muestras fueron tratadas según el protocolo de CARD-FISH.

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos para la composición de la solución inicial, siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo 2.3.2, donde es posible observar que las dos cepas más importantes inicialmente eran *At. thiooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*, con un 52,1% y un 21,6% de abundancia relativa, respectivamente, seguidos por *At. ferrooxidans* con un 18% y *L. ferrooxidans* con un 8% de las células totales presentes en el inóculo.

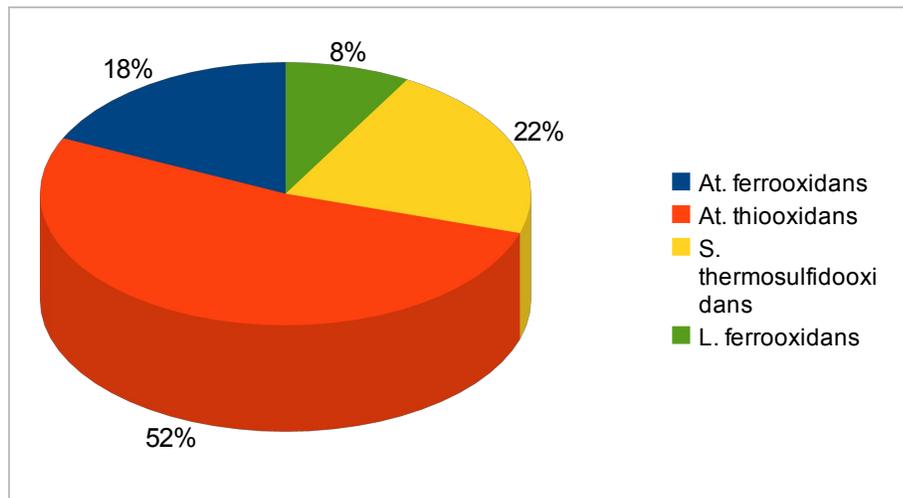


Figura 7: Composición del inóculo del cultivo nativo de la Mina Escondida

Después de 120 min en que la solución se encuentra en contacto con el mineral, la composición de la misma cambia a la mostrada en la Figura 8, donde las especies más importantes nuevamente corresponden a *S. thermosulfidooxidans* que aumenta su abundancia hasta un 33,4% y *At. thiooxidans* que disminuye su proporción a un 47,6% de la población total en solución a los 120 min de experimento. Les siguen *At. ferrooxidans* que disminuye hasta un 11% y *L. ferrooxidans* que se mantiene en un 8% de las células totales.

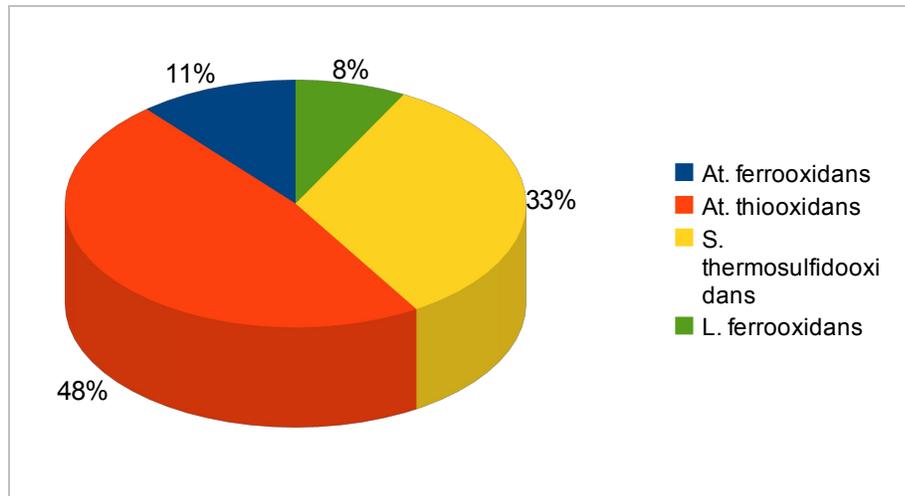


Figura 8: Composición de la solución después de 120 min de contacto con pirita

Con la información de la abundancia relativa de cada cepa al inicio del experimento y a los 120min, más el conteo directo de las células en solución en ambos momentos, es posible determinar el número de bacterias en solución de cada especie y así determinar el porcentaje de células adheridas de cada cepa, utilizando las fórmulas (11) y (12), mostradas en el capítulo 2.4.3. Los porcentajes de células de cada especie adheridas después de 120 min de contacto, se presenta a continuación, en la Figura 9.

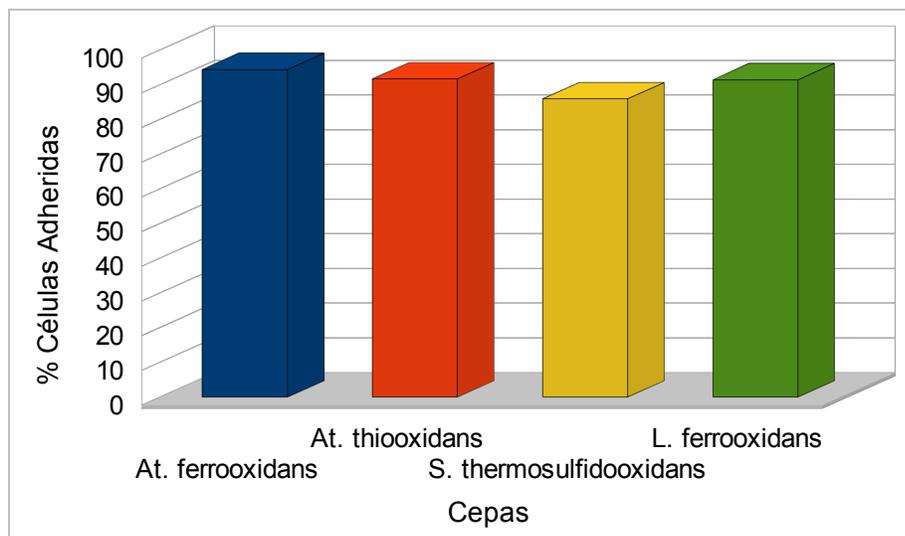


Figura 9: Porcentaje de células adheridas después de 120 min de contacto con el mineral, para cada una de las cepas estudiadas

De la Figura 9 se desprende que la única cepa cuya capacidad de adherencia es menor al 90% es *S. thermosulfidooxidans*, cuyo porcentaje de células adheridas pasado los 120 min de experiencia solo alcanzó el 85,92%. Por otro lado, la cepa que mostró una mayor capacidad de adherencia, medida como la desaparición de las células en solución, corresponde a *At. ferrooxidans*, seguida por *At. thiooxidans* y *L. ferrooxidans* con un 94,37%, un 91,69% y un 91,43% de células adheridas a alguna superficie, respectivamente, pasados 120 min del momento de la inoculación.

3.3 Experimento de Biolixiviación

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante el proceso de biolixiviación de un mineral de pirita utilizando el cultivo mixto estudiado en los capítulos 3.1 y 3.2. Estos resultados serán presentados como resultados parciales según el parámetro que se está midiendo.

Para realizar este experimento se siguió la metodología explicada en el Capítulo 2.1 (Determinación de la Capacidad de Biolixiviación de Pirita de un cultivo), la cual consistió en medir periódicamente el pH, Eh, Fe (II), Fe total, sulfato en solución, precipitados de hierro, recuento de bacterias totales en solución y análisis de la población bacteriana mediante CARD-FISH (todo en duplicado), con el fin de determinar el avance de la biolixiviación y relacionarlo con la composición de la solución desde el punto de vista microbiológico.

3.3.1 Comportamiento del pH y el Eh de la solución

Como se observa en la Figura 10, durante las 200 primeras horas del experimento el pH sube desde 1,8 hasta 2,05, lo cual se puede deber al consumo de protones que ocurre cuando se oxida Fe(II) a Fe(III), tal como se muestra en la ecuación 2. A las 168 horas de experimentación el pH fue ajustado al valor inicial del medio de cultivo (1,8) con el fin de evitar la generación de un exceso de precipitados de hierro que pudieran pasivar la biolixiviación de la pirita. Posterior a eso se ve un descenso muy suave del pH, lo que indicaría que el consumo de protones debido a la oxidación del hierro y la generación de protones debido a la oxidación de los sulfuros (Ecuación 3) se encuentra bastante equilibrada. Los valores graficados corresponden al promedio de los valores empíricos, calculado según lo explicado en el Capítulo 2.4.4

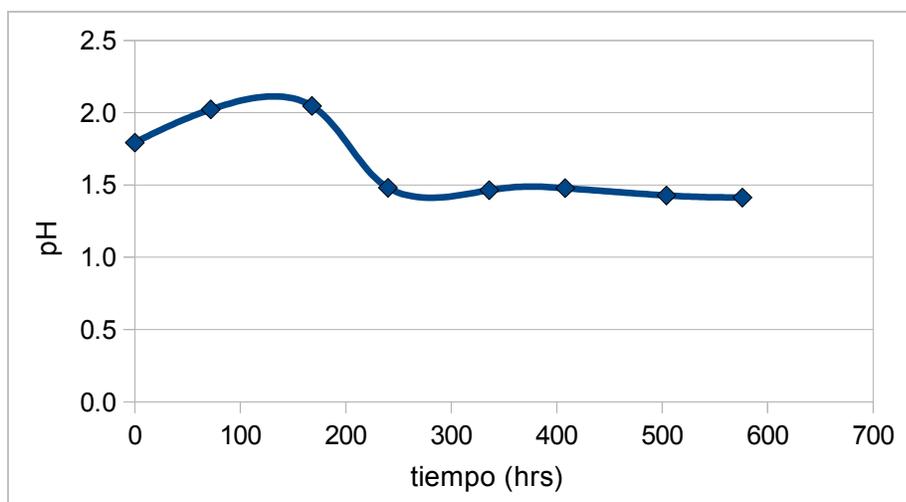


Figura 10: Comportamiento del pH durante el experimento de biolixiviación de pirita utilizando un cultivo mixto de microorganismos nativos

Con respecto al potencial redox de la solución de biolixiviación, tal como se ve en la Figura 11, inicialmente tiene un valor cercano a los 400mV, lo cual indica que la mayoría del hierro presente se encuentra en estado de oxidación II, lo que corresponde a las condiciones iniciales del experimento (se agregó 2,5g/l de Fe(II) como sulfato ferroso). A las 200 horas de experimentación el Eh supera los 700mV, señalando que el hierro que se encuentra en la solución está como Fe(III). Este resultado concuerda con el comportamiento inicial del pH, dando cuenta de la presencia de actividad bacteriana. Posterior a las 200hr el Eh se mantiene constante alrededor de los 730mV. Al igual que en el pH, los valores graficados corresponden al promedio de los valores empíricos.

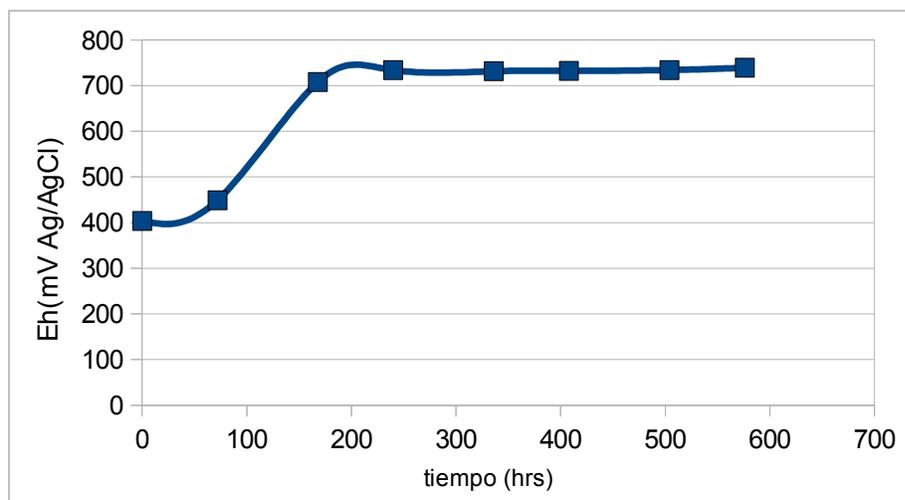


Figura 11: Comportamiento del Eh durante el experimento de biolixiviación de pirita utilizando un cultivo mixto de microorganismos nativos

3.3.2 Comportamiento de los iones Fe(II) y Fe(III), oxidación del Fe(II) por la actividad bacteriana y lixiviación de la pirita medida en el aumento del hierro total.

Con respecto al comportamiento del hierro en solución, el cual está graficado en la Figura 12, se observa que inicialmente el 90% del hierro total se encuentra en la forma de Fe(II), a una concentración cercana a los 2,5g/l, como corresponde a las condiciones iniciales del experimento. Durante las horas siguientes la concentración de ion ferroso disminuye, de modo que a las 200 hrs de experimento el Fe(II) se encuentra en concentraciones bajo los 100mg/l. Por el contrario, Fe(III) presente en solución parte con concentraciones por debajo de los 250mg/l, aumentando fuertemente hasta supera los 2700mg/l a las 200 hrs, lo cual quiere decir que a estas alturas la totalidad del Fe(II) agregado inicialmente se ha oxidado, y además se ha comenzado a lixiviar hierro desde el mineral de pirita.

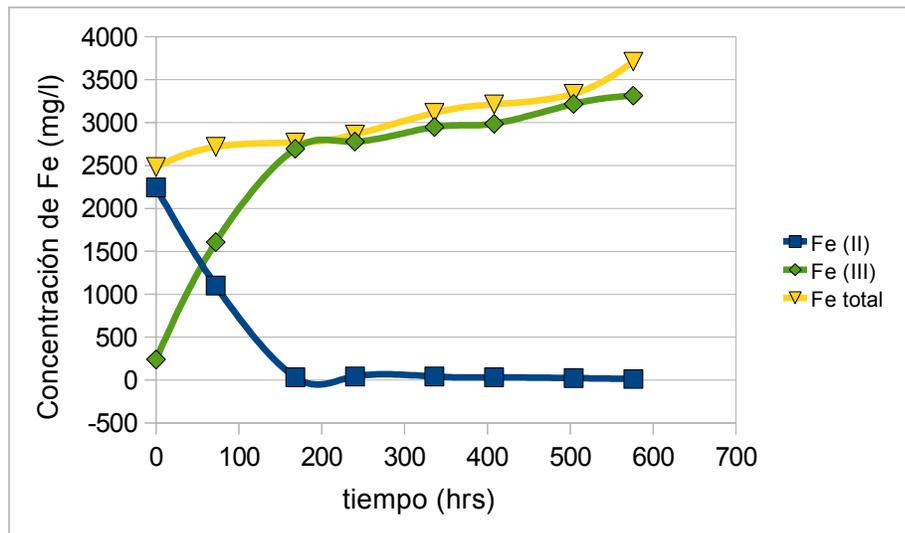


Figura 12: Concentración de los iones Fe(II) y Fe(III) y Fe total en solución durante el experimento de biolixiviación de pirita

Posterior a las 200hr de experimento se observa un aumento constante de la concentración de Fe(III) en la solución, lo cual se debe a la oxidación del Fe(II) liberado en la biolixiviación de la pirita, mientras que el Fe(II) se mantiene siempre a muy bajas concentraciones.

El hierro total en solución, que corresponde a la suma del Fe(II) más el Fe(III) más el hierro precipitado, va aumentando con el paso del tiempo, dando cuenta de la disolución del mineral, alcanzando una concentración final de 3700 mg/l.

Con respecto al Fe(II) oxidado por la acción bacteriana, es importante destacar que este corresponde al Fe(III) presente en la solución más el fierro lixiviado hasta ese momento, ya que por cada mol de pirita lixiviado fue necesario reducir un mol de Fe(III). Considerando esto, la generación de Fe(III) por el metabolismo de las bacterias ferrooxidantes se puede dividir en dos etapas. En la primera, el sustrato disponible corresponderá a el Fe(II) agregado como sulfato ferroso al inicio del experimento y el Fe(II) generado durante la lixiviación de la pirita. En la segunda etapa solo estará disponible el Fe(II) proveniente de la lixiviación de la pirita.

La generación del producto del crecimiento bacteriano, es decir la oxidación de Fe(II) a Fe(III), se muestra en la Figura 13. En ella se observa que la primera etapa dura hasta las 168 hrs de experimentación, y que la velocidad con que las bacterias oxidan en Fe(II) es de 0,8 mg/hr, con un R^2 de 0,97. La segunda etapa, en la cual ya no está disponible el Fe(II) agregado inicialmente tiene una velocidad de generación de Fe(III) de 0,18 mg/hr, con un R^2 de 0,98.

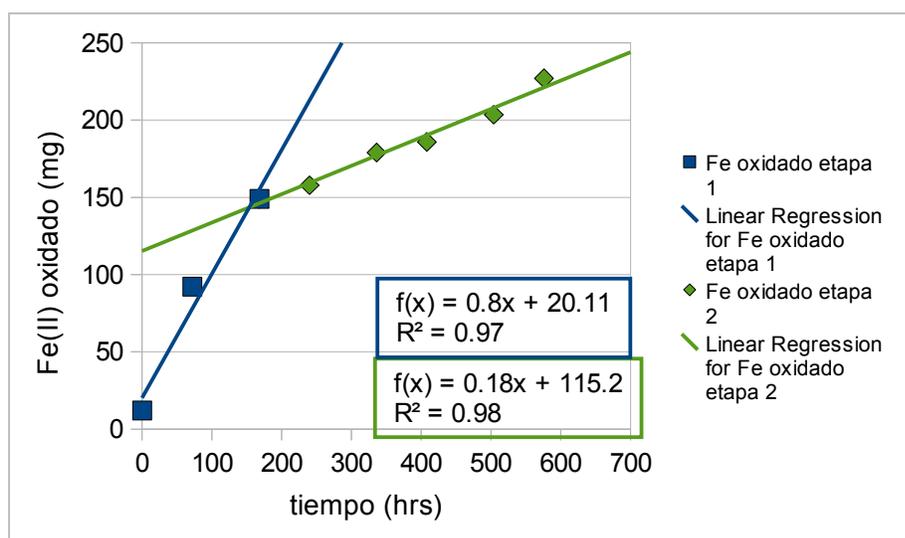


Figura 13: Cinética de oxidación del fierro presente en la solución separado en 2 etapas: entre las 0 y las 168 hrs de experimentación y entre las 168 y las 576 hrs de experimentación

Esta disminución en la velocidad de generación del producto del metabolismo de las bacterias ferrooxidantes es un excelente indicador para esperar que el crecimiento del cultivo mixto utilizado muestre una desaceleración de su crecimiento, especialmente en el caso de *Ac. ferrooxidans*, la cual muestra un crecimiento muy bajo cuando la concentración de Fe(II) es baja, según lo señalado en la introducción de este trabajo.

La lixiviación de la pirita, medida como el incremento del hierro total, está expuesta en la Figura 14. El hierro total aquí graficado corresponde al total de Fe(II) y Fe(III) presentes en solución más el hierro que ha precipitado. Desde la Figura 14 se observa que el hierro lixiviado a las 576 hrs de experimentación es 61,3 mg, lo cual corresponde al 52,7% del hierro total agregado en los 0,25 g del mineral. La velocidad de extracción de hierro a lo largo del experimento es de 0,09 mg/hr, según la regresión lineal de los datos con un R^2 de 0,96.

Además en esta figura se muestra el aumento de los hidróxidos de hierro precipitados en el mineral, cuyo máximo valor es de 6,1 mg. La velocidad de precipitación de hierro, seguramente en forma de jarosita y otros hidróxidos de hierro, es de 0,01 mg/hr, y el total del hierro precipitado corresponde a un 3,67% del hierro total en solución al final del experimento.

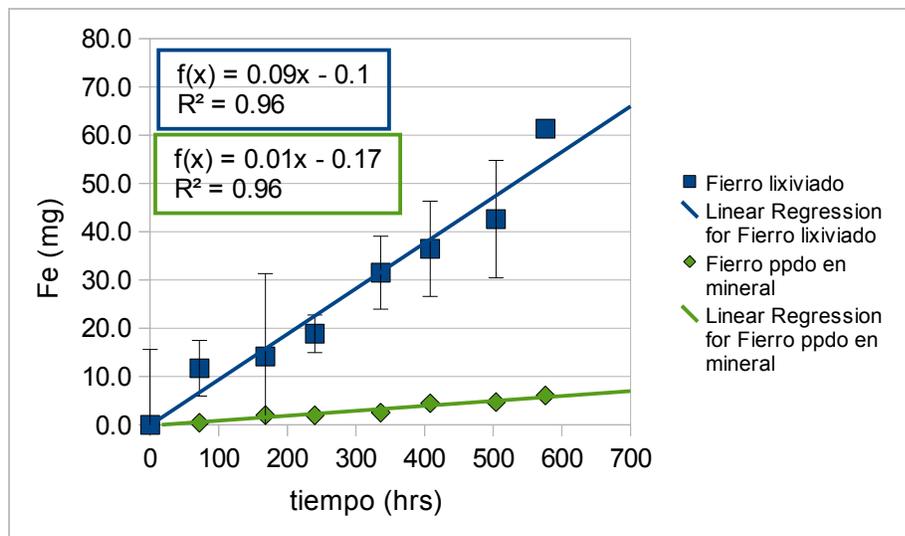


Figura 14: Biolixiviación del Hierro proveniente del mineral de pirita y generación de precipitados de Hierro. El error en el medición del hierro lixiviado corresponde a la desviación estándar de los valores medidos experimentalmente.

3.3.3 Lixiviación de la pirita medida como la extracción de azufre

La extracción de azufre desde el mineral fue determinada por medio de la medición del sulfato en solución. Durante las 600 hrs de experimentación se lixiviaron 52,9 mg de Azufre desde la pirita, lo cual corresponde al 39,6% del azufre presente en el mineral, y la velocidad de extracción de azufre desde el mineral fue de 0,09 mg/hr, con un R^2 de 0,95.

Además, a partir del hierro lixiviado determinado con anterioridad se calculó el azufre lixiviado teórico, según el procedimiento mostrado en la sección 2.4.4. Este azufre teórico alcanza el valor de 70 mg lixiviados a las 600 hrs de experiencia, lo que equivale a un 33% más de lo medido experimentalmente. La diferencia entre el valor real y el teórico puede deberse a que el azufre lixiviado puede estar como alguno de los intermediarios de compuestos reducidos de azufre descritos en el mecanismo del tiosulfato (Schippers et al. (1996)), (Sand, W. (2003)), o bien a que la oxidación bacteriana del azufre sea efectivamente menor a la esperada y que éste se esté acumulando como azufre elemental en la superficie del mineral.

La lixiviación de azufre desde la pirita y la disolución de azufre esperada se muestra a continuación en la Figura 15.

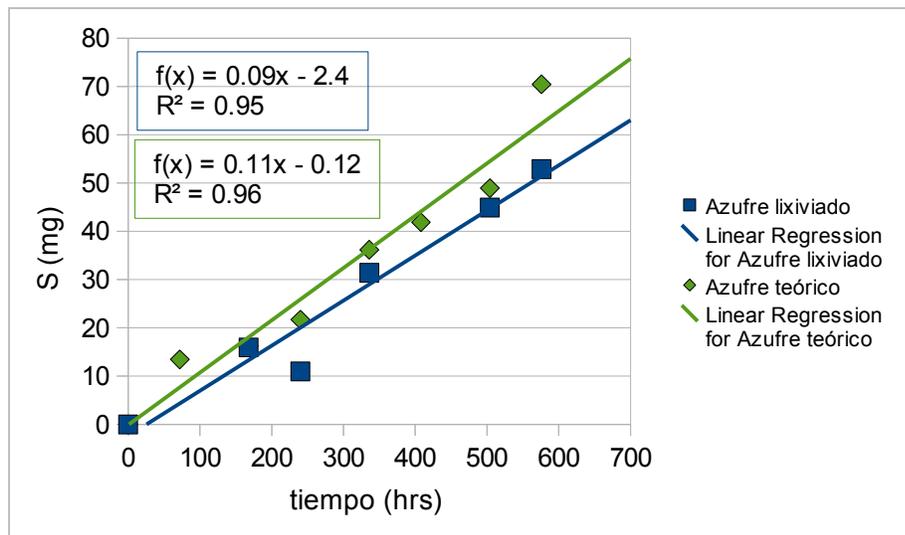


Figura 15: Biolixiviación de Azufre desde el mineral de pirita y Azufre Teórico esperado, calculado utilizando el valor del hierro lixiviado durante el experimento.

3.4 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH

En esta sección se muestran los resultados respecto al análisis de la población bacteriana tanto de la solución como del mineral durante el experimento de biolixiviación de pirita utilizando un cultivo mixto de bacterias nativas proveniente de un proceso industrial.

3.4.1 Crecimiento Celular en solución

Para el recuento de las células totales en solución se proponen dos formas de ajustar los datos empírico, tal como se señaló en el capítulo 2.4.5 (Metodología, Ajustes matemáticos de los datos experimentales). El primer ajuste es simplemente agregar las células que se eliminaron al momento de tomar la muestra, calculado utilizando la Ecuación 19, que se encuentra en la página 26. El segundo ajuste es una proyección donde se considera un crecimiento potencial de las células eliminadas igual al mostrado por el cultivo en ese mismo intervalo de tiempo (Ecuación 20, página 26). En la Figura 16 se expone el recuento directo de las células totales y los dos ajustes propuestos.

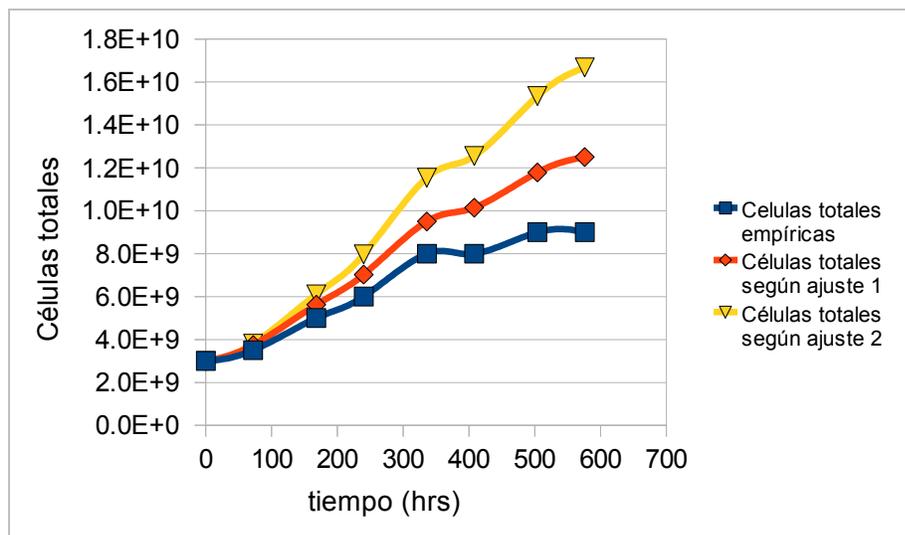


Figura 16: Crecimiento celular determinado por recuento directo (RD) utilizando un microscopio de contraste de fase y las dos correcciones propuestas

Debido a la imposibilidad de aseverar que las células eliminadas habrían mostrado la misma tasa de crecimiento que las células que se mantuvieron en el matraz, se decide optar por un balance de masa simple agregando las células eliminadas.

Es importante destacar que la gran diferencia entre el valor medido experimentalmente y las correcciones propuestas se debe a que la muestra tomada

correspondía a un 8% del total del volumen, por lo tanto, el proceso de muestreo alteró de manera importante el muestreo del crecimiento celular. Esta diferencia corresponde a un 39% extra de crecimiento medido al agregar las células eliminadas y a un 85% extra si se considera el crecimiento potencial de estas células. Si el volumen tomado para la muestra hubiera sido sólo un 2% del volumen total, las correcciones solo aumentarían el valor final en un 9% y un 15% respectivamente.

Considerando que se estudiará el ajuste correspondiente a reponer las células eliminadas en el proceso de muestreo (en rojo en la Figura 16), se procederá a analizar la gráfica del crecimiento correspondiente por separado, la cual se muestra en la Figura 17. Aquí es posible observar que las células totales presentes en la solución de biolixiviación al inicio del experimento alcanzan el valor de 3×10^8 , lo que corresponde a una concentración inicial de 6×10^7 cel/ml.

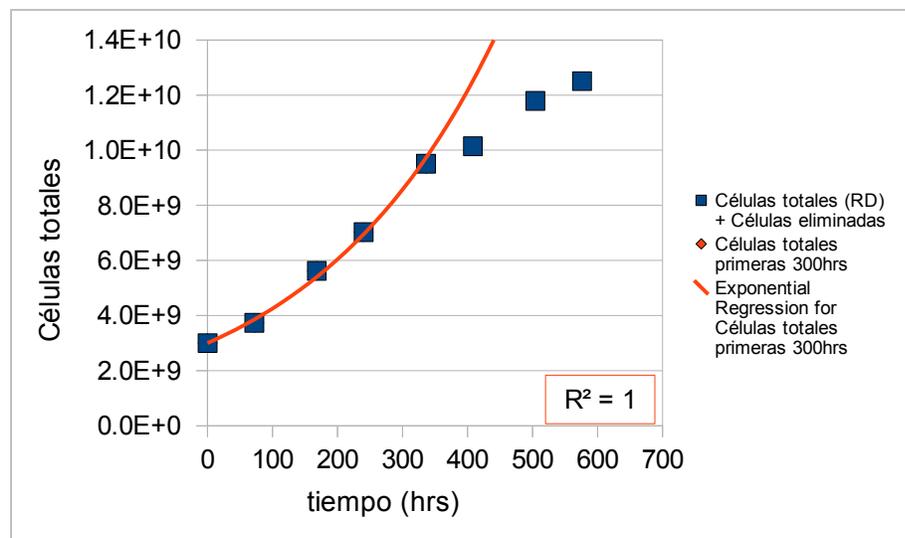


Figura 17: Recuento de células totales presentes en la solución de biolixiviación, regresión exponencial para las 600 hrs de experimentación y para las primeras 300 hrs

El número de células totales aumenta a lo largo de la experiencia, duplicando el total de células a las 200 hrs de experimentación, y duplicándose nuevamente a las 500 hrs de estudio, hasta alcanzar un total de $1,3 \times 10^9$ de células totales, es decir una concentración final de $2,5 \times 10^8$ cel/ml.

Teniendo en consideración que el cultivo mixto hasta las 576 hrs de estudio está en etapa exponencial de crecimiento, se realiza una regresión exponencial, cuyo valor de R^2 es de 0,95, mientras que si solo se realiza la regresión exponencial a las primeras 300 hrs de crecimiento el R^2 toma valor 1. Por este motivo se considera que el cultivo se encuentra en su fase exponencial de crecimiento durante las primeras 300 hrs, es decir, mientras el sustrato (Fe(II)) se encuentra en exceso en la solución el cultivo sigue una cinética del tipo Monod. Posterior a las 300 hrs de experimentación el cultivo entra lentamente a un estado de desaceleración, ya que su crecimiento se encuentra limitado

a la generación de Fe(II) debido a la lixiviación de la pirita.

Siguiendo el procedimiento explicado en la sección 2.4.5, se utilizaron los valores de las primeras 300 hrs de experimento para determinar la velocidad máxima de crecimiento del cultivo mixto en su conjunto, cuyo valor, tal como se ve en la Figura 18, es de $0,003 \text{ hr}^{-1}$, con un R^2 de valor 1, al igual que en la regresión anterior. Esta velocidad máxima de crecimiento implica que el tiempo mínimo de duplicación de la población de este cultivo, en las condiciones de cultivo utilizadas, es de 198 hrs, lo cual solo ocurre cuando el sustrato para la obtención de energía (Fe(II)) está en exceso.

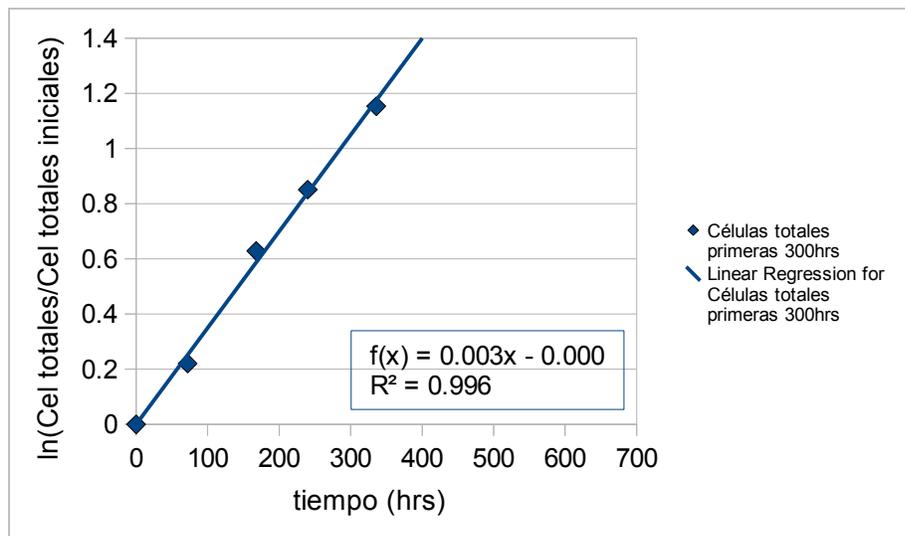


Figura 18: Regresión lineal del logaritmo natural del total de células en el tiempo sobre el total de células iniciales para las primeras 300 hrs de experiencia

3.4.2 Análisis de la población bacteriana en solución mediante CARD-FISH

Por medio de la técnica de CARD-FISH es posible obtener los porcentajes de abundancia de cada especie. El monitoreo de las 4 especies bacterianas estudiadas (*At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *S. thermosulfidooxidans* y *L. ferrooxidans*) en la solución de biolixiviación de pirita dio como resultado los porcentajes de abundancias mostrados en la Figura 19, considerando que los porcentajes obtenidos fueron normalizados al 95%, ya que normalmente estas bacterias representan ese porcentaje de la población total. En el gráfico es posible distinguir claramente dos etapas: la primera etapa es la de adaptación del inóculo a un nuevo medio de cultivo conteniendo Fe(II) como sulfato ferroso y pirita, y dura hasta las 240 hrs de monitoreo. La segunda etapa es una estabilización del cultivo, en donde la abundancia de cada cepa pareciera estar fija en un valor.

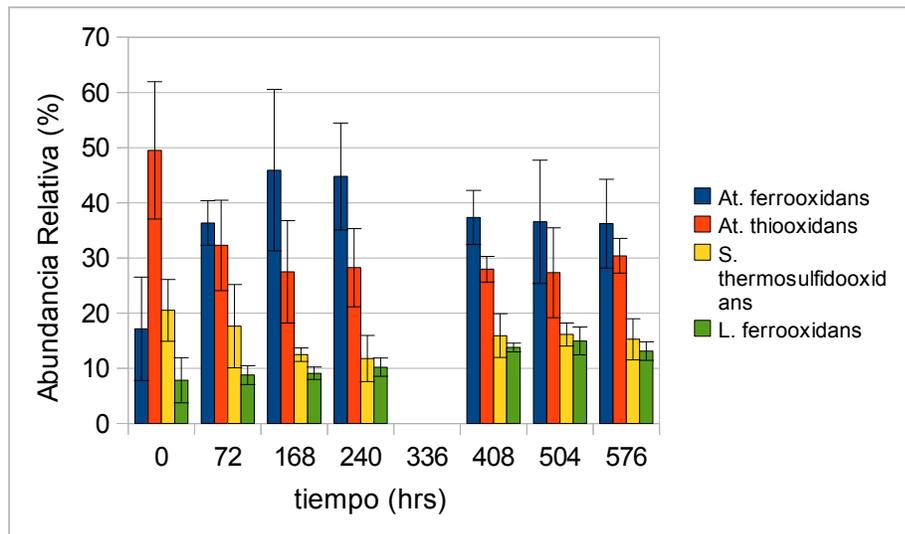


Figura 19: Composición de la población bacteriana durante el experimento de biolixiviación de pirita utilizando un consorcio nativo. Las barras de error graficadas corresponden a la desviación estándar de los valores medidos empíricamente.

En la etapa de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo es posible observar que *At. thiooxidans* y *S. thermosulfidooxidans* disminuyen su abundancia relativa desde un 49,5% inicial a un 28,2% final y desde un 20,5% a un 11,8%, respectivamente, en las primeras 240 hrs del experimento. Por otro lado, *At. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* aumentan su participación en la población total desde 17% hasta un 45% y desde un 8% a un 10%, respectivamente, en este mismo periodo de tiempo.

En la etapa de estabilización del cultivo se observan las siguientes abundancias relativas aproximadas para las distintas cepas: *At. ferrooxidans* 37%, *At. thiooxidans* 28%, *S. thermosulfidooxidans* 16% y *L. ferrooxidans* 14%, las cuales se mantienen hasta el final del experimento.

La muestra correspondiente a las 336 hrs de experimentación no se muestra, ya que no fue posible realizar la identificación de las bacterias presentes debido a un error en la dilución de la muestra.

Utilizando la abundancias relativas mostradas en la Figura 19 y el valor de células totales medido por recuento directo mostrado en la Figura 16 se procede a calcular el número total de células de cada cepa estudiada. Este cálculo se hace del mismo modo que el primer ajuste de células totales mostrado en la misma figura del recuento directo, correspondiente a la Ecuación 19. La composición del consorcio de bacterias a lo largo del experimento de biolixiviación de pirita se muestra a continuación, en la Figura 20.

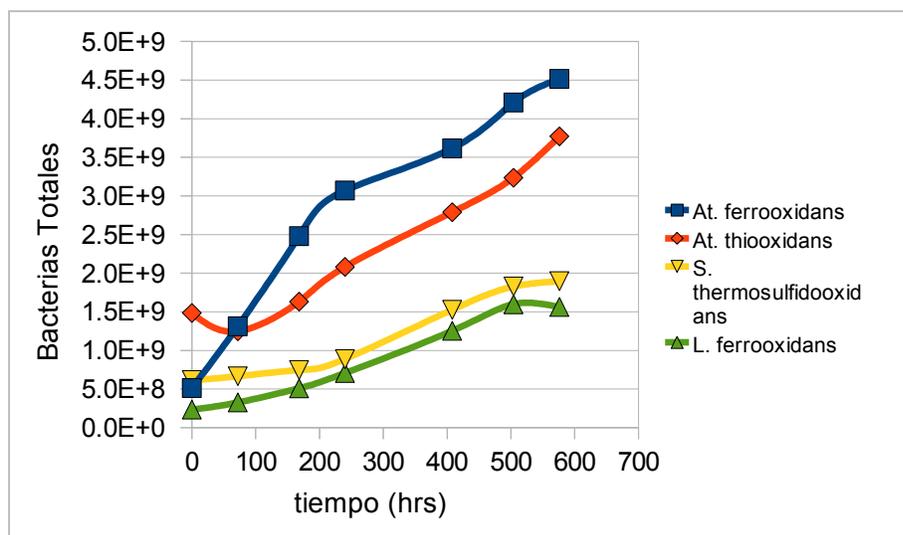


Figura 20: Composición de la población bacteriana presente en la solución de biolixiviación de pirita a lo largo del experimento, medida como en bacterias totales.

En ella se puede observar el aumento explosivo en la población de *At. ferrooxidans*, la cual duplica su población inicial de $5,1 \cdot 10^8$ bacterias a las 50 hrs de experimento, duplicando nuevamente la población a las 125 hrs. Este rápido crecimiento disminuye su velocidad pasadas las 200 hrs, momento que coincide con la desaparición del Fe(II) agregado inicialmente, según lo observado en la Figura 12 y con la disminución de la velocidad de generación del producto de su metabolismo celular, Fe(III), tal como se muestra en la Figura 13. Finalmente, a las 576 hrs de experimento la población ha aumentado 8,8 veces con respecto a la población inicial de *At. ferrooxidans*, llegando a un total de $4,5 \cdot 10^9$ bacterias de esta cepa.

La otra cepa que muestra un importante crecimiento durante el experimento es *L. ferrooxidans*, la cual comienza con una población de $2,4 \cdot 10^8$ bacterias, duplicándola a las 150 hrs de experiencia, y cuadruplicándola a las 300 hrs. Este crecimiento se mantiene constante hasta las 500 hrs de experimento, momento en el cual ha aumentado la población inicial 7 veces. Hacia el final de la experiencia se observa un suave descenso de la población total de *L. ferrooxidans*, llegando a los $1,6 \cdot 10^9$ células totales.

Con respecto a las otras dos cepas estudiadas, *At. thiooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*, se observa que ambas tienen un crecimiento mucho menor que las cepas analizadas anteriormente. Ambas mantienen su población mas o menos constante durante las primeras 200 hrs de experimentación, duplicándola recién a las 400 y 350 hrs, respectivamente. A las 576 hrs de experiencia la población de ambas cepas han aumentado 2,6 veces en el caso de *At. thiooxidans* y 3,1 veces para *S. thermosulfidooxidans*, lo cual, sin duda es un crecimiento muy inferior al mostrado tanto por *At. ferrooxidans* como por *L. ferrooxidans*. La población final de *At. thiooxidans* y de *S. thermosulfidooxidans* alcanza los $3,8 \cdot 10^9$ y $1,9 \cdot 10^9$ bacterias respectivamente.

A continuación se procederá a estudiar el crecimiento de cada cepa por separado, para determinar el μ_{\max} de cada una en las condiciones de cultivo utilizadas en este experiencia.

3.4.2.1 *At. ferrooxidans*

El crecimiento de la población de *At. ferrooxidans*, se muestra en la Figura 21. Al realizar la regresión exponencial a los valores de bacterias totales correspondientes a las primeras 240 hrs se obtiene un R^2 de 0,93.

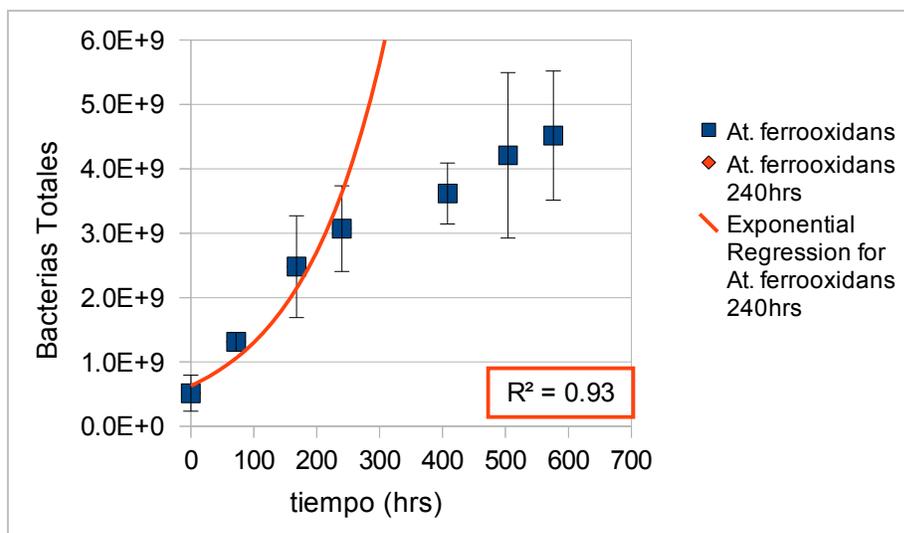


Figura 21: Crecimiento de *At. ferrooxidans*, regresión exponencial para las primeras 240 hrs de experiencia. El error corresponde a la desviación estándar de los valores empíricos

Este crecimiento inicial tan fuerte y su posterior detención es coincidente con el comportamiento del Fe(II) y la oxidación bacteriana de Fe(III) mostradas en las Figuras 12 y 13, respectivamente. Además, el hecho que el crecimiento de esta bacteria se detenga junto con la disminución del Fe(II) y el respectivo aumento del Fe(III) en solución confirma estudios anteriores donde se señalaba que en estas condiciones el crecimiento de *At. ferrooxidans* se ve fuertemente inhibido por la presencia de Fe(III) y que en bajas concentraciones de Fe(II) no muestra crecimiento (Rawlings et al. (1999)), (Pizarro et al. (1996)).

Tomando en consideración que el crecimiento de las primeras 240 hrs tiene un comportamiento exponencial, típico de la cinética de Monod, se procede a linealizar estos valores, lo cual se presenta en la Figura 22. Desde aquí es posible observar que el μ_{\max} de esta cepa es de $0,01\text{hr}^{-1}$, lo cual significa que el tiempo mínimo de duplicación de este cultivo en las condiciones estudiadas es de 69 hrs.

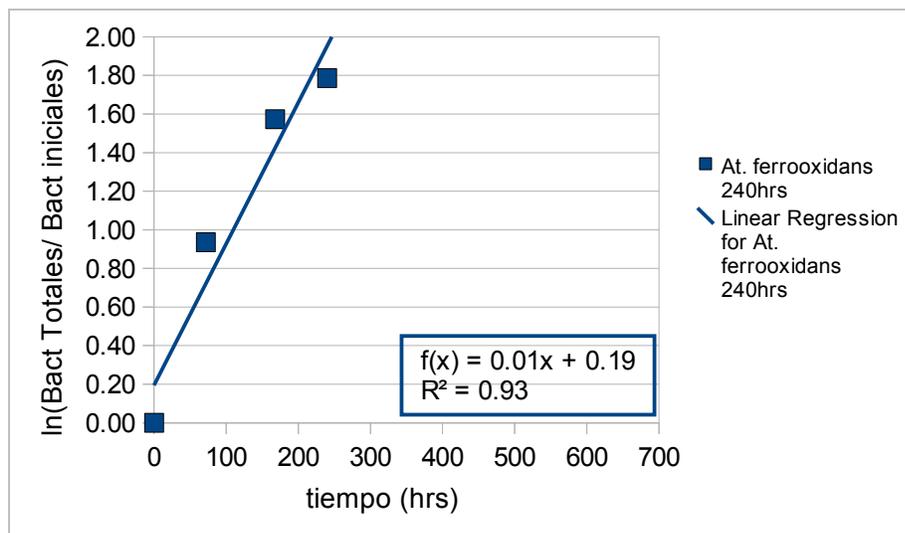


Figura 22: Regresión lineal para la linealización de las 240 hrs iniciales de crecimiento *At. ferrooxidans*

3.4.2.2 *At. thiooxidans*

Continuando con el mismo análisis para el crecimiento de *At. thiooxidans*, el cual se presenta en la Figura 23, la regresión exponencial al eliminar el valor inicial obtiene un R^2 de 0,98, lo que indicaría una etapa de retraso inicial y cinética de crecimiento del tipo Monod hasta el final del experimento. Este comportamiento indicaría la posible presencia de compuestos reducidos de azufre solubles. Al realizar la linealización del crecimiento a partir de las 72 hrs (Figura 24) se determina que el μ_{\max} de esta cepa es de $0,002 \text{ hr}^{-1}$, es decir el tiempo de duplicación de *At. thiooxidans* en las condiciones de cultivo utilizadas es de 347 hrs.

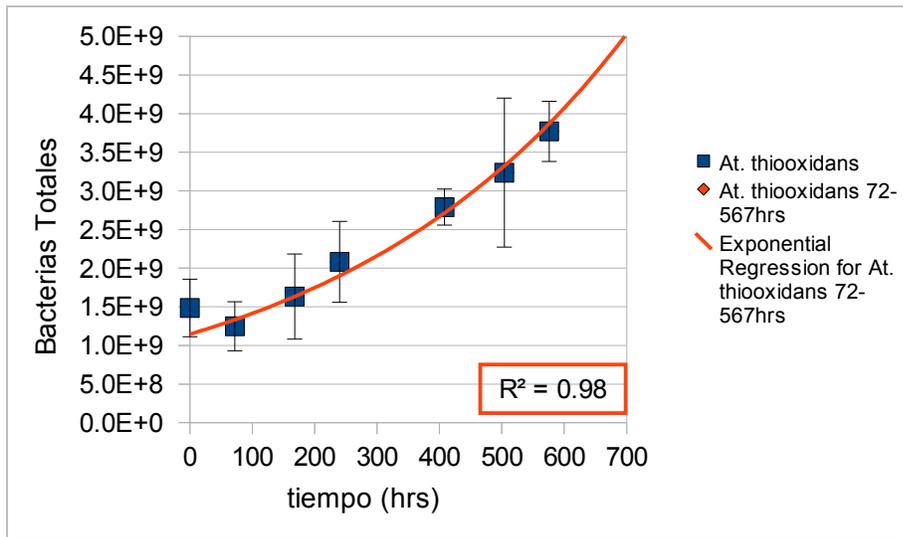


Figura 23: Crecimiento de *At. thiooxidans*, regresión exponencial a partir de las 72 hrs. Las barras de error corresponden a la desviación estándar

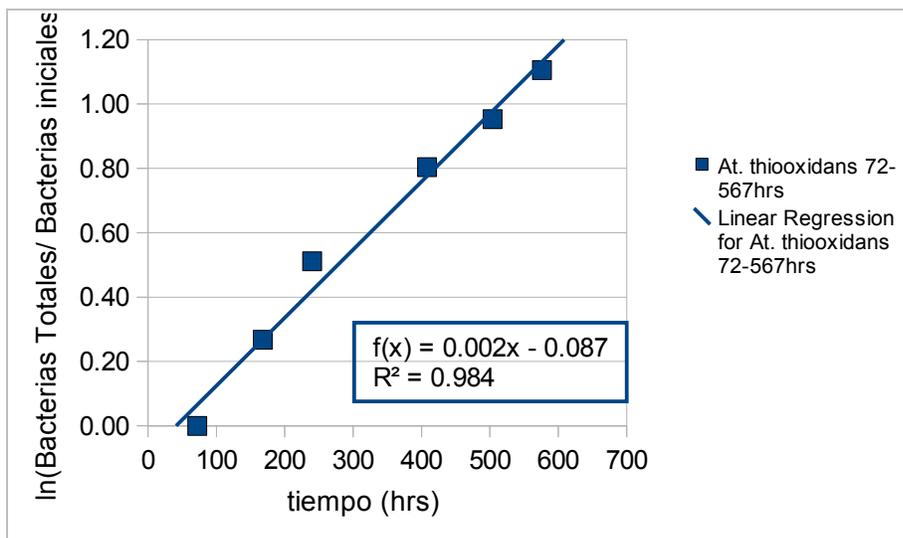


Figura 24: Linealización del crecimiento *At. thiooxidans* a partir de las 72 hrs

3.4.2.3 *S. thermosulfidooxidans*

Siguiendo el mismo procedimiento para *S. thermosulfidooxidans*, se realizó una regresión exponencial para el periodo comprendido entre las 72 y las 504 hrs del experimento, que entregó un R^2 de 0,98. Este comportamiento coincide con el mostrado por *At. thiooxidans* en indicaría además que esta cepa es capaz de crecer a bajas concentraciones de Fe(II). La linealización de los datos, entrega un μ_{max} de $0,003 \text{ hr}^{-1}$, lo cual implica que el tiempo de duplicación de esta cepa en las condiciones utilizadas es de 347 hrs.

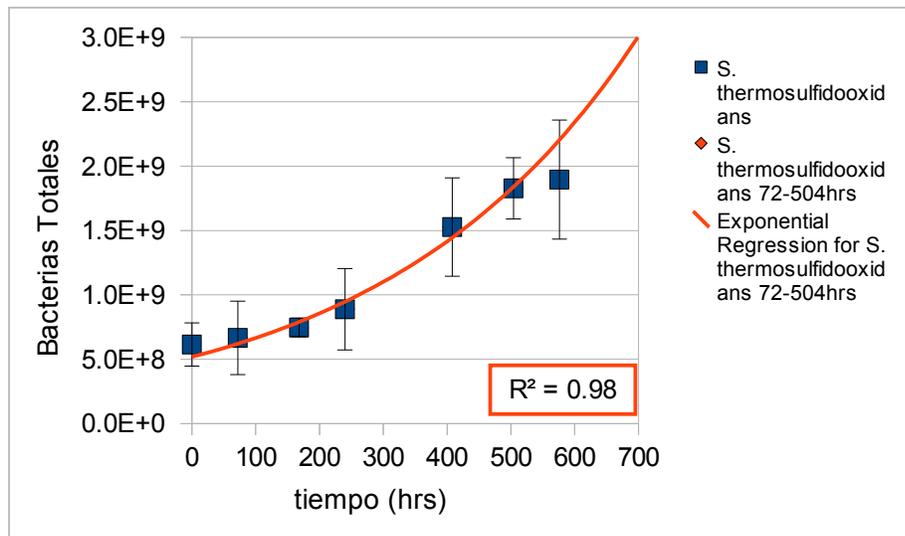


Figura 25: Crecimiento de *S. thermosulfidooxidans*, regresión exponencial en el periodo entre las 72 y las 504 hrs del experimento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar

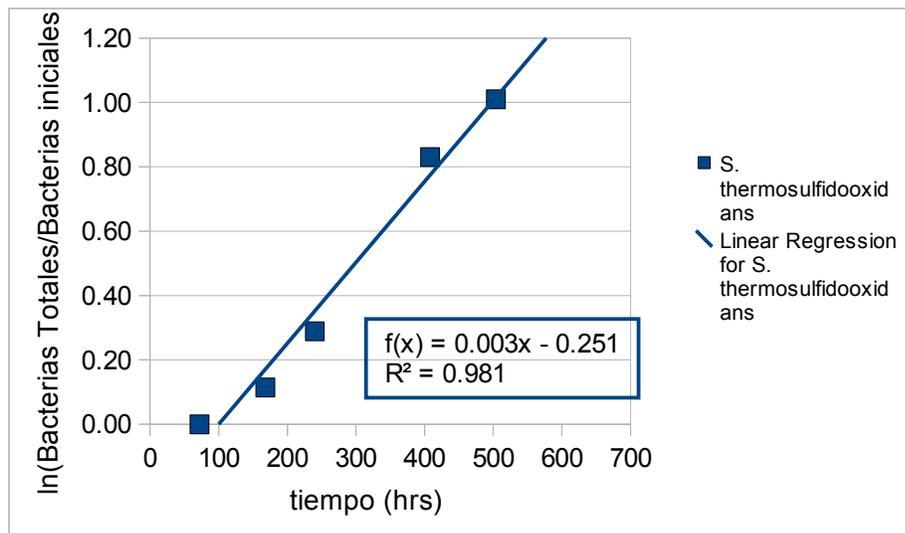


Figura 26: Linealización del crecimiento de *S. thermosulfidooxidans*

3.4.2.4 *L. ferrooxidans*

La última cepa estudiada corresponde a *L. ferrooxidans*. Se realizó una regresión exponencial a su crecimiento eliminando el último punto, en el cual se veía una evidente desaceleración, obteniéndose un R^2 de 0,99 (Figura 27). Este crecimiento de tipo Monod a lo largo de todo el experimento coincide con el hecho que esta bacteria es conocida por ser la más importante en condiciones de baja concentración de Fe(II) (Pizarro et al. (1996)). Linealizando el crecimiento de esta cepa hasta las 504 hrs de experimentación se obtiene un μ_{\max} de $0,004 \text{ hr}^{-1}$, lo cual significa que *L. ferrooxidans* demora 173 hrs en duplicar su población, en las condiciones de cultivo ocupadas (Figura 28).

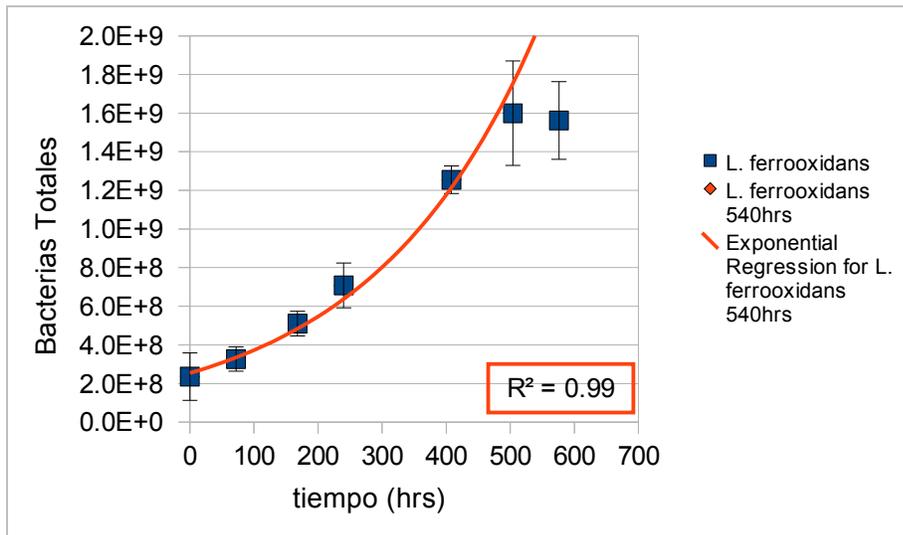


Figura 27: Crecimiento de *L. ferrooxidans*, regresión exponencial para el crecimiento hasta las 504 hrs del experimento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

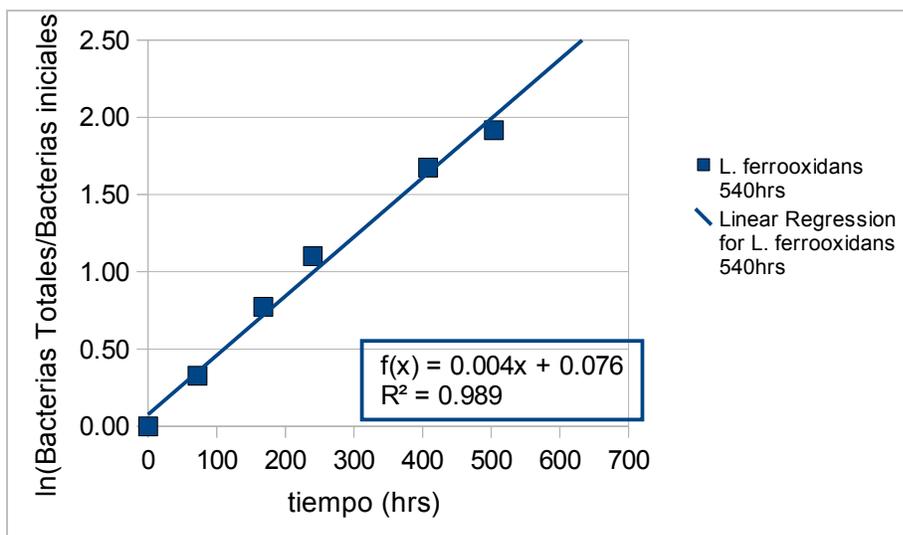


Figura 28: Linealización del crecimiento de *L. ferrooxidans* para las primeras 504 hrs

3.4.3 Crecimiento Celular en el mineral

Este experimento se realizó con el fin de determinar el comportamiento del cultivo que se adhiere al mineral, es decir, que lo lixivia por medio del mecanismo de contacto. Siguiendo el procedimiento explicado en la sección 2.4.5 se determinó el área promedio de las partículas, su radio y su volumen (Tabla 1) para luego determinar el área total disponible para la adherencia de las bacterias (Tabla 2), que es $4,5 \cdot 10^{10} \mu\text{m}^2$ correspondiente a los 0,25g de mineral agregados inicialmente.

Tabla 1: Área, radio y volumen de la partícula promedio de pirita

Partícula promedio		unidades
área círculo	9,3E+2	μm^2
radio esfera	1,7E+1	μm
volumen esfera	2,1E+4	μm^3
área esfera	3,7E+3	μm^2

Tabla 2: Propiedades físicas de la pirita y área total disponible para el crecimiento celular

Mineral matraz		unidades
masa	0,25	g
densidad	2,4	g/cm^3
vol total	1,04	cm^3
part totales	4,9E+7	0
área total	4,5E+10	μm^2

En la Figura 29 se observa una partícula de mineral de pirita teñido con DAPI, la cual ha sido colonizada por las bacterias del cultivo mixto utilizado en el experimento. En esta partícula se puede observar que las bacterias presentes miden alrededor de $1\mu\text{m}$. Además es posible ver que el recubrimiento celular de la partícula no es homogéneo, mostrándose algunas zonas altamente pobladas, mientras que en otras no se observan más que 2 o 3 bacterias.

Con respecto a la población total de bacterias asociadas al mineral, a las 72 hrs de experiencia se tiene un total de $8,23 \cdot 10^9$ células totales, mientras que a las 576 hrs solo se tienen $7,01 \cdot 10^9$ bacterias adheridas al mineral, lo cual se podría deber a una saturación de los sitios disponibles para la adherencia de las bacterias.

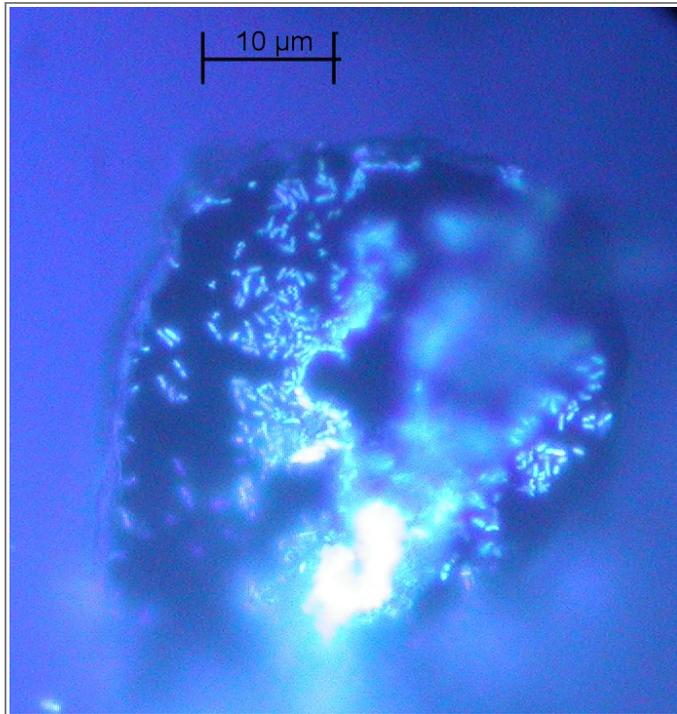


Figura 29: Partícula de mineral de pirita teñida con DAPI, colonizada con bacterias después de 240 hrs de experimentación.

Con respecto a la abundancia relativa en el mineral de las distintas especies, la cual está graficada en la Figura 30, es posible observar que entre las 72 hrs y las 576 hrs de experimentación la composición de las especies adheridas al mineral se mantiene constante. La especies más importantes fueron *At. ferrooxidans* y *At. thiooxidans*, con un 30% del total de bacterias adheridas al mineral aproximadamente, seguido por *L. ferrooxidans* con un 25%. En último lugar se encuentra la cepa *S. thermosulfidooxidans*, cuya abundancia apenas alcanza el 16%.

Es claro a partir de las desviaciones estándar de las abundancias en el mineral que la calidad de las mismas es muy inferior que a la calidad de la medición de las bacterias planctónicas. Esto se debe a la dificultad de determinar las bacterias totales y positivas en el mineral, ya que este resplandece al ser expuesto a la luz UV, tal como se ve en la Figura 31. sin embargo, esta medición sirve al menor para tener una idea de qué es lo que está sucediendo en el mineral.

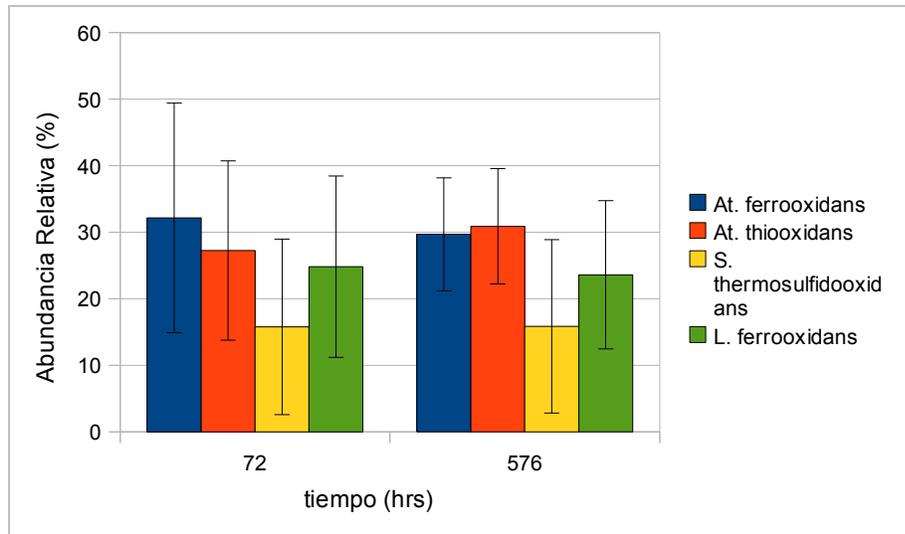


Figura 30: Porcentaje de abundancia en el mineral de las distintas cepas a las 72 hrs y a las 576 hrs de experimentación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

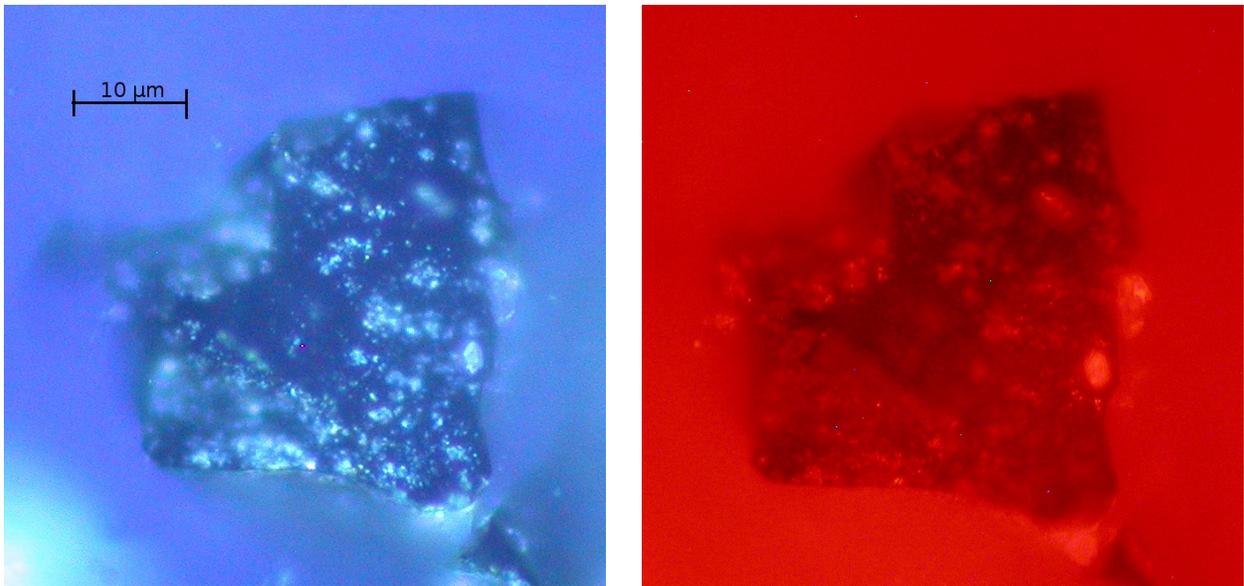


Figura 31: Análisis de la población bacteriana adherida al mineral a las 72 horas del experimento. A la izquierda se muestra la tinción con DAPI, y a la derecha la tinción con CARD-FISH para *At. ferrooxidans*

Capítulo 4 Discusión

4.1 Discusiones Parciales

En esta parte de la discusión se analizará cada resultado obtenido por separado, para después analizar los resultados de un modo más integrador en la discusión general.

4.1.1 Estudio de capacidad de adherencia a la pirita del cultivo de bacterias nativas.

La capacidad de adherencia de un cultivo cualquiera durante un proceso de biolixiviación es de vital importancia, ya que, tal como se explicó en la sección 1.2.2, existen dos métodos de biolixiviación: uno de contacto directo con el mineral y otro indirecto. El beneficio principal de la lixiviación por contacto es que los sulfuros son oxidados por las bacterias en la superficie del mineral, evitando que se acumule azufre elemental en la superficie del mismo, pasivándolo.

El resultado obtenido con el cultivo nativo utilizado en cuanto a su gran capacidad de adherencia (Figura 9) es un buen indicador de la eficiencia que estos microorganismos debieran tener al momento de biolixiviar la pirita. En base al resultado obtenido, es decir que el 90% de las células en solución se adhirieron al mineral, se esperaba obtener una alta disolución de la pirita, medida como el incremento del hierro total. Este resultado es equivalente al obtenido con este cultivo en estudios anteriores (Escobar, B., (2008)).

Además, este resultado diferencia al cultivo nativo utilizado de cultivos puros de *At. ferrooxidans* mantenidos en el laboratorio, el cual en estudios anteriores no superaba el 35% (Menadier, M., (2009)).

4.1.2 Estudio sobre la capacidad de adherencia al mineral de distintas cepas bacterianas.

El análisis de la población bacteriana del inóculo utilizado por medio de la técnica de CARD-FISH, presentado en la Figura 7, muestra una alta concentración inicial de *At. thiooxidans*, microorganismo que solo oxida compuestos de azufre reducido para obtener energía. Las bacterias capaces de oxidar tanto hierro como sulfuros (*At. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*) bordean el 20% de la población total, mientras que *L. ferrooxidans*, el cual solo oxida hierro, no alcanza a ser el 10% de las células presentes. El hecho que la abundancia relativa de *At. thiooxidans*, estuviese sobre el 50% coincide con estudios de poblaciones bacterianas en procesos de biolixiviación en condiciones de baja concentración de Fe(II) (Pizarro et al. (1996)), sin embargo la baja concentración de *L. ferrooxidans* no es coincidente, lo cual se podría

deber a que el ratio de Fe(III)/Fe(II) fuera mayor al que soporta esta bacteria.

Sabiendo que el cultivo mixto tiene una capacidad de adherencia del 90%, lo cual es un excelente indicador de la eficiencia esperada de estos microorganismos, se hace necesario saber cuáles cepas tienen una mayor adherencia al mineral. Sin duda llama la atención que todas las cepas tienen una adherencia sobre el 80%, lo cual nuevamente las distingue del cultivo de *At. ferrooxidans* puro mencionado con anterioridad. Dentro de la cepas estudiadas, hay 3 cuyas capacidades de adherencia se encuentran entre el 90% y el 95%. Estas son: *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*. Esto indicaría que estas bacterias serían capaces de biolixiviar el mineral por medio del mecanismo de contacto, generando el Fe(III) necesario para la lixiviación de la pirita y oxidando los compuestos de azufre reducido y azufre elemental a sulfato.

Con respecto a *S. thermosulfidooxidans*, llama la atención que sea la única cepa cuya adherencia al mineral sea menor al 90%, a pesar de su alta concentración en el inóculo inicial. Debido a esto se espera que *S. thermosulfidooxidans* participe más que las otras cepas del mecanismo de biolixiviación indirecto, generando Fe(III) y sulfato en la solución de biolixiviación.

4.1.3 Experimento de Biolixiviación, Comportamiento del pH y el Eh de la solución

El pH aumentó inicialmente, desde 1,79 hasta 2,05 durante las primeras 200 hrs del experimento, según lo mostrado en la Figura 10. Este consumo de los protones presentes en la solución traducido en un incremento del pH indica que la reacción de oxidación del Fe(II) es más importante que la oxidación de los compuestos de azufre reducido, lo cual se puede deber al hecho que el Fe(II) está disuelto en la solución debido a las condiciones iniciales impuestas, mientras que los compuestos reducidos de azufre solo se encuentran disponibles a medida que se lixivía la pirita.

Debido a que la oxidación de fierro es la reacción más importante al inicio del experimento, se esperaba que las bacterias fierrooxidantes presentaran el mayor crecimiento inicial, mientras que las azufreoxidantes mostraran un crecimiento menor.

Posterior al ajuste de pH, este se mantuvo constante alrededor de 1,5, mostrando una leve baja hacia el final del experimento. Este comportamiento indicaría un repunte de las bacterias azufreoxidantes y un crecimiento menor de aquellas con actividad fierrooxidante.

Con respecto al Eh, el cual se muestra en la Figura 11, su comportamiento inicial confirmó la oxidación bacteriana del Fe(II), expresado en el aumento desde 400mV hasta 700mV durante las primeras 200 hrs del experimento. La posterior mantención del potencial cercano a los 730mV indica que la mayoría del fierro en solución se encuentra en su máximo estado de oxidación, lo cual es provocado por la actividad de las bacterias fierrooxidantes, ya que se sabe que en ausencia de las mismas y con 2,4g/l de ión ferrico inicial en la solución de lixiviación de pirita el Eh no supera los 550mV (Menadier, M., (2009)). Estos resultados son coincidentes con los

obtenidos en un estudio anterior sobre la biolixiviación de pirita con el mismo cultivo mixto, lo que indicaría que las capacidades extractivas del cultivo se han mantenido a lo largo de un año (Escobar, B. (2008)).

4.1.4 Experimento de Biolixiviación, Comportamiento de los iones Fe(II) y Fe(III), oxidación del Fe(II) por la actividad bacteriana y lixiviación de la pirita medida en el aumento del hierro total.

El comportamiento del Fe(II) y Fe(III) en solución, mostrado en la Figura 12, confirma lo sugerido por el aumento inicial de pH y Eh, ya que durante las primeras 200hr del experimento el Fe(II) desaparece de la solución, mientras que el ion férrico comenzó a aumentar su concentración en el medio líquido de lixiviación. Esta rápida oxidación del ion ferroso se debe sin duda a la actividad de las bacterias ferrooxidantes presentes en el cultivo mixto utilizado (*At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*) ya que en ausencia de las mismas el tiempo de oxidación del Fe(II) es mucho mayor. (Menadier, M., (2009)) La importancia de la rápida aparición del ion férrico es que éste es el agente lixivante de la pirita, según lo mostrado en la Ecuación 1.

Durante el resto de la experiencia se observó un aumento de la concentración del Fe(III) y hierro total en solución, mientras que el Fe(II) se mantuvo siempre a muy bajas concentraciones. Este hierro total que aparece es producto de la lixiviación de la pirita, sin embargo el hierro extraído desde este mineral tiene estado de oxidación +2, tal como se muestra en la ecuación 1, y el hecho que aparezca en la solución como Fe(III) indica nuevamente la presencia y actividad de las bacterias ferrooxidantes.

El hecho que la oxidación de Fe(II), mostrado en la Figura 13, es decir, la aparición del producto del metabolismo bacteriano, se pueda separar en dos etapas según su velocidad (0,8 mg/hr durante las primeras 168hr y 0,18 mg/hr posteriormente) sugiere que el crecimiento inicial de las bacterias ferrooxidantes debiera ser muy pronunciado debido a la alta presencia de sustrato (un crecimiento con cinética de Monod) y a la alta velocidad de oxidación del Fe(II). Se esperaba que este crecimiento se frenara posterior a las 200 hrs del experimento, debido al agotamiento del Fe(II) agregado inicialmente, restringiéndose a la velocidad de la lixiviación férrica de la pirita.

Con respecto a la extracción de hierro desde el mineral (Figura 14), la lixiviación del 52,7% del hierro presente en la pirita es un excelente resultado al compararla con la extracción del mismo desde pirita lixiviada en similares condiciones utilizando un cultivo puro de *At. ferrooxidans*, donde se extrae el 27% del hierro agregado, o la lixiviación de pirita sin actividad bacteriana, donde solo se alcanza a extraer el 14% del mineral agregado en 600 hrs de experimentación (Menadier, M. (2009)). Los motivos por los cuales se observó este mejor rendimiento son variados. Por un lado, se está utilizando un cultivo nativo proveniente de un proceso de biolixiviación de una empresa minera, lo que implica que estos microorganismos estarían adaptados a obtener su energía a partir desde la disolución del mineral, a diferencia de cultivos puros del laboratorio, los cuales son mantenidos utilizando solo ion ferroso como fuente de energía en el medio

de cultivo. Además, el cultivo que se utilizó era un cultivo mixto, en el cual conviven microorganismos capaces de oxidar tanto Fe(II) como compuestos de azufre reducido. De este modo, la capa de azufre que se podría formar en la superficie de la pirita si solo se utilizaran bacterias ferrooxidantes es oxidada a sulfato por los microorganismos azufreoxidantes, evitando así la pasivación del mineral. Por último, el cultivo estudiado presentó una alta capacidad de adherencia, lo que permitió la biolixiviación de la pirita tanto por un mecanismo de contacto como por medio del mecanismo indirecto, generando el agente lixivante (ion férrico) en la interfase entre el mineral y las células y en la solución de biolixiviación. Además, gracias al mecanismo de contacto se facilita la oxidación de los compuestos de azufre reducidos, evitando la pasivación del mineral por la acumulación del azufre elemental en su superficie.

Un último punto a discutir sobre el comportamiento del fierro durante el experimento es la precipitación del mismo, también mostrado en la Figura 14. La generación de precipitados de fierro fue bastante baja (solo el 3,7% del fierro total en solución al final del experimento), lo cual es un resultado extremadamente positivo, debido a que un exceso de hidróxidos produce una pasivación del mineral al situarse en la superficie del mismo, dificultando tanto la lixiviación química como la catalizada por bacterias. Las posibles razones de esta baja precipitación son por un lado la temperatura utilizada (solo 30°C), ya que altas temperaturas aceleran la reacción de precipitación, y el bajo pH alcanzado hacia el final del experimento, el cual fue cercano a 1,5, debido a la actividad azufreoxidante del cultivo mixto.

4.1.5 Experimento de Biolixiviación, Lixiviación de la pirita medida como la extracción de azufre

La extracción de azufre y la oxidación del mismo a sulfato desde el mineral de pirita utilizado en estos experimentos, al igual que la extracción de fierro, fue muy eficiente, y se muestra en la Figura 15. La velocidad observada de extracción del sulfuro fue de 0,09mg/hr, siendo ligeramente menor a la esperada (0,011mg/hr) según la velocidad experimental de extracción de fierro. De este mismo modo, la extracción final de azufre fue ligeramente menor a la esperada teóricamente, alcanzándose a extraer 52,9mg en vez de los 70mg esperados.

Este comportamiento tiene dos posibles explicaciones: la primera es que el azufre extraído desde la pirita se encuentra en un estado de oxidación intermedio, por lo cual no puede ser medido como sulfato, es decir, podría estar como $S_2O_3^{-2}$, $S_4O_6^{-2}$ o S^8 , según lo sugerido para las distintas etapas del mecanismo de biolixiviación del tiosulfato (Schippers et al. (1996)), (Sand, W. (2003)), mostrado en la Figura 1. Una segunda explicación sería que la capacidad del cultivo estudiado de oxidar azufre sea menor que su capacidad de oxidar el ion ferroso, y los compuestos de azufre reducido liberados desde la pirita se estén acumulando como azufre elemental en la superficie del mineral, lo cual provocaría la pasivación del mismo, tal como se señaló anteriormente. Para poder saber cual de las posibles explicaciones presentadas es más probable, es necesario manejar la información acerca de la abundancia relativa en el cultivo de las bacterias azufreoxidantes, en particular de *At. Thiooxidans*, ya que esta

bacteria se caracteriza porque solo puede obtener energía por medio de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. Si esta bacteria representara una baja proporción de la población total, entonces sería más probable la segunda explicación mientras que si *At. thiooxidans* es muy abundante, entonces la capacidad oxidativa de azufre del cultivo debiera ser alta y la causa de que el rendimiento fuera menor al esperado sería la primera explicación. Además, es necesario considerar que la extracción de fierro se vería afectada negativamente en caso que el azufre se estuviera acumulando en la superficie del mineral, lo cual no sucedió, por lo que la primera explicación sería más probable.

4.1.6 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH, Crecimiento Celular en solución

Para explicar y analizar el crecimiento celular en solución se propusieron 2 posibles ajustes al valor medido experimentalmente, para compensar la perturbación realizada al sistema al momento de tomar la muestra para los distintos análisis. Las correcciones consistieron básicamente en reincorporar las células tomadas en los muestreos anteriores (ajuste 1) y agregar el posible crecimiento de estas células (ajuste 2). Ambos ajustes se muestran en la Figura 16. Debido a la dificultad para poder determinar cuánto habrían crecido estas células eliminadas y que el hecho de suponer que éstas habrían tenido el mismo crecimiento presentado por el cultivo monitoreado es una consideración demasiado fuerte, se optó por utilizar la primera corrección propuesta.

Es importante destacar que el motivo por el cual se decidió sobre cuál corrección utilizar era tan importante fue la gran diferencia en el crecimiento final obtenido para ambas correcciones con respecto al valor medido, diferencias que fueron de un 39% de crecimiento celular extra para la corrección 1 y un 89% de mayor crecimiento para la corrección 2. La causa principal de esta enorme diferencia entre las distintas correcciones es que el volumen tomado para la muestra era de un 8% del volumen total, lo cual alteró significativamente el resultado obtenido del crecimiento celular. Esta aseveración se comprueba al suponer que la muestra es de solo un 2%, lo cual provoca que estas diferencias se reduzcan a un 9% y a un 15% de crecimiento extra respectivamente, aún más, si el volumen de la muestra hubiera sido de solo 1% del volumen total, las diferencias solo habrían sido de un 5% y un 7%.

La razón por la cual fue necesario tomar un volumen tan grande de muestra era la medición del sulfato en solución (análisis para el cual se requería de al menos 3 ml de solución de lixiviación que contenía 50 ml en total, según lo explicado en la sección 2.2.3). Para evitar generar esta perturbación tan importante en el futuro se sugiere lo siguiente:

- utilizar un volumen total de 100 ml de medio de cultivo
- tomar una muestra de solo 1ml (lo que equivale al 1% del volumen total) para realizar las mediciones de fierro, pH y Eh

- medir sulfato solo a aquellos matraces que se eliminarán para hacer los análisis de CARD-FISH y fierro precipitado.
- Trabajar en triplicado para que los promedios de los valores medidos de sulfato sean significativos estadísticamente.

Para el análisis del crecimiento celular a estudiar (que corresponde al primer ajuste propuesto, Figura 17) se realizó una regresión exponencial solo a los 5 primeros puntos, es decir a las primeras 300 hrs de experimentación, obteniéndose un R^2 con valor 1. A partir de esto se desprende que el cultivo mixto en su conjunto crece de manera exponencial solo durante 300 hrs con una velocidad máxima de crecimiento, de $3,50 * 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$, para posteriormente desacelerar su crecimiento.

Los motivos más probables por los cuales se podría haber frenado el desarrollo celular son una posible acumulación de compuestos orgánicos, los cuales son tóxicos para la mayoría de los microorganismos biolixivantes, y el agotamiento del Fe(II) en solución agregado inicialmente, lo cual disminuiría el sustrato disponible a lo que las bacterias sean capaces de biolixiviar desde el mineral, restringiendo el crecimiento celular a la velocidad de la reacción de lixiviación de pirita. Sin embargo, respecto a la acumulación de compuestos orgánicos, esta podría descartarse, ya que en estudios de bacterias presentes en el mineral de baja ley utilizado para mantener el cultivo se demuestra la presencia de *Ferroplasma acidiphilum* (Remonsellez, F. (2009)), la cual es un árquea biolixivante, capaz de crecer de manera quimiolitotrofa y heterótrofa, es decir, también es capaz de utilizar compuestos orgánicos como fuente de energía (Dopson, M. (2004)).

4.1.7 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH, Análisis de la población bacteriana en solución mediante CARD-FISH

El análisis de las variaciones de las poblaciones de las distintas cepas bacterianas a estudiar comenzó por determinar la abundancia relativa de cada una de ellas para los distintos tiempos estudiados (Figura 19). Tal como se comentó en los resultados, es posible apreciar 2 etapas distintas. En la primera etapa se observa un movimiento muy fuerte de las poblaciones, en el que aquellas bacterias ferrooxidantes con una alta capacidad de adherencia al mineral (*At. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*) aumentan drásticamente su participación en la población total, mientras que las otras (*At. thiooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*) disminuyen su abundancia. La explicación para esto sería que al cambiar estas bacterias a un medio en donde hay una alta concentración de Fe(II) en solución, el crecimiento tanto de *At. ferrooxidans* como de *L. ferrooxidans* se ve muy favorecido ya que son capaces de obtener su sustrato tanto de la solución como del mineral. Por el contrario, *At. thiooxidans* solo puede obtener su sustrato a partir de la biolixiviación de la pirita, lo cual solo comienza a suceder en el momento en que hay suficiente Fe(III) en solución, por lo que inicialmente no debiera haber un crecimiento de esta cepa. Por último, *S. thermosulfidooxidans*, a pesar de ser capaz de oxidar fierro para obtener energía, debido a que su temperatura de crecimiento óptima está sobre los 45°C y a que su capacidad de adherencia es menor

que las otras cepas, no podrá desarrollarse tan rápido como las otras fierrooxidantes, por lo que esta “desaparición” se debería más al crecimiento de las otras cepas mas que a la muerte de *S. thermosulfidooxidans*. En la segunda etapa se observa la estabilización de la abundancia relativas de las distintas cepas, la cual es sustancialmente distinta de la composición del inóculo inicial, ya que la especie más abundante es *At. ferrooxidans*, la cual aumenta desde un 17% hasta un 36% de la población, le sigue *At. thiooxidans*, el cual disminuye desde el 50% hasta el 30%, luego *S. thermosulfidooxidans* cuya abundancia inicial era de un 20% y hacia el final del experimento decreció a un 15% y en último lugar *L. ferrooxidans*, el cual aumentó desde un 8% en el inóculo hasta un 13% en la solución de biolixiviación a las 576 hrs de experimento.

Con respecto a las poblaciones de cada cepa a lo largo del experimento, llama la atención el rápido crecimiento inicial de *At. ferrooxidans* el cual disminuye alrededor de las 200 hrs de experimentación, coincidentemente con la desaparición del Fe(II) disuelto en solución, lo que implicaría que su crecimiento se verá restringido a la velocidad de lixiviación de la pirita. *At. thiooxidans* muestra una leve desaparición inicial, la cual se cree que fue causada por la dificultad para acceder a los compuestos reducidos de azufre para obtener energía durante las primeras horas del experimento, sin embargo rápidamente se recuperó, siendo a partir de las primeras 72 hrs la segunda cepa más abundante en solución, lo cual indicaría que el cultivo mixto utilizado tendría una buena capacidad de oxidar azufre. Además, el hecho que su crecimiento fuera exponencial a lo largo de todo el experimento fue sorprendente, y se podría explicar por la posible presencia de algún compuesto reducido de azufre que fuera soluble, y por lo tanto estuviera biodisponible. *S. thermosulfidooxidans* mantiene su población constante durante las primeras 200 hrs, lo cual se interpreta como un estado de retraso del crecimiento, lo cual puede suceder en un cultivo batch debido a la necesidad de adaptarse a una nueva condición de cultivo. Posteriormente, la población de esta cepa comienza a crecer exponencialmente, mostrando una posible estabilización hacia el final de la experiencia. Por último, *L. ferrooxidans* muestra desde el primer momento un rápido crecimiento, el cual se mantiene hasta las 504 hrs de la experiencia, para después desacelerase. Este comportamiento coincide con el hecho que esta bacteria es capaz de crecer a bajas concentraciones de Fe(II) debido a su alta afinidad por el mismo y a altas concentraciones de Fe(III), ya que la inhibición de su crecimiento debido a la presencia de este ion es menor a la de *At. ferrooxidans* (Rawlings et al. (1999)). De este modo, los que presentan el mayor crecimiento, evaluando cualitativamente, son *At. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*.

Sobre los parámetros de crecimiento determinados para las distintas cepas, se seleccionaron los intervalos de tiempo cuya regresión exponencial entregaba el mayor valor de R^2 . De este modo se determinó que la cepa que presentaba el mayor μ_{max} fue *At. ferrooxidans*, cuyo valor fue de $0,01 \text{ hr}^{-1}$, velocidad que es 3,3 veces la máxima velocidad de crecimiento del cultivo en su conjunto. Le sigue el μ_{max} de *L. ferrooxidans*, que tomó un valor de $0,004 \text{ hr}^{-1}$, la cual es 1,3 veces la velocidad del cultivo. Las otras dos cepas (*At. thiooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*) presentaron un μ_{max} de $0,002 \text{ hr}^{-1}$ y $0,003 \text{ hr}^{-1}$, respectivamente.

4.1.8 Análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH, Crecimiento Celular en el mineral

El comportamiento de las bacterias asociadas al mineral muestra varias características interesantes. En primer lugar, y tal como se observa en la Figura 29, la colonización del mineral no es homogénea, sino más bien bastante heterogénea, observándose zonas altamente pobladas y otras completamente desiertas. Esto puede deberse a que la superficie de las partículas de mineral no es pareja sino que presenta pequeñas zonas en donde la estructura cristalina del mineral facilita la biolixiviación del mismo (Gehrke et al. (1998)), (Gehrke et al. (2001)), (Sand, W. (2003)), por lo que es lógico que la mayor colonización bacteriana se produzca en aquellas zonas de la superficie donde los nutrientes están más disponibles.

Otro aspecto que llama la atención de los resultados obtenidos es que las células totales se mantendría más o menos constante entre la primera medición correspondiente al mineral a las 72 hrs y la segunda medición realizada al mineral después de 576 hrs de biolixiviación. Esto podría deberse a que, tal como se señaló anteriormente, no toda la superficie del mineral estaba disponible para el crecimiento bacteriano, por lo que podría producirse una saturación de los sitios disponibles para la adhesión de las bacterias. Sin embargo, para confirmar o descartar esto sería necesario realizar un recuento de las bacterias totales al mineral en otros momentos del experimento, lo cual no fue posible realizar debido a un prematuro agotamiento de uno de los reactivos necesario para llevar a cabo la técnica.

Por último, acerca de la distribución de la población bacteriana en el mineral a lo largo del experimento es interesante destacar que la bacteria menos abundante en ambas evaluaciones fue *S. thermosulfidooxidans*, la cual se mantiene cercana al 15% del total de los microorganismos presentes, lo cual coincide con lo determinado por medio del estudio de adherencia, en el cual esta bacteria fue la que presentó la menor capacidad de adherencia a la pirita. Además, tanto a las 72 hrs del experimento como a las 576 hrs se observa en el mineral una alta concentración de *At. thiooxidans*, alrededor de un 30%, lo que descartaría una baja capacidad de oxidación de azufre del cultivo propuesta en discusiones anteriores, ya que tanto en la solución de biolixiviación como en el mineral las bacterias con capacidad de oxidar azufre son una porción considerable del total de bacterias presentes. En último lugar es interesante destacar la alta concentración de *L. ferrooxidans* observada en el mineral, la cual fue cercana a un 24%, mientras que en la solución nunca superó el 15% de las bacterias totales, lo cual indicaría que su importancia en el proceso de biolixiviación de la pirita es más importante que lo que se podría esperar observando solamente la solución.

4.1.9 Sobre la utilización de la técnica de CARD-FISH

La identificación de microorganismos utilizando esta técnica es muy rápida, ya que en un solo día es posible determinar la presencia y abundancia de la cantidad de cuantos microorganismos se desee. Sin embargo, con la finalidad de obtener resultados de buena calidad es imperioso tener la cantidad adecuada de bacterias por campo, que

según esta experiencia sería del orden de 100 células por campo, es decir de $1,9 \times 10^7$ cel por filtro. Considerando que esta técnica consume tanto recursos como un tiempo considerables, es importante comprobar antes de iniciar el método de CARD-FISH que se cuenta con la concentración adecuada de células en el filtro que se va a evaluar, para lo cual solo es necesario teñir una pequeña sección del mismo con DAPI y evaluarlo al microscopio de epifluorescencia.

En el caso de el tratamiento de mineral, la calidad del resultado disminuye debido a la dificultad de cuantificar las células totales, ya que el mineral fluoresce al ser irradiado con luz UV. Por lo mismo sería necesario hacer un mayor número de recuentos, para que el valor promedio obtenido sea más confiable.

4.2 Discusiones Generales

El cultivo mixto proveniente de Minera Escondida que fue utilizado en este estudio presentó varias características interesantes. En primer lugar su alta capacidad de adherencia al mineral de pirita, lo cual es un buen indicador de su capacidad extractiva, ya que esto implicaría que la biolixiviación podría ocurrir tanto por medio del mecanismo de contacto al mineral como por el mecanismo indirecto. Dentro de las especies que se encontraban presentes en este cultivo fue *At. ferrooxidans* quien presentó una mayor adherencia al mineral, mientras que *S. thermosulfidooxidans* fue la cepa con menor porcentaje de células adheridas. Sin embargo, todas las cepas estudiadas muestran una mejor adherencia a la pirita que cultivos puros de *At. ferrooxidans* mantenidos en el laboratorio analizados en estudios anteriores (Menadier, M. (2009)).

Con respecto a la capacidad del cultivo mixto estudiado para biolixiviar el mineral, ésta fue bastante alta, logrando recuperar el 52,7% del hierro agregado en el mineral, a una velocidad de 0,09mg/hr. El cultivo además presenta una alta velocidad de oxidación del Fe(II), llegando a ser de 0,8 mg/hr cuando éste se encuentra disuelto en solución, y de 0,18 mg/hr cuando se oxida el Fe(II) proveniente de la pirita. El azufre extraído también es bastante alto, llegando a ser 52,9 mg, ligeramente inferior a los 70 mg esperados, debido a que el azufre se encontraría en algún estado de oxidación intermedio según el mecanismo del tiosulfato (Schippers et al. (1999)), (Sand et al (2001)), (Sand, W. (2003)). Estos buenos resultados, en comparación con los obtenidos con cultivos puros mantenidos en el laboratorio, son coincidentes con la alta capacidad de adherencia del cultivo por los motivos expuestos anteriormente, con el hecho que por ser un cultivo nativo está adaptado a obtener sus nutrientes desde el mineral en vez de utilizar solo el Fe(II) disuelto en solución y por último debido a que en el cultivo conviven distintas bacterias cuyas actividades hierro y azufreoxidantes se complementan, permitiendo mantener el pH suficientemente bajo gracias a la oxidación del azufre evitando así la pasivación del mineral por la precipitación de hidróxidos de hierro y la acumulación de azufre elemental en la superficie del mineral.

El cultivo además presentó un crecimiento en la solución de biolixiviación de carácter exponencial durante las primeras 300 horas del experimento, con una velocidad máxima de $3,50 * 10^{-3} \text{hr}^{-1}$. Posterior a esto el crecimiento del cultivo se desaceleró levemente, lo cual es muy común en los cultivos batch. Esta desaceleración usualmente se debe a acumulación de sustancias tóxicas para el cultivo o el consumo del sustrato disponible. En el caso de las bacterias biolixiviantes, los compuestos orgánicos liberados por el metabolismo o al morir los microorganismos les son tóxicos, y estos se pueden acumular a medida que avanza el experimento. Sin embargo, en estudios de la población microbiológica presente en mineral de baja ley proveniente de Minera Escondida se encontraron bacterias heterotróficas (Remonsellez, F. (2009)), las cuales también deberían estar presentes en el cultivo mixto utilizado, por lo que la acumulación de compuestos orgánicos no deberían ser un problema en este estudio. De este modo la razón por la cual se desaceleró el crecimiento debería ser el agotamiento del sustrato principal, que es en ion Fe(II). Considerando que a las 168

horas de experiencia ya se ha consumido gran parte del Fe(II) agregado inicialmente, el sustrato disponible se reduce a lo que se lixivia desde el mineral, por lo que la desaceleración del cultivo es altamente esperable.

Por medio de la técnica de CARD-FISH fue posible determinar la abundancia relativa de las 4 cepas estudiadas, *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *L. ferrooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*, a lo largo del experimento, y así determinar la velocidad máxima de crecimiento para cada una de ellas. La cepa que presentó el mayor μ_{\max} fue *At. ferrooxidans*, cuyo velocidad de crecimiento fue de $0,01 \text{ hr}^{-1}$, alcanzando una población final de $4,5 \cdot 10^9$ de bacterias, lo que corresponde al 36% de la población total. Le sigue el μ_{\max} de *L. ferrooxidans*, que tomó un valor de $0,004 \text{ hr}^{-1}$, logrando llegar a los $1,6 \cdot 10^9$ células, el 13% de las bacterias totales hacia el final de la experiencia. Las otras dos cepas estudiadas (*At. thiooxidans* y *S. thermosulfidooxidans*) presentaron un μ_{\max} de $0,002 \text{ hr}^{-1}$ y $0,003 \text{ hr}^{-1}$ respectivamente, alcanzando los $3,8 \cdot 10^9$ y $1,9 \cdot 10^9$ células totales, respectivamente, lo cual corresponde al 30% y al 15% de la población total. Es claro que aquellas bacterias con actividad fierrooxidante (*At. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*) son las que más crecieron, lo cual se debe seguramente a la presencia de Fe(II) disuelto en solución al inicio del experimento, mientras que la bacteria que solo tiene actividad azufreoxidante (*At. thiooxidans*) presentó un crecimiento mucho menor, como consecuencia de una menor disponibilidad de sustrato. Por último, la cepa *S. thermosulfidooxidans* creció más lento a pesar de tener la capacidad de oxidar fierro, lo cual es causado por la temperatura de cultivo, ya que esta bacteria es termófila moderada, siendo su temperatura óptima de crecimiento es 45°C .

Con respecto al crecimiento bacteriano en el mineral, se observó que la colonización de su superficie no era homogénea, lo cual se debe a que las imperfecciones en el cristal facilitan la biolixiviación de algunas zonas de la partícula, y por lo tanto distribuyen el crecimiento bacteriano en función de esto (Gehrke et al. (1998)), (Gehrke et al. (2001)), (Sand, W. (2003)). La distribución de las cepas estudiadas en el mineral de pirita mostró que la cepa menos abundante fue *S. thermosulfidooxidans*, de manera concordante con los estudios de adherencia. Tanto *At. ferrooxidans* como *At. thiooxidans* se mantuvieron cercanos al 30%, siendo las cepas más abundantes en el mineral, lo cual coincide con la alta capacidad del cultivo para la extracción de fierro y azufre desde la pirita.

Considerando que presenta la mejor capacidad de adherencia a la pirita, el mayor crecimiento en solución a lo largo del experimento y es la bacteria más abundante en el mineral, *At. ferrooxidans* debería ser la bacteria más eficiente en el proceso de biolixiviar la pirita. El segundo lugar en eficiencia sería para *At. thiooxidans*, ya que tiene una alta capacidad de adherencia y a que es el segundo más abundante tanto en solución como en el mineral. *L. ferrooxidans* ocuparía el tercer lugar tomando en cuenta que es la tercera especie bacteriana en adherencia y abundancia en el mineral, y a pesar de ser la menos abundante en la solución, es la que tiene el segundo mayor crecimiento. En último lugar queda *S. thermosulfidooxidans* ya que su crecimiento es bajo, al igual que su capacidad de adherencia y su abundancia relativa en el mineral, lo cual se debe seguramente a que el experimento no se realizó en su temperatura óptima de crecimiento (45°C).

Por último, la utilización de la técnica de identificación molecular CARD-FISH fue muy útil y práctica en la evaluación de la dinámica de las distintas poblaciones bacterianas estudiadas. Tomando en cuenta que solo requiere de un día para completarla y que se necesitan concentraciones de células relativamente bajas (en comparación con otras técnicas moleculares como T-FRLP), permitió un monitoreo eficiente y rápido de los microorganismos presentes tanto de la solución de biolixiviación como del mineral.

Capítulo 5 Conclusiones

Con respecto a los resultados obtenidos y a las discusiones realizadas en el presente estudio, se puede concluir lo siguiente:

- Fue posible implementar la técnica de identificación molecular CARD-FISH para microorganismos participantes en el proceso de biolixiviación de pirita, tanto para las bacterias planctónicas como para aquellas adheridas a la superficie del mineral
- Por medio de la técnica de CARD-FISH fue posible determinar aquellas bacterias con mayor capacidad de adherencia a la pirita, evaluando las abundancias relativas de cada cepa estudiada en el inóculo antes del contacto con la pirita y 120 min posterior al contacto inicial. Esta bacteria fue *At. ferrooxidans*, con una capacidad de adherencia del 94%
- Utilizando la técnica de CARD-FISH se determinaron las máximas velocidades de crecimiento en solución, μ_{\max} , para las cepas estudiadas y sus abundancias relativas en la solución a lo largo de toda la experiencia, además de las abundancias relativas en el mineral al comienzo y al final de la experiencia, pudiendo establecer que *At. ferrooxidans* fue la cepa nativas más eficientes en la biolixiviación de la pirita por mostrar el mayor crecimiento máximo ($0,01 \text{ hr}^{-1}$) y ser la cepa más abundante hacia el final de la experiencia, representando el 36% de la población total.
- Se estableció una relación entre de las capacidades de adherencia de las distintas cepas estudiadas y sus respectivas eficiencias en la biolixiación de una muestra de pirita pura, concluyéndose que la bacterias con mayor capacidad de adherencia (*At. ferrooxidans*) era también la que presentaba el mayor crecimiento tanto en el mineral como en la solución.
- Por medio de todo lo anterior se concluye que se cumplió con el objetivo principal de este trabajo, que era comprender mejor la dinámica de las poblaciones bacterianas en el proceso de biolixiviación de la pirita.

Capítulo 6 Recomendaciones

En base al estudio aquí presentado se sugieren las siguientes recomendaciones para futuros estudios:

- Continuar con la utilización de la técnica de identificación molecular de microorganismos CARD-FISH para evaluar las abundancias relativas de las bacterias presentes en los procesos de biolixiviación, debido a que esta técnica solo requiere de un día de trabajo por muestra tomada y no es necesario concentrar las muestras, a diferencia de otras técnicas moleculares de identificación.
- Utilizando esta técnica, estudiar la dinámica de las poblaciones en procesos de biolixiviación cambiando las condiciones de cultivo, como pH inicial y/o concentración de Fe(II) inicial, para poder determinar que condiciones favorecen el desarrollo y crecimiento de las distintas cepas.

Capítulo 7 Bibliografía

- Bacelar-Nicolau, P., Barie Johnson, D., (1999), "Leaching of Pyrite by Acidophilic Heterotrophic Iron-Oxidizing Bacteria in Pure and Mixed Cultures", *Applied and Environmental Microbiology*, 65:585–590
- Braddock, J., Luong, H.V., Brown, E.J., (1984), "Growth Kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* Isolated from Arsenic Mine Drainage", *Applied and Environmental Microbiology*, 48:48-55
- Brierley, J.A., Brierley, C.L., (1986), "Microbial mining using thermophilic microorganisms", *General, Molecular and Applied Microbiology*, :279
- Brierley, J.A., Brierley, C.L., (2001), "Present and future of commercial applications of biohydrometallurgy", *Hydrometallurgy*, 59:233–239
- Bustos, Paola Karina, (2005), "Identificación de bacterias hierrooxidantes en procesos de biolixiviación mediante técnicas moleculares", *Memoria de Ingeniería Civil en Biotecnología, Facultad de ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.*
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Hind, A., Bowman, J., Bond, P., (2004), "Characterization of *Ferroplasma* Isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., Extreme Acidophiles from Acid Mine Drainage and Industrial Bioleaching Environments ", *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2079-2088
- Ehrlich H, (2001), "Past, present and future of biohydrometallurgy", *Hydrometallurgy*, 59:127–134
- Escobar, B., (2008), "Biolixiviación de piritas utilizando bacterias nativas de Minera Escondida", *Informe de Investigación para Minera Escondida.*
- Galleguillos, P., Remonsellez, F., Galleguillos, F., Guiliani, N., Castillo, D., Demergasso, C., (2008), "Identification of differentially expressed genes in an industrial bioleaching heap processing low-grade copper sulphide ore elucidated by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction", *Hydrometallurgy*, 94:148–154
- Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W., (2001), "The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*—a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology", *Water Science Technology*, 43:159–167
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W., (1998), "Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching", *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2743–2747
- Hansford, G.S., Vargas, T., (2001), "Chemical and electrochemical basis of bioleaching processes", *Hydrometallurgy*, 59:135–145

- Holker, K., (2007), "Cuantificación de bacterias en procesos de biolixiviación mediante NMP-PCR", Memoria de Ingeniería Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.
- Jones, C.A., Kelly, D.P., (1983), "Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: Influence of product and substrate inhibition", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 33:241-261
- Lacey, D.T., Lawson, F., (1970), "Kinetics of the liquid-phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*", *Biotechnology and Bioengineering*, 12:29-50
- Menadier, M. (2009): "Biolixiviación de piritas por *At. ferrooxidans* y cepas Nativas", Memoria de Ingeniería Civil en Biotecnología y Química, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.
- Morales, Gabriela, (2006) "Estimación de la biodiversidad bacteriana presente en procesos de biolixiviación mediante el análisis del DNA", Memoria de Ingeniería Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.
- Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N., Saiki, H., (2002), "Anaerobic respiration using Fe³⁺, S₀, and H₂ in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*", *Journal of Bacteriology*, 184:2081–2087
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R., (2002), "Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3094–3101
- Pizarro, J., Jedlicki, E., Orellana, O., Romero J., Espejo, R., (1996), "Bacterial Populations in Samples of Bioleached Copper Ore as Revealed by Analysis of DNA Obtained before and after Cultivation", *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1323–1328
- Pradhan, N., Nathsarma, K.C., Srinivasa Rao, K., Sukla, L.B., Mishra, B.K., (2008), "Heap bioleaching of chalcopyrite: A review", *Minerals Engineering*, 21:355–365
- Pronk, J.T., de Bruyn, J.C., Bos, P., Kuenen, J.G., (1992), "Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*", *Applied and Environmental Microbiology*, 58:2227–2230
- Rawlings, D.(1997), "Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes", Springer, capítulo 3.
- Rawlings, D. E., Tributsch, H., Hansford, G. S., (1999), "Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores", *Microbiology*, 145:5-13
- Remonsellez, F., Galleguillos, F., Moreno-Paz, M., Parro, V., Acosta, M., Demergasso, C., (2009), "Dynamic of active microorganisms inhabiting a bioleaching industrial heap of low-

grade copper sulfide ore monitored by real-time PCR and oligonucleotide prokaryotic acidophile microarray", *Microbial Biotechnology*, 2:613–624

- 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
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P-G., Schippers, A., (2001), "(Bio)chemistry of bacterial leaching—direct vs indirect bioleaching", *Hydrometallurgy*, 59:159–175
- Schippers, A., Jozsa, P-G., Sand, W. , (1996), "Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite", *Applied Environmental Microbiology*, 62:3424–3431
- Schippers, A., Rohwerder, T., Sand, W., (1999), "Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal", *Applied Microbiological Biotechnology*, 52:104–110
- Tributsch, H., (2001), "Direct versus indirect bioleaching", *Hydrometallurgy*, 59:177-185
- Vasquez, M., Espejo, R., (1997), "Chemolithotrophic bacteria in copper ores leached at high sulfuric acid concentration", *Applied Environmental Microbiology*, 63:332-334
- Xingyu, L., Rongbo, S., Bowei, C., Biao, W., Jiankang, W., (2009), "Bacterial community structure change during pyrite bioleaching process: Effect of pH and aeration", *Hydrometallurgy*, 95:267–272

Capítulo 8 Anexos

8.1 Datos Experimento de Adherencia

Min	Experimento A	Experimento B	células totales en solución	células en solución [millones]	% células adheridas
0	1,00E+8	1,20E+8	2,75E+9	2750	0
15	6,00E+7	7,00E+7	1,63E+9	1625	40,91
30	4,00E+7	4,00E+7	1,00E+9	1000	63,64
45	3,00E+7	2,00E+7	6,25E+8	625	77,27
60	2,00E+7	2,00E+7	5,00E+8	500	81,82
90	1,00E+7	1,00E+7	2,50E+8	250	90,91
120	1,00E+7	1,00E+7	2,50E+8	250	90,91

8.2 Datos CARD-FISH de Experimento de Adherencia

Tabla 4: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para *At. Ferrooxidans*

	Tiempo	+	Tot	%		% Prom	Cel Tot	% Sol	% Min
Ac. ferrooxidans	0	3	42	7,1	Directo	20,9	5,7E+8	100,0	0,0
		2	8	25,0	Normalizado	18,1	5,0E+8	100,0	0,0
		2	10	20,0					
		3	8	37,5					
	12	81	14,8						
	120	8	77	10,4	Directo	12,0	3,0E+7	5,2	94,8
		20	125	16,0	Normalizado	11,2	2,8E+7	5,6	94,4
		13	137	9,5					
18		33	54,5						

Tabla 5: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para *At. Thiooxidans*

Ac. thiooxidans	Tiempo	+	Tot	%		% Prom	Cel Tot	% Sol	% Min	
	0	Directo	35	76	46,1		60,3	1,7E+9	100,0	0,0
47			90	52,2						
21			26	80,8	Normalizado	52,1	1,4E+9	100,0	0,0	
36			58	62,1						
120		Directo	18	40	45,0		51,0	1,3E+8	22,2	92,3
			21	43	48,8					
		Normalizado	12	24	50,0		47,6	1,2E+8	8,3	91,7
			12	29	41,4					
		16	23	69,6						

Tabla 6: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para *S.thermosulfidooxidans*

S. thermosulfidooxidans	Tiempo	+	Tot	%		% Prom	Cel Tot	% Sol	% Min
	0	Directo	11	44	25,0		25,0	6,9E+8	100,0
8			22	36,4					
Normalizado		9	49	18,4		21,6	5,9E+8	100,0	0,0
		7	32	21,9					
		10	43	23,3					
120	Directo	9	55	16,4		35,8	8,9E+7	13,0	87,0
		12	36	33,3					
	Normalizado	11	42	26,2		33,4	8,4E+7	14,1	85,9
		28	47	59,6					
		10	23	43,5					

Tabla 7: Datos abundancia relativa determinada por CARD-FISH de la solución a los 0 min y a los 120 min de contacto con el mineral para *L. ferrooxidans*

L. ferrooxidans	Tiempo	+	Tot	%		% Prom	Cel Tot	% Sol	% Min
	0	Directo	1	22	4,5		9,6	2,6E+8	100,0
5			34	14,7					
Normalizado		3	21	14,3		8,3	2,3E+8	100,0	0,0
		1	22	4,5					
		3	31	9,7					
		3	36	8,3	Directo	8,3	2,1E+7	7,9	92,1
120	Normalizado	1	0,0						
		1	0,0		7,8	1,9E+7	8,6	91,4	
		1	0,0						

8.3 Datos Experimento de Biolixiviación

Tabla 8: Datos pH del experimento de biolixiviación

Matraz\Horas	0	72	168	240	336	408	504	576
1A	1,79	2,03						
1B	1,79	2,79						
2A	1,79	1,99	2,02					
2B	1,79	2,00	2,02					
3A	1,79	2,00	2,01	1,43				
3B	1,80	1,98	2,02	1,45				
4A	1,79	2,55	2,00	1,50	1,42			
4B	1,80	1,98	1,99	1,46	1,46			
5A	1,79	1,97	2,01	1,42	1,43	1,47		
5B	1,80	1,92	2,03	1,53	1,49	1,52		
6A	1,79	1,95	2,01	1,44	1,45	1,51	1,45	
6B	1,79	2,00	2,01	1,44	1,48	1,48	1,44	
7A	1,79	1,94	2,04	1,49	1,52	1,54	1,52	1,51
7B	1,80	1,98	1,99	1,49	1,48	1,48	1,44	1,42
Promedio	1,79	2,02	2,01	1,47	1,47	1,50	1,46	1,47
Desv Std	0,00	0,16	0,01	0,04	0,03	0,03	0,04	0,06
H+ removido	0,0E+0	-3,6E-5	-2,6E-5	7,3E-5	7,2E-5	6,2E-5	7,3E-5	7,3E-5
Valor corregido	1,79	2,02	2,05	1,48	1,46	1,48	1,43	1,41

Tabla 9: Datos del Eh en mV del experimento de biolixiviación

Matraz\Horas	0	72	168	240	336	408	504	576
1A	404	464						
1B	405	459						
2A	403	452	711					
2B	404	456	712					
3A	402	452	714	740				
3B	402	448	714	734				
4A	404	443	704	735	733			
4B	403	447	709	739	731			
5A	404	444	709	737	734	740		
5B	404	436	711	733	731	734		
6A	403	442	707	730	730	730	735	
6B	405	453	709	735	730	737	737	
7A	404	440	688	724	727	720	729	730
7B	405	448	707	730	734	733	735	748
Promedio	404	449	708	734	731	732	734	739
Desv Std	0,99	7,71	6,92	4,76	2,38	6,95	3,46	12,73

Tabla 10: Monitoreo del Fe(II) durante la biolixiviación de pirita

Matraz\Horas	0	72	168	240	336	408	504	576
1A	2257	752						
1B	2314	854						
2A	2339	1053	47					
2B	2266	930	44					
3A	2370	1161	14	70				
3B	2404	1101	24	60				
4A	2463	1412	44	36	37			
4B	2129	1192	28	25	38			
5A	2300	1080	31	51	28	38		
5B	1937	1375		34	35	31		
6A	2288	1217	35	55	71	34	28	
6B	1842	955	29	34	36	30	29	
7A	2316	1317	24	25	54	26	16	14
7B	2190	1024	37	36	32	31	21	11
Promedio	2244	1102	32	43	42	32	24	13
Desv Std	172,47	193,27	9,96	15,42	14,02	4,02	6,20	1,89

Tabla 11: Monitoreo del Hierro total (mg/l) medido con o-fenantrolina durante el experimento

Matraz\Horas	0	72	168	240	336	408	504	576
1A	2811	2526						
1B	2920	2522						
2A	2775	2503	1926					
2B	2725	2554	2033					
3A	2796	2792	2151	2172				
3B	2533	2387	2096	2064				
4A	2463	2418	3281	2133	2150			
4B	2202	2514	2237	2203	2138			
5A	2440	2318	2114	2250	2342	2228		
5B	1985	2660	2173	2107	2043	1936		
6A	2437	2511	2153	2148	2119	1936	1992	
6B	1867	2485	2307	2223	2089	1925	2107	
7A	2459	2429	2226	2067	1980	1789	1734	1607
7B	2362	2535	2334	2300	2430	2293	2483	2389
Promedio	2484	2511	2253	2167	2161	2018	2079	1998
Desv Std	312	115	118	78	151	197	311	553
Valor corregido	2484	2710	2727	2822	2990	3019	3242	3327
Fe (III)	240	1608	2695	2779	2948	2988	3218	3314

Tabla 12: Valores del Fierro total (en mg/l) por HCl en experimento de biolixiviación de pirita

Matraz\Horas	0	72	168	240	336	408	504	576
Solución A	0	2350	1895	2063	2300	2394	2074	1842
Solución B	0	2430	1922	1753	2293	1952	2155	2749
Mineral	0	4	20	20	25	45	47	61
Promedio Sol	2484	2390	1908	1908	2296	2173	2114	2295
Valor corregido	2484	2589	2370	2522	3063	3124	3239	3589
Fierro ppdo en mineral	0,0	0,4	2,0	2,0	2,5	4,5	4,7	6,1
Fierro lixiviado	0,0	11,7	14,2	18,9	31,5	36,4	42,6	61,3
% Fierro lixiviado	0,0	10,1	12,2	16,2	27,1	31,3	36,6	52,7

Tabla 13: Monitoreo del sulfato en solución (mg/l) durante el experimento de biolixiviación

Matraz\Horas	0	72	168	240	336	408	504	576
1A	8799	10510						
1B	8859	13137						
2A	8200	10404	8438					
2B	8550	11324	8261					
3A	8909	10239	6843	8188				
3B	7832	10100	7372	7873				
4A	7635	11136	7965	8852	10398			
4B	8379	10774	7741	8702	10469			
5A	5892	10781	7532	8973	11881	9437		
5B	7457	10794	7664	7814	9404	7034		
6A	6460	10618	8016	9425	11010			
6B	8664	10471	8111	10691	11057	8961		
7A	6288	10582	7307	7800	10305	10257		
7B	6563	10861	6536	9626	10683	13043		
Promedio	7749	10838	7649	8794	10651	9746		
Desv Std	1057	737	568	937	715	2191		
6A				8637	9467		9185	
6B				9380	7854	5558	9020	
7A				7033	8772	3310	8118	7786
7B				8253	10145	4962	8544	9557
Promedio				8326	9059	4610	8717	8671
Desv Std				980	980	1165	483	1252
Sulfato eliminado	22	31	-49	25	27	30	26	26
Valor corregido	7749		8703	8405	9629	10864	10438	10914
Sulfato Generado	0,0		47,7	32,8	94,0	155,8	134,5	158,3
Azufre lixiviado	0,0		15,9	11,0	31,4	52,0	44,9	52,9
% Azufre lixiviado	0,0		11,9	8,2	23,5	38,9	33,6	39,6
Azufre teórico	0	13	16	22	36	42	49	70

8.4 Datos del análisis de la población bacteriana por medio de CARD-FISH

Tabla 14: Datos del crecimiento celular en la solución de biolixiviación y primera corrección propuesta de los datos.

Hr	Muestra [ml]	Cel/ml	Celulas totales (RD)	Celulas eliminadas	Eliminadas totales	Células totales (RD) + Células eliminadas
0	4	6,0E+7	3,0E+9	2,4E+8		3,0E+9
72	5,5	7,0E+7	3,5E+9	3,9E+8	2,4E+8	3,7E+9
168	4	1,0E+8	5,0E+9	4,0E+8	6,3E+8	5,6E+9
240	4	1,2E+8	6,0E+9	4,8E+8	1,0E+9	7,0E+9
336	4	1,6E+8	8,0E+9	6,4E+8	1,5E+9	9,5E+9
408	4	1,6E+8	8,0E+9	6,4E+8	2,1E+9	1,0E+10
504	4	1,8E+8	9,0E+9	7,2E+8	2,8E+9	1,2E+10
576	4	1,8E+8	9,0E+9	7,2E+8	3,5E+9	1,3E+10

Tabla 15: Datos de crecimiento celular en solución y segunda corrección propuesta para el crecimiento celular

Hr	Muestra [ml]	Cel/ml	Celulas totales en el frasco	Celulas eliminadas	Crecimiento cultivo	Celulas eliminadas + crecimiento	Células totales (RD) + Células Eliminadas + Crecimiento de células eliminadas
0	4	6,0E+7	2,8E+9	2,4E+8		2,4E+8	3,0E+9
72	5,5	7,0E+7	3,1E+9	3,9E+8	1,3E+0	6,9E+8	3,8E+9
168	4	1,0E+8	4,6E+9	4,0E+8	1,6E+0	1,5E+9	6,1E+9
240	4	1,2E+8	5,5E+9	4,8E+8	1,3E+0	2,4E+9	8,0E+9
336	4	1,6E+8	7,4E+9	6,4E+8	1,4E+0	4,2E+9	1,2E+10
408	4	1,6E+8	7,4E+9	6,4E+8	1,1E+0	5,2E+9	1,3E+10
504	4	1,8E+8	8,3E+9	7,2E+8	1,2E+0	7,1E+9	1,5E+10
576	4	1,8E+8	8,3E+9	7,2E+8	1,1E+0	8,4E+9	1,7E+10

Tabla 16: Datos CARD-FISH solución de biolixiviación

	Dia 0			Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 5			Dia 6			Dia 7		
	+	Total	% +																		
Ac. ferrooxidans	3	42	7,1	7	16	43,8	4	8	50,0	6	26	23,1				2	8	25,0	2	12	16,7
	2	8	25,0	7	20	35,0	2	7	28,6	4	17	23,5	3	16	18,8	1	7	14,3	1	7	14,3
	2	10	20,0	5	14	35,7	3	7	42,9	2	12	16,7	2	8	25,0	1	6	16,7	2	9	22,2
	3	8	37,5	5	12	41,7	2	4	50,0	4	14	28,6	3	13	23,1	2	7	28,6	1	7	14,3
	12	81	14,8				5	7	71,4	3	10	30,0	1	5	20,0	1	6	16,7			
			20,9			39,0			48,6			24,4			21,7			20,2			16,9
Ac. thiooxidans	35	76	46,1	6	16	37,5	1	5	20,0	4	19	21,1	1	6	16,7	2	10	20,0	2	15	13,3
	47	90	52,2	4	16	25,0	1	4	25,0	3	22	13,6	1	6	16,7	1	7	14,3	1	8	12,5
	21	26	80,8	4	13	30,8	2	7	28,6	2	16	12,5	4	28	14,3	1	9	11,1	2	13	15,4
	36	58	62,1	10	22	45,5	3	7	42,9	1	7	14,3	4	23	17,4				2	13	15,4
			60,3			34,7			29,1			15,4			16,3			15,1			14,2
S. thermosulfidoxidans	11	44	25,0	2	24	8,3	0	24	0,0	2	25	8,0	1	10	10,0	1	11	9,1	1	12	8,3
	8	22	36,4	5	18	27,8	0	18	0,0	2	23	8,7	1	15	6,7				1	17	5,9
	9	49	18,4	2	11	18,2	0	11	0,0	1	24	4,2	2	18	11,1	1	10	10,0			
	7	32	21,9	3	14	21,4	0	14	0,0	1	21	4,8				1	13	7,7			
	10	43	23,3																		
			25,0			18,9			0,0			6,4			9,3			8,9			7,1
L. ferrooxidans	1	22	4,5	1	13	7,7	0	13	0,0	1	20	5,0	1	12	8,3				1	18	5,6
	5	34	14,7	1	10	10,0	0	10	0,0	1	17	5,9	1	13	7,7	1	11	9,1	1	15	6,7
	3	21	14,3	1	12	8,3	0	12	0,0	1	15	6,7				1	15	6,7			
	1	22	4,5	2	17	11,8	0	17	0,0	2	43	4,7				1	11	9,1			
	3	31	9,7																		
			9,6			9,4			0,0			5,6			8,0			8,3			6,1
Total		115,7			102,1			77,7			51,7			55,2			52,6			44,2	

Tabla 17: Datos de CARD-FISH del mineral

Ac. ferrooxidans	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado
	9	15	12,0	60	1,25	5	9	-	55,56	-
9	24	50,0	37,5	0,48	4	8	-	50	-	
10	14	6,0	71,43	2,33	8	12	-	66,67	-	
Promedio		56,31			1,35		Promedio		57,41	
Promedio		56,31			1,35		Promedio		57,41	
Ac. thiooxidans	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado
	8	17	4,0	47,06	4,25	10	15	-	66,67	-
9	26	7,0	34,62	3,71	5	8	-	62,5	-	
8	13	5,0	61,54	2,6	4	8	-	50	-	
Promedio		47,74			3,52		Promedio		59,72	
Promedio		47,74			3,52		Promedio		59,72	
S. thermosulfidoxidans	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado
	6	13	7,0	46,15	1,86	2	7	5,0	28,57	1,4
2	12	9,0	16,67	1,33	0	23	12,0	0	1,92	
7	35	7,0	20	5	14	38	6,0	36,84	6,33	
Promedio		27,61			2,73		Promedio		30,64	
Promedio		27,61			2,73		Promedio		30,64	
L. ferrooxidans	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado	+	total	cuadrados	+%	cel/cuadrado
	9	9	6,0	100	1,5	1	7	7,0	14,29	1
5	21	10,0	23,81	2,1	4	9	9,0	44,44	1	
0	8	8,0	0	1	4	6	4,0	66,67	1,5	
8	16	8,0	50	2	4	7	8,0	57,14	0,88	
Promedio		43,45			1,65		Promedio		45,63	
Promedio		43,45			1,65		Promedio		45,63	
Total		175,11			2,26		Total		193,4	
Total		175,11			2,26		Total		193,4	