



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES MICROORGANISMO-MINERAL EN LA  
BIOLIXIVIACIÓN DE LA CALCOPIRITA CON *Sulfolobus metallicus***

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA MENCIÓN QUÍMICA**

**VERÓNICA LUCÍA GAUTIER HILL**

**PROFESOR GUIA:  
TOMÁS VARGAS VALERO**

**MIEMBROS DE LA COMISION:  
FERNANDO ACEVEDO BONZI  
LUIS CIFUENTES SEVES  
FRANCISCO GRACIA CAROCA**

**SANTIAGO DE CHILE  
AGOSTO 2009**

## **RESUMEN**

En este trabajo de tesis se estudió la influencia catalítica de *Sulfolobus metallicus* en la biolixiviación de calcopirita pura a 70°C y pH 1,5. La lixiviación se realizó en medio basal Norris en matraces agitados con muestras de calcopirita sintética y natural molida entre -80 # + 120# de Andina. Las muestras fueron caracterizadas monitoreando la concentración de cobre, ferroso, hierro total, sulfato y la población de células en la solución. Se utilizó difracción de rayos x (DRX) para caracterizar los sólidos. Se realizaron análisis por microscopía electrónica de barrido acoplado a espectroscopía de energía dispersiva (SEM-EDS) para determinar la adherencia de las células al mineral. Para evaluar separadamente la influencia de las células planctónicas y las células adheridas en el proceso catalítico, en algunos experimentos los microorganismos fueron impedidos de estar en contacto con la calcopirita manteniéndolos en una cámara separada. Complementariamente, se estudiaron las diferentes especies de azufre disueltas en solución por cromatografía líquida a alta presión (HPLC) en condiciones abióticas con aire o nitrógeno y en condiciones de inoculación con *Sulfolobus metallicus*. Finalmente, se estudió a través de espectrografía fotoelectrónica de rayos x (XPS) los cambios superficiales que ocurren sobre la superficie de calcopirita sintética a 60°C en ausencia (N<sub>2</sub>) y presencia de aire.

Los resultados indicaron que en ausencia de hierro inicial en la solución, la máxima recuperación de cobre se obtiene cuando parte los microorganismos son capaces de adherirse a la superficie de la calcopirita, seguido por el caso abiótico aireado y finalmente el caso abiótico anaeróbico (donde casi no se produce disolución). Se determinó además que es necesaria la adherencia de una parte de la población de microorganismos a la superficie del mineral para aumentar la velocidad de lixiviación de la calcopirita y para mantener la población de microorganismos. Esta adherencia comienza en las grietas sobre la superficie y luego ocurre de manera heterogénea sobre la superficie.

Se estableció que el mecanismo de acción de los *S. metallicus* sobre calcopirita podría ser el siguiente: una parte de los microorganismos que se han adherido a la calcopirita producen un compuesto intermedio, tiosulfato, que los microorganismos que quedan libres en la solución oxidan a sulfito y bisulfito que finalmente pasa a sulfato. Además, estos microorganismos oxidan Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup> producido por la disolución de la calcopirita.

En el caso en que se agrega inicialmente 1 g/l de Fe<sup>+3</sup> a la solución, la máxima recuperación de cobre se obtiene en el caso abiótico aireado seguido por los casos inoculados y finalmente el caso abiótico anaeróbico. El mecanismo de disolución de la calcopirita es principalmente química. En los casos inoculados, los microorganismos toman el azufre o algún compuesto intermedio de azufre producido durante el proceso férrico de disolución como fuente de energía y además regeneran el Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup>. En cambio en los casos abióticos el mecanismo de disolución de la calcopirita viene dado por la reducción del oxígeno sobre la superficie del mineral y el hierro presente en la solución como ferroso (Eh bajo).

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todos los miembros del departamento de Ingeniería química y biotecnología. Muy especialmente a aquellos que me formaron en el transcurso de mis estudios de doctorado.

Al profesor Tomás Vargas como también a las personas que integran el laboratorio de hidrometalurgia de la facultad de ciencias físicas y matemáticas por el apoyo que me brindaron para la realización de este trabajo.

Es imprescindible agradecer también a los profesores que conforman la comisión que evaluó este trabajo: Fernando Acevedo, Luis Cifuentes y Francisco Gracia pues sus valiosos comentarios y sugerencias permitieron presentar un trabajo más depurado e interesante.

Deseo agradecer también a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica que ayudó a financiar mis estudios de doctorado y a la Beca Estadía corta de investigación de la Universidad de Chile 2007 que permitió desarrollar parte de este trabajo en Hahn-Meitner-Institut Berlin (actualmente Helmholtz Zentrum Berlin) con el apoyo del Dr. Helmut Tributsch.

Finalmente, agradezco a Oscar y mi familia por el apoyo brindado en todo momento.

## **INDICE**

<b><u>CAPITULO 1: ANTECEDENTES</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1 HIDROMETALURGIA DE LA CALCOPIRITA</b>	<b>1</b>
<b>1.2 LA CALCOPIRITA</b>	<b>2</b>
<b>1.3 LIXIVIACIÓN QUÍMICA DE LA CALCOPIRITA EN PRESENCIA DE ION FÉRRICO</b>	<b>4</b>
<b>1.4 LIXIVIACIÓN QUÍMICA DE LA CALCOPIRITA EN PRESENCIA DE ION FERROSO</b>	<b>5</b>
<b>1.5 ELECTROQUÍMICA DE LA CALCOPIRITA</b>	<b>7</b>
<b>1.6 BIOLIXIVIACION</b>	<b>9</b>
<b>1.6.1 BIOLIXIVIACION DE CALCOPIRITA</b>	<b>15</b>
<b>1.6.2 BIOLIXIVIACION DE AZUFRE</b>	<b>20</b>
<b>1.6.3 BIOLIXIVIACION DE PIRITA</b>	<b>21</b>
<b>1.7 OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b><u>CAPITULO 2: METODOLOGÍA Y DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL</u></b>	<b>28</b>
<b>2.1 MATERIALES</b>	<b>28</b>
<b>2.1.1 MICROORGANISMOS Y MEDIO DE CULTIVO</b>	<b>29</b>
<b>2.2 EXPERIENCIAS</b>	<b>29</b>
<b>2.2.1 ADHERENCIA</b>	<b>29</b>
<b>2.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS</b>	<b>30</b>
2.2.2.1 Mediciones de rugosidad	30
2.2.2.2 Montaje reactor de cámara doble	31
<b>2.2.3 MODELO CINETICO DE LIXIVIACIÓN</b>	<b>33</b>
<b>2.2.4 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA SUPERFICIE</b>	<b>34</b>
<b>2.2.5 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LA CALCOPIRITA</b>	<b>34</b>
2.2.5.1 Caracterización electroquímica	35
2.2.5.2 Mediciones Superficiales a través de XPS	35
<b>2.2.6 DESCRIPCIÓN DE LOS EQUIPOS</b>	<b>37</b>
<b><u>CAPITULO 3: ADHERENCIA DE <i>Sulfolobus metallicus</i> A CALCOPIRITA</u></b>	<b>38</b>
<b>3.1 ADHERENCIA DE <i>Sulfolobus metallicus</i> A CALCOPIRITA SINTÉTICA</b>	<b>38</b>
<b>3.1.1 CALCOPIRITA MASIVA PULIDA</b>	<b>38</b>
<b>3.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS MEDIANTE PERFILOMETRÍA</b>	<b>41</b>
<b>3.1.3 CALCOPIRITA MASIVA TRATADA CON Fe(III) DURANTE 5 DÍAS</b>	<b>44</b>

<b>3.1.4 CALCOPIRITA MOLIDA</b>	<b>46</b>
<b>3.2 EFECTO DEL AUMENTO DE LA POBLACIÓN DE MICROORGANISMOS INOCULADOS SOBRE LA ADHERENCIA Y LA CINÉTICA DE LIXIVIACIÓN DE LA CALCOPIRITA NATURAL PARTICULADA</b>	<b>49</b>
<b>3.3 EFECTO DE LA CRISTALINIDAD EN LA ADHERENCIA DE <i>S. metallicus</i> A CALCOPIRITA MASIVA NATURAL</b>	<b>56</b>
<b>3.4 DISCUSIONES PARCIALES DEL CAPÍTULO</b>	<b>56</b>
<b>3.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO</b>	<b>59</b>
<b><u>CAPITULO 4: MECANISMO DE ACCIÓN DE <i>Sulfolobus metallicus</i> SOBRE LA CALCOPIRITA</u></b>	<b>60</b>
<b>4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE <i>S. metallicus</i> EN SOLUCIONES SIN Fe INICIAL</b>	<b>60</b>
<b>4.2 TIPOS DE ACTIVIDAD OXIDATIVA</b>	<b>66</b>
<b>4.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE <i>S. metallicus</i> EN PRESENCIA DE 1 g/L Fe<sup>+3</sup></b>	<b>72</b>
<b>4.4 MODELO CINETICO DE LIXIVIACION</b>	<b>82</b>
<b>4.5 DISCUSION</b>	<b>86</b>
a. Caso sin hierro inicial en la solución	86
b. Caso con férrico inicial en la solución	89
<b>4.6 CONCLUSIONES DEL CAPITULO</b>	<b>90</b>
a. Casos sin hierro inicial en la solución	90
b. Casos con 1 g/l Fe <sup>+3</sup> inicial en la solución	91
<b><u>CAPITULO 5: EFECTO DEL OXÍGENO EN LA DISOLUCIÓN DE LA CALCOPIRITA A 60°C</u></b>	<b>92</b>
<b>5.1 <u>CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LA CALCOPIRITA</u></b>	<b>92</b>
5.1.1 Análisis de los estados de oxidación del cobre en cada una de las muestras.	96
5.1.2 Análisis de los estados de oxidación del hierro en cada una de las muestras.	97
5.1.3 Análisis de los estados de oxidación del azufre en cada una de las muestras.	98
<b>5.2 DISCUSIONES DEL CAPÍTULO</b>	<b>99</b>
<b>5.3 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO</b>	<b>101</b>
<b><u>CAPITULO 6: DISCUSIONES Y CONCLUSIONES</u></b>	<b>102</b>
<b>6.1 DISCUSIONES</b>	<b>102</b>
<b>6.2 CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>
<b>6.2.1 CONCLUSIONES CASOS SIN HIERRO INICIAL EN LA SOLUCIÓN</b>	<b>106</b>

<b>6.2.2 CONCLUSIONES CASOS CON 1 g/l Fe<sup>+3</sup> EN LA SOLUCIÓN</b>	<b>107</b>
<b><u>REFERENCIAS</u></b>	<b>108</b>
<b><u>ANEXO A</u></b>	<b>115</b>
<b><u>ANEXO B</u></b>	<b>120</b>
<b><u>ANEXO C</u></b>	<b>125</b>
<b><u>ANEXO D</u></b>	<b>138</b>

## **CAPITULO 1:**

### **ANTECEDENTES**

#### **1.1 HIDROMETALURGIA DE LA CALCOPIRITA**

La calcopirita, sulfuro doble de cobre y hierro ( $\text{CuFeS}_2$ ), es el mineral más abundante entre todos los minerales de cobre. Su tratamiento metalúrgico se realiza, principalmente, utilizando la vía pirometalúrgica después de una necesaria concentración por flotación del propio mineral previamente chancado y molido. Una vía alternativa para el tratamiento de la calcopirita es la hidrometalúrgica, la cual presenta ventajas importantes tales como su capacidad para el tratamiento de menas pobres (cada vez más abundantes en el caso del cobre) y un control más fácil de los subproductos lo cual permite mejorar los aspectos medioambientales de la obtención del cobre. Sin embargo, el tratamiento de este sulfuro por vía húmeda tropieza con el problema de su refractariedad a temperatura ambiente frente a los reactivos lixiviantes más comúnmente utilizados, lo que dificulta obtener altos niveles de recuperación de cobre en tiempos razonables y alcanzar una economía aceptable del proceso. Las razones de este comportamiento se centra en las transformaciones superficiales que sufre el mineral al ser atacado químicamente en medios oxidantes, debido a la formación de productos intermedios de reacción muy estables en condiciones de trabajo.

La refractariedad de la calcopirita disminuye substancialmente en la medida que se aumenta la temperatura a la que es lixiviada y gran parte de las rutas propuestas plantean operar a temperaturas por sobre los  $60^\circ\text{C}$ . En el caso de las rutas bacterianas, se ha demostrado que en la biolixiviación de concentrados de calcopirita con microorganismos termófilos extremos, a temperaturas en el rango  $70\text{-}90^\circ\text{C}$ , la refractariedad de este sulfuro se minimiza y gran parte del azufre presente en el mineral se oxida a sulfato. Esta ruta es atractiva ya que se obtienen velocidades de lixiviación relativamente rápidas, y ya se ha estudiado hasta en equipos de escala semi-comercial. Sin embargo, en esta ruta de proceso falta aún por entender muchos aspectos fundamentales sobre la naturaleza de las transformaciones químicas,

minerales y biológicas involucrados. El presente estudio se centra en el estudio del mecanismo de las interacciones mineral – microorganismo durante la biolixiviación de calcopirita con *Sulfolbus metallicus* a 70 °C (Ballester y Córdova (2005)).

## **1.2 LA CALCOPIRITA:**

Su fórmula química es  $\text{CuFeS}_2$ , en su composición teórica el cobre esta principalmente en estado cuproso, en tanto que el hierro está en estado férrico; pero se pueden dar mezclas en que el hierro presente está en parte como férrico y parte ferroso.(Ferreira, et al (1975)).

La calcopirita puede encontrarse, junto con otros sulfuros de cobre, entre los minerales primarios de origen magmático, siendo extraída como pirita cuprífera y pirrotita. También puede hallarse en vetas metalíferas, en rocas ígneas, en sedimentos y en las zonas de enriquecimiento secundario de algunos yacimientos.

El mineral de calcopirita es de color dorado, posee una densidad de 4.1 a 4.3  $\text{g/cm}^3$  y una dureza de 3.5 a 4.0 en la escala de Mohr. Se trata de un semiconductor tipo n cuya resistividad a temperatura ambiente varía entre  $2 \cdot 10^{-4}$  y  $9 \cdot 10^{-3} \Omega\text{m}^5$ . Su punto de fusión es aproximadamente 880°C.

Existen tres tipos de calcopirita:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -calcopiritas, la calcopirita  $\alpha$  natural a baja temperatura tiene la composición de  $\text{CuFeS}_2$ , la forma  $\beta$  tiene una composición alrededor de  $\text{CuFeS}_{1,82}$  y la forma  $\gamma$  se escribe como  $\text{CuFeS}_{2-x}$ , donde x puede tomar distintos valores. Las formas  $\beta$  y  $\gamma$  son formas azufre deficientes de la calcopirita- $\alpha$  natural (Ferreira et al (1975)).

La calcopirita posee una estructura cristalográfica tetragonal, y al ser sometida a una oxidación sufre una destrucción, la que está principalmente asociada a una pérdida de electrones y a una ruptura de enlaces en la estructura cristalina, lo que provoca un desbalance electrónico en la estructura.

La estructura cristalina tetragonal presenta los siguientes parámetros  $c=525$  pm y  $a=1032$  pm. En cada mitad de la celda unitaria un átomo de azufre está rodeado por dos átomos de cobre y dos átomos de hierro, los que ocupan posiciones alternas a lo largo de eje  $c$ . De igual manera, cada átomo metálico es coordinado por un tetraedro de átomos de azufre. Las distancias interatómicas cobre-azufre y hierro-azufre son 230.2 pm y 225.7 pm respectivamente (figura 1.1).

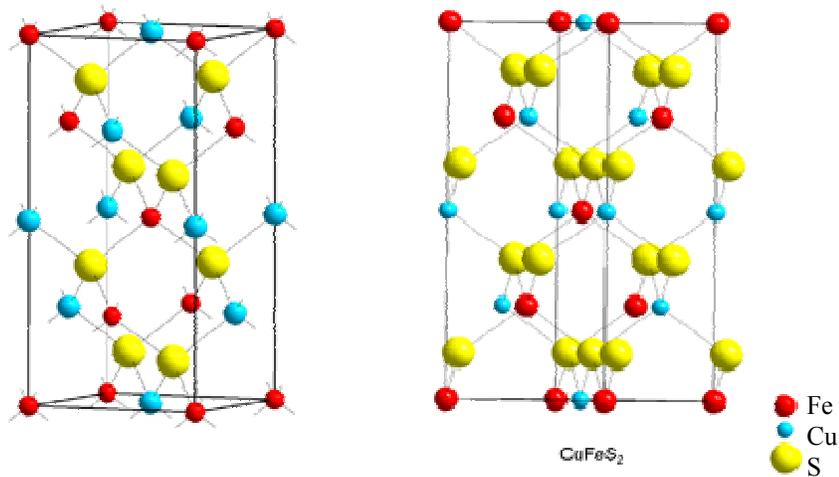


Figura 1.1: Estructura de la calcopirita

La calcopirita puede sufrir dos cambios de fase, uno a  $550^\circ\text{C}$  y el otro a  $657^\circ\text{C}$ ; ambos acompañados por una pequeña pérdida de azufre. La primera transformación es de estructura tetragonal a cúbica, se trata de una reacción endotérmica y un proceso que no es reversible al enfriar. La segunda ocurre a  $657^\circ\text{C}$  una temperatura de transición antiferromagnética.

La calcopirita puede ser sintetizada a partir de elementos constituyentes. Para esto se mezclan completamente cantidades estequiométricas de cobre, hierro y azufre, para luego calentar durante un cierto periodo de tiempo. Otra forma es de sintetizar calcopirita es mezclando cantidades equimolares de sulfuro cúprico y sulfuro ferroso, calentadas en ausencia de oxígeno. Una tercera forma es mezclar óxido cuproso y óxido férrico, calentada a una temperatura moderada en una atmósfera sulfhídrica. (Gajardo (1993)).

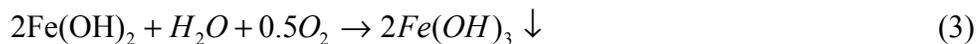
Zurmaev et al (1998) estudiaron cristales cortados en alto ultravacío y temperatura ambiente a través de XES y XPE VB y determinaron una fuerte hibridación entre Cu 3d/Fe 3d. Además, se determinó que ambos elementos están unidos al azufre Fe 3d/S 3p (hibridación en la banda de valencia) y Cu 3d/S 3p.

### **1.3 LIXIVIACIÓN QUÍMICA DE LA CALCOPIRITA EN PRESENCIA DE IÓN FÉRRICO.**

La oxidación de calcopirita en presencia de ácido e ión férrico usualmente es representada como:



En esta reacción el azufre del sulfuro es oxidado a azufre elemental. Las velocidades de reacción reportadas dependen de la temperatura y del área de las partículas. Se les debe proveer de la agitación suficiente para mantener la suspensión y la acidez previniendo la hidrólisis de hierro y/o la oxidación. Las velocidades de lixiviación de calcopirita provenientes de distintas localidades son similares cuando las muestras son equivalentes en tamaño de partícula y pureza. (Dutrizac, 1981, 1982, Hirato et al. 1987). Por otro lado, en presencia de iones sulfato, la hidrólisis de hierro lleva a la precipitación de hidroxisulfatos de hierro (jarositas).



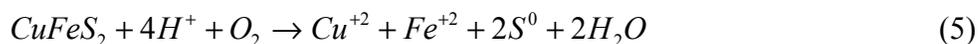
Klauber et al. (2001) estudiaron la especiación de azufre proveniente de la superficie de la calcopirita lixiviada con ión férrico e ión ferroso (a 0.1 y 0.2 M) respectivamente a 50°C y concluyeron a través de XPS que en ambos casos se pueden producir 2 tipos

de azufre elemental durante la lixiviación: (i) azufre volátil, que se asocia con la multicapa  $S_8^0$ , y (ii) una monocapa o submonocapa más estable de la especie  $S[0]$ .

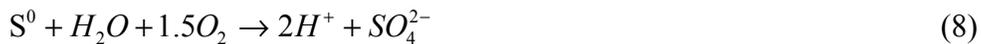
Klauber (2007) realizó un resumen con los principales factores que influyen en la disolución de la calcopirita con soluciones que contienen ión férrico e informó que investigaciones empíricas de disolución de calcopirita en soluciones ácidas que contienen sulfato férrico son usualmente una combinación de lixiviación química, electroquímica, mono o multicristal, natural o sintética, proceso de flotación y la agitación de la solución. Además, estudió en detalle que un factor clave en la lixiviación de la calcopirita es saltar o minimizar la formación de una capa pasivante sobre la superficie de la calcopirita y existen cuatro candidatos comúnmente propuestos como los compuestos que disminuyen la disolución de la calcopirita dependiendo de las condiciones experimentales aplicadas: (1) sulfuros deficientes en metales, (2) azufre elemental ( $S_8$ ), (3) polisulfuros  $XS_n$ , (4) jarositas  $xFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ .

#### **1.4 LIXIVIACIÓN QUÍMICA DE LA CALCOPIRITA EN PRESENCIA DE IÓN FERROSO.**

La mayoría de los investigadores han supuesto que la contribución del ión ferroso a la lixiviación de la calcopirita es como una fuente de ión férrico y que su concentración en solución debe ser minimizada para aumentar las velocidades de lixiviación. Sin embargo, se ha reportado que el sulfato ferroso extrae cobre más eficientemente que el sulfato férrico en tres de cuatro muestras de calcopirita (Hiroyoshi et al. (1997)). En este estudio el consumo de oxígeno, la formación de azufre, las concentraciones de hierro total e ión ferroso en la solución fueron monitoreados en experimentos de lixiviación en que la concentración de ión ferroso y el pH de la solución variaron. Los autores concluyeron que el ión ferroso catalizó la oxidación de calcopirita por el oxígeno disuelto en medio ácido.



Los autores también notaron que la oxidación de calcopirita (ec. 6), de ión ferroso (ec. 7) y la oxidación de azufre a sulfato (ec. 8) ocurren de manera simultánea y contribuye a un posterior consumo de oxígeno.



Se proponen dos tipos de modelos para el rol del ferroso. El primero en que el ferroso actúa como catalizador y el segundo es que el oxígeno disuelto convierte el ferroso a férrico en la superficie de la calcopirita. Además, hay que notar que los concentrados utilizados presentan pirita y es posible que este juegue un rol en la disolución de la calcopirita.

Sandström et al (2005) observaron que a bajos potenciales la calcopirita se lixivia más rápidamente. La composición del electrolito fue sulfato ferroso-cúprico a pH 1,5 y temperatura 65-67°C, los resultados de XPS mostraron la formación de azufre elemental (que no pasiva la superficie), pero la formación de jarosita sí.

Hiro Yoshi y Sandström basan sus modelos en la formación de un compuesto intermedio  $Cu_2S$  sobre la superficie de la calcopirita a bajos potenciales y este compuesto haría más fácil la disolución de la calcopirita.

Hyroyoshi et al. (2007) estudiaron la lixiviación de calcopirita en  $H_2SO_4$  en matraces agitados de  $50 \text{ cm}^3$  con  $10 \text{ cm}^3$  de solución y 0.1 gr de calcopirita a potenciales redox determinados por la concentración de  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$ , donde las velocidades son mayores a potenciales redox bajo un valor crítico (potencial crítico) a 25°C en aire, este estudio investigó los efectos de distintos iones metálicos en el potencial crítico de la lixiviación de la calcopirita. La adición de  $Ag^+$  o  $Bi^{3+}$  aumenta el potencial crítico. Este potencial no es afectado al agregar  $Pd^{+2}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ . Los resultados pueden ser interpretados suponiendo la formación de  $Cu_2S$  debido a la reducción de la calcopirita y la subsecuente oxidación de  $Cu_2S$  a potenciales bajo el crítico.

## **1.5 ELECTROQUÍMICA DE LA CALCOPIRITA.**

El comportamiento anódico de la calcopirita en 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y en 1 M de HCl a 25° C fue estudiado a través de voltametría cíclica y electrólisis potencioestáticas. Las voltametrías mostraron una pequeña preonda atribuida al proceso de oxidación en la superficie, seguida por una región de activa disolución caracterizada por un aumento de la corriente anódica. La reacción en el ánodo involucra 6.7 +/- 0.3 F /mol de calcopirita. Además, se determinó que la disolución de la calcopirita ocurre en sitios localizados y el número de ellos depende del potencial aplicado. (Biegler y Swift (1979))

Yin et al. (1995) estudiaron la oxidación de calcopirita a través de la técnica de XPS. Los experimentos se realizaron con calcopirita natural expuesta al aire y 25° C. Se varió el pH del electrólito de 0 a 13 y se compararon muestras cortadas, pulidas y aplicando distintos potenciales. Determinaron que diferentes tipos de films pasivos se pueden formar durante la oxidación electroquímica, dependiendo del pH y del potencial aplicado. En electrólitos muy ácidos, el film pasivo consiste en CuS<sub>2</sub> (a bajos potenciales) o azufre elemental (a altos potenciales). En un electrólito débilmente alcalino, el film pasivo consiste en CuS<sub>2</sub> y Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (a bajos potenciales), o azufre elemental, CuO y Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (a altos potenciales). En electrólitos débilmente ácidos o fuertemente alcalinos, el efecto pasivante es menos evidente.

Gómez et al. (1996) estudiaron la respuesta de un electrodo de calcopirita a dos distintas temperaturas 25° y 68° C sobre una atmósfera de N<sub>2</sub>. El electrólito utilizado en estos experimentos fue (0,4 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a pH 2 que es utilizado para el crecimiento de los microorganismos en biolixiviación. Se observó que a ambas temperaturas durante la disolución anódica de la calcopirita, se forma un film pasivo sobre la superficie que restringe las reacciones de oxidación en el medio por un control difusional del film. Las diferencias observadas a 25 y 68 °C son diferencias en la estructura física de los films complejos de sulfuros, polisulfuros y azufre elemental, que son formados electroquímicamente.

La oxidación electroquímica de la calcopirita ha sido estudiada a través de XPS por varios autores. Farquhar et al. (2003) estudiaron la oxidación de calcopirita natural a pH 4.0 y potenciales de 500 y 650 mV/Ag/AgCl. Ellos observaron que al aumentar el potencial de 500 mV a 650 mV la concentración de óxido de hierro aumenta. También, al aplicar un potencial de 650 mV casi todo el cobre sobre la superficie se ha agotado y la composición de azufre en la superficie es  $S^{2-}$ ,  $S^0$  y  $S^{+6}$ .

Hiro Yoshi et al. (2004) realizaron experimentos electroquímicos donde observaron que la extracción de cobre durante la disolución de la calcopirita mediante el ataque de iones férricos u oxígeno disuelto en ácido sulfúrico aumenta a bajos potenciales redox pero disminuye a altos potenciales. En ausencia de iones cúpricos o ferrosos la corriente anódica aumenta monótonamente con el potencial aplicado. Cuando estos iones coexisten la corriente aumenta al aumentar el potencial hasta alcanzar un máximo y luego decae. En la zona de bajos potenciales (región activa), cuando coexisten los iones ferrosos y cúpricos la corriente anódica se hace más grande que sin estos. Esto indica que la coexistencia de estos iones promueven la disolución anódica a bajos potenciales, pero causa la formación de otra capa producto e inhibe el crecimiento de la capa pasiva en la región activa. Por otro lado, la lixiviación química del mineral en columnas muestra que el aumentar el pH de la solución lleva a un insignificante aumento en la velocidad de oxidación y la concentración de  $Fe^{+3}$  no tiene una mayor influencia en la velocidad de lixiviación del cobre (Antonijevic y Bogdanovic (2004)).

Lazaro y Nicol (2006) estudiaron las etapas iniciales de la disolución de la calcopirita usando un electrodo rotatorio en una solución diluida de ácido sulfúrico desoxigenada ( $N_2$ ) a 60° C. Se determinó que el proceso de disolución continua en ausencia de un oxidante. Este proceso involucra la formación de  $Cu^{+2}$  soluble y especies solubles de azufre, presumiblemente  $H_2S$ . Además, se determinó que bajo condiciones oxidativas produce especies solubles de azufre como tiosulfato.

Varios autores no están de acuerdo en la naturaleza y propiedades de la capa pasiva. Azufre elemental residual, precipitados de jarositas y polisulfuros no estequiométricos

se han propuesto como agentes pasivantes. Además, a potenciales en el rango transpasivo la calcopirita puede ser descompuesta en distintos compuestos de cobre como CuS.

Viramontes et al. (2007) estudiaron el comportamiento activo-pasivo de la calcopirita en  $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{SO}_4-\text{Fe}_2(\text{SO})_4-\text{FeSO}_4$  usando técnica electroquímicas y experimentos de lixiviación. Los resultados de ambos métodos dicen que la oxidación de calcopirita muestra un clásico comportamiento activo-pasivo observados en metales pasivantes, usando técnicas potencioestáticas con electrodos masivos de calcopirita desde un potencial de 300-700 mV (SCE). La aplicación de esta técnica produce un comportamiento activo-pasivo bien definido y permite la determinación del potencial de pasivación para este material a diferentes temperaturas. Se determinó que el potencial de pasivación es dependiente de la temperatura, con una transición a los 50° C. A temperaturas mayores y menores que 50° C el potencial de pasivación no depende la concentración de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . En la región activa de potenciales, la corriente de oxidación muestra un sistemático aumento con el aumento de la temperatura cuando aumenta la acidez (2 a 100 g/l). En la zona crítica y pasiva la corriente aumenta con el aumento de la temperatura. La región transpasiva, que podría indicar la oxidación de calcopirita a covelita, depende fuertemente de la acidez y de la temperatura. Mientras más altas son las variables, más alto es el potencial de transpasivación.

## **1.6 BIOLIXIVIACION:**

Los microorganismos más utilizados en biolixiviación son:

- Mesófilos: microorganismos que crecen a temperatura ambiente (28-37°C)
  - (1) *Thiobacillus ferrooxidans*: obtiene su energía para crecer oxidando  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  y azufre.
  - (2) *Leptospirillum ferrooxidans*: tiene un comportamiento similar a *T. ferrooxidans* pero no es capaz de oxidar el azufre a sulfato.
  - (3) *Thiobacillus thiooxidans*: tiene una morfología similar a *T. ferrooxidans* pero no es capaz de oxidar  $\text{Fe}^{+2}$ . Esta bacteria

obtiene su energía oxidando azufre y compuestos solubles de azufre.

- Termófilos moderados: microorganismos capaces de crecer a temperaturas alrededor de 50°C.
  - (1) *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: tienen la capacidad de oxidar azufre y hierro.
- Termófilos extremos: son capaces de crecer a temperaturas en el rango de 65-80°C. Los termófilos extremos más importantes son del género *Sulfolobus*. Las especies de *Sulfolobus* que han sido aisladas son: *S. acidicaldarius*, *S. solfataricus*, *S. brierley*, *S. ambioalonus*, *S. metallicus* y presentan las siguientes propiedades:
  - (1) crecimiento anaeróbico junto con la reducción a azufre elemental en presencia de  $Fe^{+3}$ .
  - (2) crecimiento aeróbico junto con la oxidación de azufre
  - (3) temperatura óptima de crecimiento entre 65-70°C
  - (4) capaz de oxidar  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$  y azufre a sulfato.

En la tabla 1.1 se presenta la lista de todos los microorganismos acidófilos capaces de oxidar hierro y azufre (Watling (2006)).

La biolixiviación juega un importante rol en la extracción de metales en concentrados y minerales sulfurados refractarios. Tributsch (1999) propuso distintas estrategias de lixiviación bacteriana (Fig. 1.2) ya que la bacteria se adapta a diferentes sulfuros y ambientes de lixiviación. Algunos sulfuros simplemente se disuelven en una solución ácida o puede ser disueltos por la extracción de un electrón con  $Fe^{+3}$ . Esta es una situación favorable para una lixiviación indirecta, donde la bacteria no se adhiere a la superficie del sulfuro. Los sulfuros como la pirita no pueden ser disueltos fácilmente por este camino y se utiliza la lixiviación por contacto en que se rompe la estructura cristalina ya sea por la extracción de azufre (*At.ferrooxidans*) o por disolución electroquímica (*L. ferrooxidans*). Además se ha demostrado que la lixiviación

cooperativa es posible, donde la bacteria adherida al sulfuro y la bacteria libre en la solución cooperan. Este comportamiento podría favorecer la sobrevivencia de la bacteria proveyendo de energía química en presencia de una limitada superficie del sulfuro.

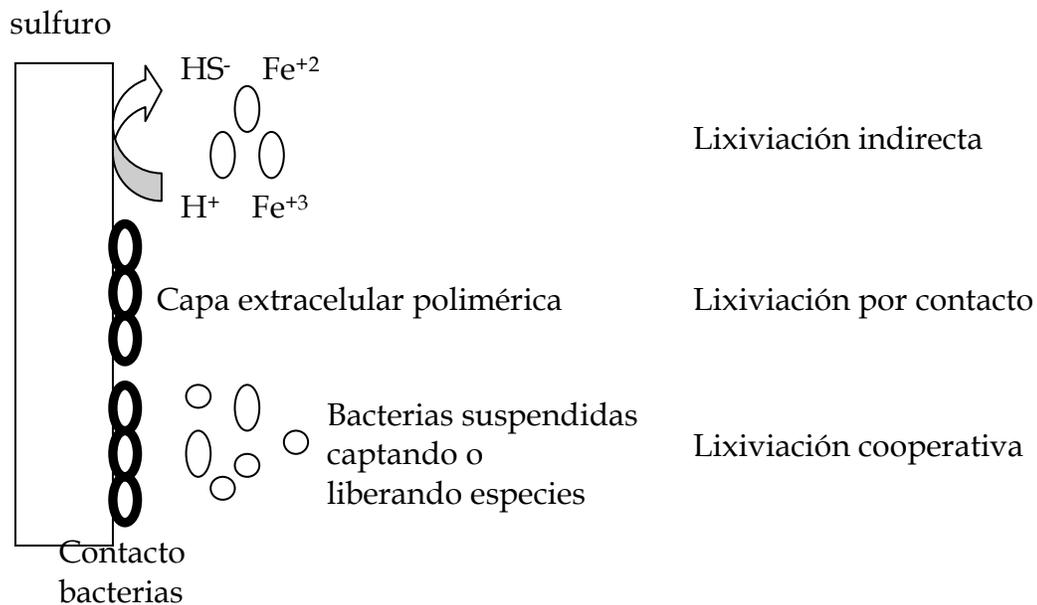
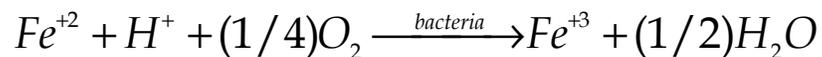


Fig. 1.2: esquema de los tres mecanismos utilizados para la biolixiviación de sulfuros: lixiviación indirecta, por contacto y cooperativo.

El principal mecanismo de la catálisis bacteriana en la disolución de minerales sulfurados es el indirecto y está basado en la oxidación bacteriana del ión ferroso con oxígeno disuelto de acuerdo con la reacción:



el ión férrico producido químicamente ataca el sulfuro por la siguiente reacción:



Tabla 1.1: Microorganismos acidófilos capaces de oxidar hierro y azufre.

Organism	Reported growth substrates	Characteristics
<i>Acidianus ambivalens</i>	S oxidation and reduction	Hyperthermophiles
<i>Acidianus brierleyi</i>	Sulphides	pH opt 1.5–2.5
<i>Acidianus infernus</i>	Poor, if any, Fe oxidation	
" <i>Acidianus tengchongensis</i> "		
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Mixotroph Fe oxidation and reduction Sulphides (poor)	Moderate thermophile pH opt 2
<i>Acidiphilium</i> spp	Obligate heterotrophs	Mesophiles
<i>Acidiphilium</i> SJH	S oxidation Fe(III) reduction	pH opt ~2–3
<i>Acidiphilium acidophilum</i>	Facultative autotroph S oxidation Fe(III) reduction	Mesophile pH opt ~2–3
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	Autotrophs	Mesophiles
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	S oxidation, sulphides	pH range 2–4
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	( <i>Af</i> , Fe(II) oxidation; Fe(III) reduction as a facultative anaerobe)	
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Mixotroph 3S oxidation, sulphides	Moderate thermophile pH opt 2–2.5
<i>Acidolobus aceticus</i>	Heterotroph S reduction to H <sub>2</sub> S	Hyperthermophile pH opt 3.8
<i>Alicyclobacillus</i> spp	S oxidation, sulphides	Mesophiles — moderate thermophiles
" <i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i> "	( <i>Ad</i> , facultative autotroph,;	pH 1.5–2.5
" <i>Alicyclobacillus tolerans</i> "	<i>At</i> , mixotroph, Fe(III) reduction)	
" <i>Ferrimicrobium acidiphilium</i> "	Heterotroph Fe(II) oxidation, sulphides Fe(III) reduction	Mesophile pH opt 1.7–1.8
<i>Ferroglobus placidus</i>	Fe oxidation	Thermophile pH neutral
" <i>Ferroplasma acidarmanus</i> "	Possibly autotroph	Moderate thermophiles
" <i>Ferroplasma cypreacervatum</i> "	Iron oxidation	pH range < 1–2
<i>Ferroplasma acidophilum</i>	Pyrite oxidation poor	
<i>Ferroplasma</i> MT17		
<i>Hydrogenobaculum acidophilus</i>	S, H oxidation to produce sulphuric acid	Thermophile pH opt 3–4
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Fe oxidation	Mesophiles, some thermo-tolerant strains
<i>Leptospirillum thermoferrooxidans</i>	Pyrite	pH range 1.6–1.9
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	Fe oxidation, pyrite	Mesophile pH opt 1.5–1.7
<i>Metallosphaera sedula</i>	S oxidation	Thermophiles
<i>Metallosphaera prunae</i>	Sulphides	pH 1–4
" <i>Metallosphaera hakonensis</i> "		
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	Fe(II) oxidation; Fe(III) reduction, Sulphides	Moderate thermophiles
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	S oxidation	pH 1–2.5
<i>Sulfolobus metallicus</i>	Strict chemolithoautotroph	Hyperthermophiles
" <i>Sulfolobus rivotincti</i> "	S oxidation, sulphides	Various pH in range 1–4.5
<i>Sulfolobus shibatae</i>		
" <i>Sulfolobus tokodaii</i>		
<i>Sulfolobus yangmingensis</i>		
" <i>Sulfolobus</i> " JP2 and JP3		
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Heterotrophs	Hyperthermophiles pH 2–4.5
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Not S oxidation	Hyperthermophile
<i>Sulfurococcus yellowstonensis</i>	S and Fe oxidation	Mesophile, halophile
<i>Thiobacillus prosperus</i>	S and Fe oxidation sulphides	pH opt 2 Mesophile
<i>Thiomonas cuprina</i>	S oxidation, sulphides	pH opt 3–4

Sand et al. (2001) propusieron dos diferentes mecanismos (mecanismo tiosulfato y mecanismo polisulfuro) de control para la disolución de minerales sulfurados: los minerales son degradados por ataque químico del ión férrico y/o por protones en la estructura del cristal. Los iones férricos son entregados por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de las bacterias, que están acomplejadas con residuos de ácido glucurónico. El mecanismo y la química de la degradación está determinado por la estructura del mineral.

Los disulfuros pirita ( $\text{FeS}_2$ ), molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), tungstenita ( $\text{WS}_2$ ) son degradados vía tiosulfato (mecanismo tiosulfato). Los iones férricos son los agentes oxidantes exclusivos para la disolución. El tiosulfato es degradado en un proceso cíclico a sulfato y el azufre elemental es un subproducto (ver Fig.3). Esto explica por que sólo las bacterias hierro-oxidantes son capaces de oxidar estos sulfuros.

Los minerales galena ( $\text{PbS}$ ), esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), hauerita ( $\text{MnS}_2$ ), oropimente ( $\text{As}_2\text{S}_2$ ) y rejalgar ( $\text{As}_4\text{S}_4$ ) son degradados por ion férrico y el ataque de protones (mecanismo polisulfuro). Por lo tanto, los pasos intermedios son polisulfuros y azufre elemental. La disolución procede vía radical  $\text{H}_2\text{S}^{*+}$  y polisulfuros a azufre elemental, estos minerales son degradados por todas la bacterias capaces de oxidar compuestos de azufre. Las cinéticas de estos procesos dependen de la concentración de ion férrico y de la solubilidad del mineral (Fig. 4).

Mecanismo tiosulfato:

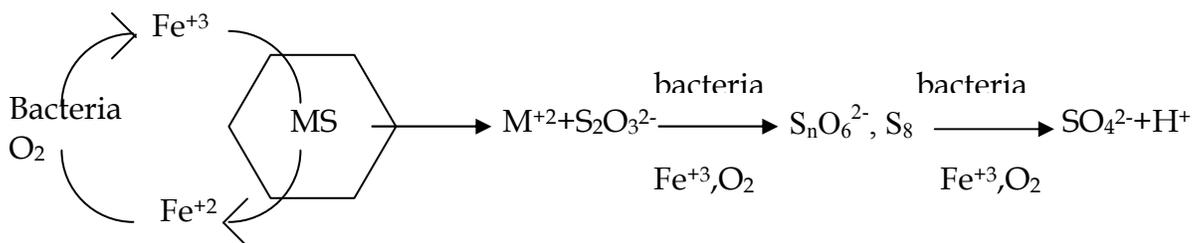


Fig.1.3: Esquema del mecanismo tiosulfato en la biolixiviación de sulfuros.

### Mecanismo polisulfuro:

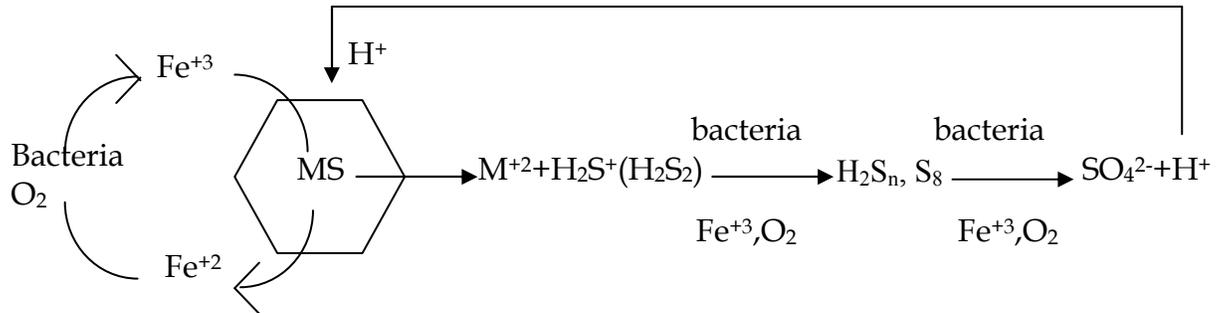


Fig.1.4: Esquema del mecanismo polisulfuro en la biolixiviación de sulfuros.

Existen varios factores que afectan la cinética de biolixiviación (Das et al. (1999)) y estos son:

- (1) actividad de los microorganismos,
- (2) concentración bacteriana,
- (3) pH y concentración de  $Fe^{+3}$ ,
- (4) suministro de oxígeno,
- (5) capa producto sobre la superficie del mineral,
- (6) interacción galvánica.

Por otro lado, Deveci (2004) determinó que existe un efecto del tamaño de partículas y la forma de los sólidos sobre la viabilidad de bacterias mesófilas en reactores agitados. En ausencia de sólidos el tipo de agitador y su velocidad tienen un efecto adverso limitado en las células, pero en presencia de sólidos (20% w/w) una alta velocidad de agitación produce una rápida disminución de la viabilidad de las células debido aparentemente a la acción de las partículas sólidas sobre las células. La pérdida de viabilidad (desactivación) de las células depende del tipo de agitador, del tamaño y la forma de los sólidos (ya que se encontró que las partículas esféricas desactivan las células más rápido que las partículas de forma irregular).

### **1.6.1 BIOLIXIVIACION DE CALCOPIRITA:**

Los procesos de biolixiviación a temperatura ambiente son convenientes para el tratamiento de sulfuros de cobre secundarios ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ,  $\text{CuS}$ ,  $\text{CuFe}_4\text{S}_5$ ) pero muy ineficientes en el ataque a la calcopirita, por su naturaleza refractaria a la lixiviación química y bacteriana. La razón principal del carácter refractario de este sulfuro es la formación de una capa pasiva sobre la superficie del mineral, que limita la difusión de reactivos y productos de reacción. Sin embargo, la naturaleza exacta de la capa pasiva está todavía en discusión.

Una revisión de la literatura de la biolixiviación de la calcopirita revela importantes aspectos del mecanismo de disolución de este sulfuro bajo la acción de microorganismos. Lopez-Juarez et al. (2006) realizaron un estudio electroquímico con calcopirita natural en presencia de microorganismos mesófilos, obtenidos de la microflora de un concentrado de calcopirita, en presencia y en ausencia de iones de plata. Para esto se realizaron experimentos de biolixiviación en matraces agitados de 250 ml a  $35^\circ\text{C}$  y 150 RPM en medio nutriente al que se le agregó  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ . La adición de iones de plata se realizó sólo en los test de biolixiviación (las mediciones electroquímicas se realizaron libres de iones de plata). Los resultados muestran pequeñas diferencias como que en presencia de plata la corriente catódica y anódica es más grande que cuando no la hay. Más aún, la pasivación de la calcopirita ocurre antes en ausencia de los iones de plata. Además, la preonda que se observa en la disolución anódica de la calcopirita no se observa en los electrodos biolixiviados en ausencia de iones de plata, pero los electrodos tratados en presencia de iones de plata se observaron aumentos de corriente.

Akcil et al. (2007) estudiaron la capacidad de un cultivo puro y mixto de bacterias mesófilas en la biolixiviación de un concentrado de pirita-calcopirita en matraces erlenmayer de 250 ml a pH 1,6, 150 rpm a  $30^\circ\text{C}$ . Se determinó que en un cultivo puro *Acidithiobacillus ferrooxidans* tiene una mayor capacidad de biolixiviación que *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*. En el caso de los cultivos mixtos Mix A (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*,

*Acidithiobacillus thiooxidans*) y Mix B (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*) muestran una mayor extracción de cobre que los casos puros, obteniéndose la mejor recuperación para el caso Mix A. Los resultados también indican que al aumentar la densidad de pulpa (1-5%) afecta negativamente el proceso de biolixiviación en cultivos mixtos y puros.

Rodríguez et al. (2001 y 2003) determinaron que tener el hierro en el estado de oxidación +3 ( $\text{Fe}^{+3}$ ) es fundamental para la biolixiviación de la calcopirita ya que el  $\text{Fe}^{+3}$  controla la velocidad relativa de las reacciones de oxidación. Además, químicamente, el ataque de la calcopirita está controlado por el azufre elemental y sulfuros de cobre intermedios no-estequiométricos formados en la superficie de la calcopirita, que son menos reactivos que el sulfuro original. Estos sulfuros intermedios provocan un efecto de barrera a bajas temperaturas ( $35^{\circ}\text{C}$ ), pero al aumentar la temperatura ( $68^{\circ}\text{C}$ ) los sulfuros intermedios no constituyen una barrera para la disolución. Además, estos autores determinaron que la biolixiviación de concentrados de calcopirita es una cooperación simultánea entre biolixiviación por contacto de la fase pirítica del mineral (es decir, pirita presente en el concentrado), posiblemente sea por el mecanismo indirecto vía tiosulfato, y biolixiviación indirecta de calcopirita, probablemente vía polisulfuro y azufre elemental. También confirmaron que existe una relación entre el aumento de la adherencia y el aumento en la velocidad de disolución del mineral en bacterias mesofílicas (mezcla de *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum spp*) y con el microorganismo *Sulfolobus spp* (Rodríguez et al. (2003)). Estos experimentos fueron realizados en matraces agitados de 250 ml y en birreactores agitados de 500 ml y el conteo de células fue determinado en la fase líquida utilizando una cámara de conteo Thoma. El proceso de biolixiviación se divide en tres etapas: una etapa inicial en que la células se adhieren a la fase pirítica (que tiene una gran importancia pues se obtienen grandes tasas de disolución), una segunda etapa en que la adherencia bacteriana disminuye debido a la saturación de células adheridas a la superficie (esta limitación unida a la presencia de ferroso en la solución produce un aumento en la concentración de células en la solución). Finalmente, una tercera etapa en que se produce un balance entre las células adheridas y en solución que lleva a un mecanismo cooperativo. En este caso, las células adheridas atacan la fase pirítica del

mineral generando ferroso, que es oxidado por las células en la solución, regenerando el agente oxidante (férico) para una biolixiviación indirecta del mineral.

Stott et al. (2003) observaron que las mayores tasas de solubilización de cobre en un concentrado de calcopirita ocurren a elevadas temperaturas ( $> 65^{\circ}\text{C}$ ) y potenciales redox bajo 550 mV/(Ag/AgCl) en presencia de microorganismos. Estos experimentos se realizaron con 11 distintas cepas de microorganismos mesófilos y termófilos y la lixiviación de la calcopirita se realizó en matraces agitados a la temperatura y condiciones necesarias para el óptimo crecimiento de los microorganismos. El aumento de la velocidad de disolución de cobre en respuesta al aumento de la temperatura puede atribuirse al aumento en la velocidades de reacción entre la superficie y los reactantes (como  $\text{Fe}^{+3}$  y ácido), además de la habilidad de microorganismos acidófilos específicos de lixiviar el mineral o regenerar un reactante. Se demostró que el rol principal en la biolixiviación de microorganismos es mantener niveles suficientemente altos de reactantes como  $\text{Fe}^{+3}$  y ácido para permitir el máximo de disolución de mineral dada la temperatura óptima de crecimiento. Sin embargo, elevadas concentraciones de  $\text{Fe}^{+3}$  perjudican la continuidad de la lixiviación porque se promueve la depositación de jarosita sobre la superficie de la calcopirita. Por otro lado, Córdoba et al. (2008) determinaron que el rol de los microorganismos en la biolixiviación es regenerar el agente lixivante y disolver el azufre elemental formado en el proceso (mecanismo indirecto). Sin embargo, la reacción química y la difusión de iones férricos también juegan un importante rol como un proceso de lixiviación química asistido por bacterias hierro y azufre oxidantes.

La formación de jarosita es un factor que contribuye a la reducción de la velocidad de lixiviación de la calcopirita. Mientras la biolixiviación a elevadas temperaturas favorecen la disolución de cobre, también promueve una extensa depositación de jarosita. Stott et al. (2001) estudiaron modificar el medio nutriente del arquea *Sulfolobus metallicus* para prevenir la formación de jarosita y de esta manera optimizar la lixiviación de un concentrado de calcopirita. Se determinó que al aumentar la acidez del medio sólo se obtuvo un marginal aumento en la recuperación de cobre (debido a una reducción en la cantidad de jarosita formada). Tampoco se pudo prevenir la formación de jarosita

limitando las concentraciones de cationes monovalentes y el sulfato ya que la fase jarosita ocurre en la superficie del mineral como parte del proceso de oxidación del sulfuro. Determinaron además que la depositación de la jarosita ocurre en dos etapas: una formación inicial de una fase jarosita en la superficie del mineral seguido de una precipitación en masa desde la solución a la superficie del mineral debido a un aumento de la concentración de  $\text{Fe}^{+3}$  hasta el punto que se produce saturación.

La disolución de calcopirita es promovida por el uso de microorganismos termofílicos siendo *A. brierleyi* y *S. metallicus* (oxida  $\text{Fe}^{+2}$  y azufre) los que alcanzan una mayor recuperación de cobre seguidos por *Metallosphaera prunae* (no oxida  $\text{Fe}^{+2}$ ), luego microorganismos termófilos moderados y finalmente los microorganismos mesófilos (Stott (2003)). Además, se determinó la presencia de varios sulfuros y especies de cobre y hierro en la superficie de la calcopirita después de una disolución inicial en presencia de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (50°C) y *Sulfolobus metallicus* (65°C). Estos son:  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{S}_2^{2-}$ ,  $\text{S}^0$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ . (Parker et al. (2003)). Posteriormente, Sandström et al. (2005) determinaron que la biolixiviación con *Sulfolobus metallicus* y la lixiviación química de la calcopirita aumenta la cinética y el rendimiento a un potencial de 420 mV vs Ag/AgCl comparado con un potencial de 600 mV vs Ag/AgCl. Mediante XPS determinaron diferencias sobre la superficie de la calcopirita dependiendo de las condiciones de lixiviación. Sobre la capa superficial de la calcopirita lixiviada químicamente se observa una deficiencia de metal, en cambio en el caso de la biolixiviación se observa una lixiviación preferencial de los iones azufre. La lixiviación a altos potenciales redox lleva a una lixiviación selectiva de hierro, mientras que a bajos potenciales la lixiviación es preferentemente del cobre.

Un factor que aumenta la disolución de la calcopirita a través de *Sulfolobus BC* es la presencia de plata que disminuye el potencial de descomposición del electrodo y favorece la electro-disolución. El tratamiento por largos periodos de tiempo, más de dos semanas, no mejora la reactividad de la superficie. Sin embargo, en las etapas iniciales del proceso, la baja reactividad de los electrodos esta probablemente relacionado con el efecto tóxico de la plata en los microorganismos (Muñoz et al. (1998)).

Por otro lado, Konishi et al. (1999) estudiaron la cinética de lixiviación de la calcopirita en tanques agitados en serie a través de *Acidarius brierleyi* a 65°C, y determinaron que la adsorción de estos microorganismos a la calcopirita alcanza el equilibrio a los 20 minutos de exposición al mineral. Esto se realizó mediante un ajuste de parámetros en una isoterma de Langmuir. Mediante este método fue posible determinar que la biolixiviación directa de las células adsorbidas fue predominante mientras que la lixiviación química del ión férrico fue despreciable. Además, *A. brierleyi* a 65°C solubiliza la calcopirita mucho más rápido que *At. ferrooxidans* a 30°C.

Otro microorganismo termofílico capaz de lixiviar concentrados de calcopirita es *Sulfolobus rivotincti* provocando fuertes transformaciones superficiales en comparación a una muestra atacada con  $\text{Fe}^{+3}$  sin microorganismos (Gómez et al. (1996)). A través de SEM fue posible observar que sobre la superficie de la calcopirita el ataque comienza en hoyos o defectos del mineral y termina atacando toda la superficie del mineral. Como consecuencia de esto, las muestras presentan profundos huecos y una superficie muy rugosa. Además se observó que la presencia de  $\text{Fe}^{+2}$  aumenta la actividad del microorganismo pero no mejora la biolixiviación de la calcopirita. Se determinó que el mecanismo de lixiviación es cooperativo ya que *S. rivotincti* actúa directamente sobre la superficie de la calcopirita y produce  $\text{Fe}^{+2}$  que más tarde es oxidado a  $\text{Fe}^{+3}$  que aumenta el ataque a través del mecanismo indirecto. Además, Muñoz et al. (1995) estudiaron el efecto catalítico de estos microorganismos en la disolución anódica de una muestra masiva de calcopirita. Al aumentar el potencial desde el potencial al que comienza la lixiviación de la calcopirita en presencia de los microorganismos, el ataque a la superficie del mineral se ve favorecido. Los hoyos se ubican en los sitios débiles donde se produce una corriente de polarización anódica suficientemente alta en la superficie. También se observó que las bacterias sólo se adhieren a las muestras sin tratamiento electroquímico. Este proceso de biolixiviación se ve desfavorecido en presencia compuestos de cloro y de plata, sólo el bismuto aumenta la velocidad de lixiviación del cobre (Gómez et al. (1999)).

La biolixiviación continua de calcopirita utilizando una mezcla de microorganismos termofílicos (microorganismos tipo *Sulfolobus* y *Acidianus infernus*) posee factores

limitantes como la sensibilidad de las bacterias a la agitación (y aireación) combinado con una alta concentración de sólidos. Otros factores limitantes son la concentración de los nutrientes y la eficiencia de la transferencia de oxígeno ya que se sabe que la concentración de oxígeno disuelto en el equilibrio disminuye con el aumento de temperatura (d'Hugues et al. (2002)). Una alternativa posible a los bio-reactores es la biolixiviación en pilas pues proveen una alta temperatura ambiental que puede ser mantenida en la pila sin calentamiento externo. Se realizaron pruebas en pilas pequeñas y al ir aumentando la temperatura hasta 70°C se introdujeron exitosamente cultivos mesófilos y termófilos en que se obtuvo una recuperación de cobre del 90% en 100 días (Petersen y Dixon (2002)).

En resumen, hasta el momento, se ha estudiado el efecto de la temperatura en la formación de la capa pasiva y la recuperación de cobre agregando iones  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  y distintos catalizadores como la plata. También, se ha determinado la capacidad de biolixiviación de la calcopirita (en términos de recuperación de cobre) con distintos microorganismos mesófilos y termófilos. Además, se ha caracterizado los compuestos de azufre y hierro que se forman sobre la superficie de la calcopirita una vez terminadas las experiencias de (bio)lixiviación.

Lo que no ha sido reportado hasta el momento es el mecanismo de disolución de la calcopirita en presencia de microorganismos termófilos, es decir, que compuestos intermedios solubles se producen a partir de la disolución de la calcopirita en presencia de estos microorganismos, compuestos que además permiten el desarrollo de estos termófilos, ni tampoco que efecto tiene la temperatura por sí sola en la formación de distintos compuestos sobre la superficie de la calcopirita (a temperatura ambiente y a 70°C) que hace que este mineral sea lixiviado por células termófilas más fácilmente.

### **1.6.2 BIOLIXIVIACION DE AZUFRE:**

Espejo y Romero (1987) estudiaron la cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre azufre elemental en perlas en un cultivo batch. Este estudio se realizó incorporando fósforo radioactivo a las bacterias adsorbidas y libres. Los

resultados obtenidos indican un crecimiento exponencial inicial de las bacterias adheridas hasta la saturación de la superficie sensible, seguido por una liberación lineal de las bacterias a la solución debido a la replicación de las bacterias adsorbidas. Además se determinó que las bacterias liberadas desde las perlas son incapaces de multiplicarse y el medio de cultivo empleado pierde viabilidad con una vida media de 3.5 días.

Shrihari et al. (1993) mostraron a través del uso de un reactor con dos compartimientos unidos por una membrana (donde uno de los compartimientos contiene el azufre elemental y *Acidithiobacillus ferrooxidans* y en el segundo compartimiento sólo las bacterias *At. ferrooxidans*) que las células que no están adheridas al azufre son también capaces de crecer (segundo compartimiento) debido a la existencia de estados parcialmente oxidados del azufre. Determinaron a través de mediciones de absorbancia y técnicas de polarografía y voltametría cíclica que estos compuestos son tiosulfato y trazas de sulfito.

En el caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Sulfolobus metallicus* es posible calcular la velocidad de consumo de azufre midiendo la evolución del pH y usando el rendimiento de biomasa (Patino et al. (2003))

$$-r_{S^0} = \frac{r_X}{Y_{SX}}$$

donde  $r_S$  es la velocidad de consumo de azufre,  $r_X$  es la velocidad de producción de biomasa,  $Y_{SX}$  es el rendimiento.

### **1.6.3 BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA:**

Un caso que ha sido largamente estudiado es la biolixiviación la pirita con un amplio rango de bacterias acidófilas y arqueas que pueden acelerar la disolución oxidativa de minerales sulfurados por sus habilidades de oxidar formas reducidas de hierro o azufre y a continuación se presenta un resumen con los principales resultados.

Rodríguez et al (2003) utilizaron dos tipos de cultivos para biolixiviar y realizar test de adherencia microbiana en concentrados de pirita. Uno de ellos fue una mezcla de microorganismos mesofílicos (mayormente *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* spp.) a 35°C y el otro fue una mezcla de microorganismos termofílicos (mayoritariamente *Sulfolobus* spp.) a 68°C. Para realizar estos tests se utilizaron matraces Erlenmeyer agitados a 150 rpm a 35 y 68°C con 100 mL de medio nutriente y 5 g de concentrado a pH 1.7. Además los tests de adherencia microbiana se realizaron a distintos tiempos dentro de la primeras 24 h (el número de células se determinó en la fase líquida) y otro test de adherencia se realizó en tanques agitados y aireados en las mismas condiciones que en los experimentos de biolixiviación, la muestra líquida se tomó cada dos o tres días.

Rodríguez et al (2003) determinaron que el estado de oxidación del hierro disuelto juega un importante rol en la biolixiviación de pirita controlando la velocidad relativa de las reacciones de oxidación en el proceso. Hay relación directa entre la velocidad de adherencia de las células a la superficie del mineral y la velocidad de disolución de la pirita. Para esto los autores ajustaron los datos obtenidos al modelo cinético de adherencia microbiana de Zobell (1943). Se comprobó que es necesario un número alto de células adheridas para obtener altas velocidades de disolución durante el proceso de biolixiviación de la pirita. La disolución de pirita está controlada por la quimisorción competitiva entre los iones ferroso y férrico en la superficie del mineral. La acumulación de ferroso produce una barrera difusiva en el mineral para el ataque de los iones férricos. Esta acumulación de ferroso sobre la superficie es una consecuencia de la inhibición de la capacidad oxidativa de los microorganismos para altas concentraciones de férrico (>16 g/L). El proceso de biolixiviación de pirita es cooperativo, probablemente a través del mecanismo vía tiosulfato.

Los concentrados de pirita son oxidados durante el crecimiento de una variedad de microorganismos acidófilos en un amplio rango de temperatura. Se comparó un cultivo mesofílico compuesto por *Acidithiobacillus ferroxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* (que son las principales bacterias oxidadoras de hierro) a 30°C, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* a 48°C y un cultivo tipo *Sulfolobus* (arquea termoacidofílica) a

84°C (Clark y Norris (1996)). A bajas concentraciones de mineral la velocidad de disolución de la pirita es proporcional a la temperatura. Sin embargo, el uso de elevadas temperaturas para aumentar la velocidad de disolución por sobre las obtenidas por mesófilos parece posible sólo con microorganismos termofílicos moderados ya que el crecimiento de *Sulfolobus BC* es inhibido a altas concentraciones de mineral.

Kinzler et al. (2003) estudiaron las funciones de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que parece ser: (i) mediar la adherencia a la superficie del sulfuro, (ii) concentrar los iones férricos por acomplejamiento a través de ácidos urónicos u otros residuos en la superficie del mineral, lo que lleva a un aumento en la disolución del sulfuro. Estos autores determinaron la importancia de los iones férricos acomplejados por el EPS en la diferencia de la actividad oxidativa de la pirita, datos preliminares indican que en *Acidithiobacillus ferrooxidans* con una gran cantidad de ión férrico en su EPS posee una mayor actividad oxidativa que aquella con menor cantidad de férrico.

Se observó además que es posible lixiviar pirita a  $\text{pH} < 1$  con la bacteria acidofílica tipo *Sulfobacillus* (mesofílica y extremadamente tolerante a la acidez) mientras que con un cultivo de *At. ferrooxidans* se observó una rápida mortalidad de las bacterias al bajar el pH de 1.5 a 1.0 (Yahya A. y Johnson D. (2002)).

Los patrones y el grado de adherencia de *At. ferrooxidans* a la pirita sintética dependen del grado de cristalización del sulfuro, que varía con la temperatura de sulfuración (Sanhueza et al (1999)). En un rango bajo de temperatura de sulfurización (250-350°C) se forma mayoritariamente pirita amorfa y la adherencia se observa como clusters densamente empacados de bacterias. En un rango más alto de temperaturas (400-450°C) predomina mayoritariamente pirita cristalizada, donde la bacteria está aislada o formando pequeñas cadenas. El porcentaje de pirita cubierta con *At. ferrooxidans* decrece con el aumento de la temperatura de sulfuración (donde la pirita está completamente cristalizada). Los microorganismos parecen adherirse

preferencialmente a las zonas menos cristalizadas o amorfas de los films de pirita, donde hay una mayor disponibilidad de azufre para la oxidación bacteriana.

En el caso de la pirita natural, *At. ferrooxidans* cataliza la disolución de pirita a través de un mecanismo que involucra la oxidación bacteriana del ión ferroso en solución, la depolarización de la reducción del ión férrico en el sulfuro y la formación de hoyos dejados por la adherencia de las bacterias al sulfuro. Los hoyos se ubican en los sitios débiles en la estructura de la pirita, esto ocurre sólo cuando la concentración de ión férrico en solución induce un adecuado nivel polarización anódica (Vargas et al (1993)).

Además, en la lixiviación de la pirita natural con *At. ferrooxidans*, *Ferroplasma acidarmanus* y en presencia de  $Fe^{+3}$  (sin microorganismos), Edwards et al. (2001) observaron en los tres casos la formación de hoyos con forma elíptica de 1-2  $\mu m$  de largo sobre la superficie (estos experimentos se realizaron con la pirita molida y en bloque). El hecho que con tres experimentos diferentes se produzca la misma formación de hoyos sugiere que la disolución de este mineral está determinada por las reacciones del  $Fe^{+3}$  en la superficie más que por reacciones en la interfase célula-mineral.

Ndlovu y Monhemius (2003) estudiaron la influencia de la orientación cristalográfica en el mecanismo de la biolixiviación de la pirita. Estos experimentos se realizaron en presencia y ausencia de *At. ferrooxidans* comparando la disolución superficial de la pirita en condiciones similares. Para esto las condiciones de Eh en la solución estéril se igualaron a las producidas por la lixiviación bacteriana por medio de una celda de electrólisis. Los autores determinaron que existe una relación entre la adherencia de las bacterias y los patrones de lixiviación iniciales (hoyos en la superficie). Además, proponen que el paso más importante en las primeras etapas de la lixiviación es el reconocimiento seguido de la adherencia de los microorganismos a sitios activos en la superficie en la superficie inicial. Este proceso controla la progresión de la lixiviación y define el tipo y la evolución de los hoyos.

Rojas-Chapana y Tributsch (2003) determinaron que la habilidad de lixiviar de *Leptospirillum ferrooxidans* va más allá que la mera oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ . La adherencia de esta bacteria a la pirita crea un fenómeno interfacial y puntos localizados de corrosión. En el proceso de lixiviación estas bacterias liberan una sustancia polimérica extracelular (EPS) que almacena nanopartículas de pirita. Además, la presencia de  $\text{Fe}^{+3}$  por sí sólo no induce ninguna forma local de corrosión en la pirita, lo que indica que las reacciones que tienen lugar entre la bacteria adherida y la superficie de la pirita bajo esta son las responsables por los patrones de lixiviación observados.

Bengrine et al. (2001) desarrollaron un método de adherencia de bacterias quimolitotróficas seleccionadas a la superficie de un mineral en presencia de otra bacteria de tamaño, forma y morfología similar por fluorescencia. Con este método fue posible observar que la adhesión temprana de *Leptospirillum ferrooxidans* tiene un efecto muy pequeño en la adhesión posterior de *At. ferrooxidans* a la misma muestra de pirita. Esta observación sugiere que ambos microorganismos reconocen y se adhieren a distintos sitios sobre la superficie de la pirita.

Por otro lado, Nemati et al. (2000) observaron que la distribución de tamaño de partículas del sulfuro afecta la velocidad en la biolixiviación de pirita por *Sulfolobus metallicus*. Al disminuir el tamaño de las partículas aumenta la velocidad de lixiviación sin llevar a cambios en la morfología ni en la cinética de crecimiento de las células, pero si las partículas son muy finas aparentemente causan daño en la estructura de las células, lo que lleva a una disminución en la velocidad de lixiviación. Estos resultados indican que *Sulfolobus metallicus* es muy sensible a las condiciones hidrodinámicas como intensa agitación, aireación y atrición. Acevedo et al. (2004) determinaron las condiciones óptimas para la lixiviación de concentrado de pirita en tanques agitados en contacto con *Sulfolobus metallicus* es que la densidad de pulpa debe ser 7.8% y el tamaño de partícula 35  $\mu\text{m}$ .

Mikkelsen et al. (2007) estudiaron la biolixiviación de pirita por *Acidianus brierleyi*, *Metallosphaera sedula* y *Sulfolobus metallicus* en matraces agitados de 250 ml a 65°C durante 60 días. Los resultados mostraron que *M. sedula* lixivió el 63% del hierro

presente en la pirita, seguido de *S. metallicus* con el 54% y finalmente *A. brierleyi* con un 51%. Además, este estudio indicó para estos tres microorganismos la pirita se oxida a través del mecanismo de lixiviación indirecto a un alto potencial redox que ayuda a la solubilización del  $\text{Fe}^{+2}$  y a la oxidación de la pirita.

En resumen, hasta el momento se ha investigado ampliamente la biolixiviación de minerales como pirita y calcopirita con microorganismos mesofílicos y se ha demostrado que la biolixiviación de los minerales se ve favorecida al aumentar la temperatura pero existe poca información respecto a la biolixiviación de estos minerales con microorganismos termofílicos extremos, aunque estos microorganismos (*Sulfolobus metallicus*) ya se han utilizado industrialmente, por eso el principal objetivo de este trabajo es determinar el efecto que producen estos microorganismos sobre la reducción de compuestos de azufre y sobre la oxidación de ión ferroso en el aumento total de la velocidad de lixiviación de la calcopirita, ya que se ha determinado que existen otros factores que afectan la velocidad de lixiviación de la calcopirita como es el oxígeno disuelto (Jordan et al. (2005)).

## **1.7 OBJETIVOS**

Objetivo general:

Estudiar el mecanismo de catálisis en la biolixiviación de calcopirita con *Sulfolobus metallicus*.

Objetivos específicos:

1. Identificar tipos de actividad oxidativa del *Sulfolobus metallicus* durante la biolixiviación de calcopirita.
2. Estudiar la influencia catalítica de la adherencia del *Sulfolobus metallicus* al sulfuro.

3. Determinar la relación entre la cristalinidad y morfología de la calcopirita sobre el mecanismo de catálisis.
4. Determinar un mecanismo cinético de lixiviación de calcopirita con *Sulfolobus metallicus*.

## **CAPITULO 2:**

### **METODOLOGÍA Y DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL**

#### **2.1 MATERIALES:**

1. Experimentos de adherencia: se utilizó calcopirita sintética y calcopirita natural. La composición superficial de la calcopirita sintética es: 26% Cu, 27% Fe y 47% S determinada por EDS y se utilizó para la realización de dos tipos de experimentos:

- Mineral masivo: placas de calcopirita se montaron sobre una resina epóxica, posteriormente la superficie fue pulida con lija de 400, 600, 1500 y alúmina de 1  $\mu\text{m}$ . Finalmente, la briqueta se lavó con acetona, alcohol y agua en un baño de ultrasonido.
- Mineral molido: la calcopirita fue lavada 10 minutos en HCl 5N y posteriormente se molió.

Se realizaron difractogramas (fig. 2.1) de la calcopirita pulida y sin pulir, en donde se observa que al pulir la calcopirita aparece un segundo pico que indica que el pulido induce cambios superficiales debido a dislocaciones.

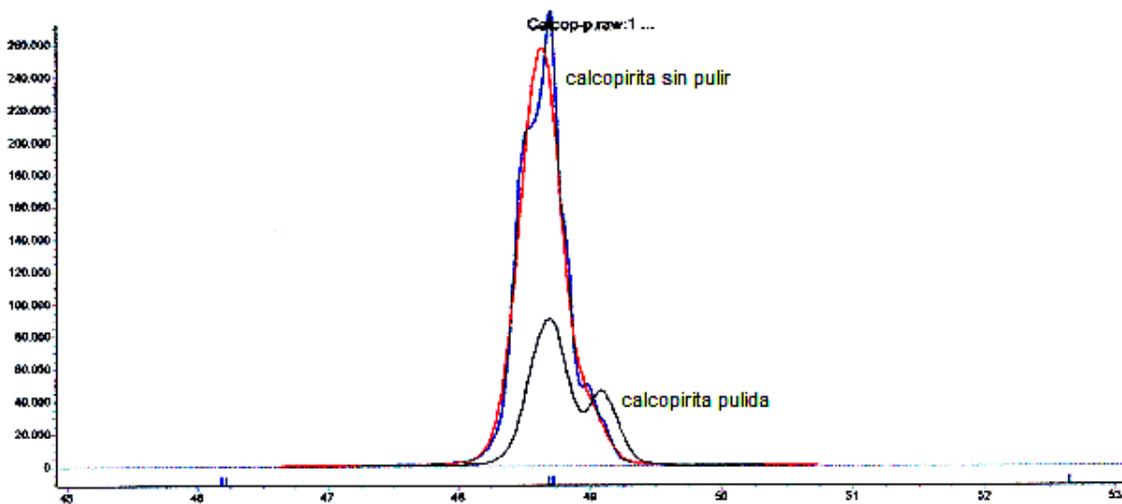


Figura 2.1: Difractograma de calcopirita sintética pulida y sin pulir.

Además, se utilizó calcopirita natural de Andina que fue molida y se separó la fracción entre 80-120# y lavada durante 10 min en HCl 5N. La composición del mineral es: Cu: 32.07, Fe: 31.59 y S: 36.35 % peso (determinado por DRX-Rietveld).

2. Experimentos para determinar el mecanismo de acción de los microorganismos: se utilizó calcopirita natural de Andina que fue molida y separada a 80-120# y lavada durante 10 min en HCl 5N.

### **2.1.1 MICROORGANISMOS Y MEDIO DE CULTIVO:**

Se utilizó un cultivo de *Sulfolobus metallicus* crecido en calcopirita a 70°C. El medio de crecimiento fue medio Norris: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4 g/l, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g/l. Los microorganismos fueron recuperados con un filtro millipore® de 1 µm y resuspendidos en 10 ml de medio Norris. El conteo de los microorganismos se realizó en una cámara de conteo Petroff-Hausser.

## **2.2 EXPERIENCIAS:**

### **2.2.1 ADHERENCIA:**

Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmayer de 250 ml, en donde se colocó la muestra de mineral sintético (masivo o 1 gr de mineral molido) en contacto con 100 ml de medio de cultivo con una cantidad mayor a 1\*10<sup>8</sup> bacterias/ml de microorganismos durante distintos periodos de tiempo. El matraz se colocó en un shaker a 150 RPM y 70°C.

Las muestras de calcopirita (masiva o molida) con los microorganismos adheridos, se sometieron a un secado de punto crítico y luego, fueron analizados con un microscopio electrónico de barrido con un detector EDS.

Además, se realizaron tres experimentos en matraces Erlenmayer de 250 ml de adherencia de *S. metallicus* sobre calcopirita natural, para esto, los matraces fueron inoculados con distintas cantidades de microorganismos iniciales. Los tres experimentos se describen a continuación:

- **M1:** 100 ml medio Norris pH 1.5 1 gr calcopirita natural y  $1.6 \cdot 10^8$  células/ml iniciales
- **M2:** 100 ml medio Norris pH 1.5 1 gr calcopirita natural y  $1 \cdot 10^8$  células/ml iniciales
- **M3:** 100 ml medio Norris pH 1.5 1 gr calcopirita natural y  $6 \cdot 10^7$  células/ml iniciales

Los matraces se colocaron en un shaker durante 14 días a 70°C y 150 RPM. Durante el experimento se monitoreó pH, Eh, población planctónica por recuento directo sobre una celda Petroff-hausser y la población adherida al mineral se determinó a través de SEM. Además, se midió cobre, hierro total y sulfato por absorción atómica, hierro (total y  $\text{Fe}^{+2}$ ) por espectrofotometría UV-Visible y compuestos de azufre por HPLC.

### **2.2.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS:**

Se realizaron dos tipos de experimentos: en un reactor de cámara doble y mediciones de rugosidad.

#### **2.2.2.1 Mediciones de rugosidad:**

A dos muestras de calcopirita masiva y pulida se les hizo una grieta a cada una y con un perfilómetro. Se midió la rugosidad de ambas muestras. Luego, una muestra se colocó en medio Norris abiótico y la otra en contacto con los microorganismos y nuevamente, en ambas muestras se midió la rugosidad.

### 2.2.2.2 Montaje reactor de cámara doble:

Se colocó dentro de un matraz Erlenmayer de 250 ml un tubo de polipropileno de alta densidad hueco en que al final del tubo en se coloca un filtro millipore ® de 0.1 µm, la capacidad tubo es de 40 ml de medio Norris y en el interior del matraz se coloca 100 ml del medio. A continuación se presenta un diagrama del montaje (fig. 2.2)

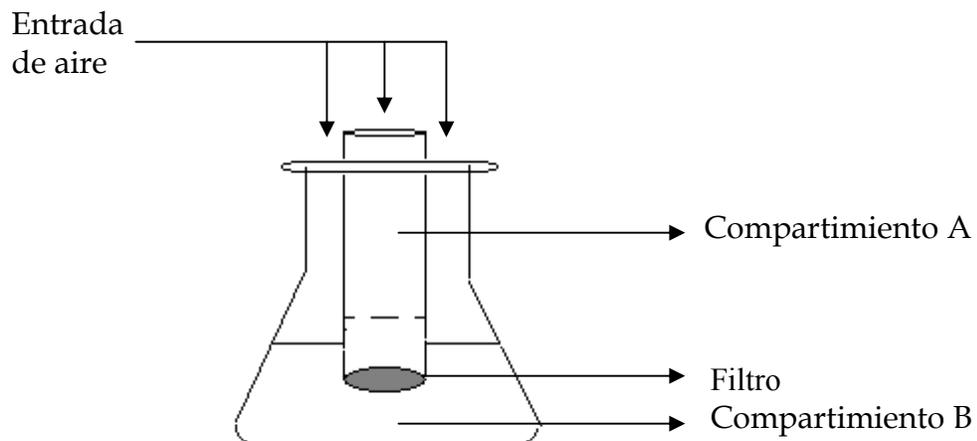


Fig. 2.2: Montaje experimental de reactor de cámara doble.

Para determinar el mecanismo de acción de *Sulfolobus metallicus* sin hierro inicial en la solución se realizaron cuatro tipos de experimentos:

- (1) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó 1 gr de Calcopirita y 100 ml de medio Norris en presencia de aire.
- (2) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó 1 gr de Calcopirita y 100 ml de medio Norris en una atmósfera de nitrógeno.
- (3) En un reactor de doble cámara (Figura 1) se colocó en el compartimiento A medio y  $3 \cdot 10^8$  bact/ml iniciales y en el compartimiento B medio y  $9 \cdot 10^7$  bact/ml iniciales.
- (4) En un reactor de doble cámara, en el compartimiento A se colocó medio Norris y  $1 \cdot 10^8$  bact/ml iniciales y en el compartimiento B medio Norris.

Los 4 experimentos se colocaron en el shaker durante 16 días. Se monitorearon el pH, la población planctónica a través de recuento directo en una celda Petroff hausser y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar el cobre, hierro total y sulfato en solución que fueron analizadas por la técnica de absorción atómica.

Para identificar los tipos de actividad oxidativa se realizaron 3 experimentos adicionales de lixiviación de calcopirita en matraces Erlenmayer de 250 ml durante 16 días y se analizó el medio de cultivo, determinando los compuestos intermedios de azufre a través de HPLC, los compuestos de hierro por espectrofotometría UV-Visible y Cobre por absorción atómica.

- (1) Se agregó 1 gr de Calcopirita y 100 ml de medio de cultivo en presencia de aire.
- (2) Se agregó 1 gr de Calcopirita y 100 ml de medio tapado en una atmósfera de nitrógeno.
- (3) Se agregó 1 gr de Calcopirita en contacto con  $4 \cdot 10^8$  bact/ml en presencia de aire.

Se realizó un set de experimentos complementarios en la cámara doble donde se colocó 40 ml de medio Norris +  $Fe^{+3}$  y en el interior del matraz se coloca 120 ml de la misma solución. Los experimentos fueron realizados en un shaker a  $70^{\circ}C$  y 125 RPM (ver Figura 2.2).

Para determinar el mecanismo de acción de *Sulfolobus metallicus* se realizaron cinco tipos de experimentos:

- (1) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó 1 gr de Calcopirita y 100 ml de medio Norris +  $Fe^{+3}$  en presencia de aire.
- (2) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó 1 gr de Calcopirita y 100 ml de medio Norris +  $Fe^{+3}$  en presencia de aire y se agregó  $H_2O_2$  para regenerar el férrico.

- (3) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó 1 gr de Calcopirita y 100 ml de medio Norris +  $\text{Fe}^{+3}$  en una atmósfera de nitrógeno.
- (4) En un reactor de doble cámara (Figura 1) se colocó en el compartimiento A medio y  $2,2 \cdot 10^8$  bact/ml iniciales y en el compartimiento B medio y  $2 \cdot 10^8$  bact/ml iniciales.
- (5) En un reactor de doble cámara, en el compartimiento A se colocó medio Norris y  $2,2 \cdot 10^8$  bact/ml iniciales y en el compartimiento B medio Norris.

Los 5 experimentos se colocaron en el shaker durante 12 días. Se monitorearon el pH, Eh, la población planctónica y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar el cobre, hierro total y sulfato en solución que fueron analizadas por la técnica de absorción atómica. También, se analizó el medio de cultivo, determinando los compuestos intermedios de azufre a través de HPLC y los compuestos de hierro por espectrofotometría UV-Visible

### **2.2.3 MODELO CINETICO DE LIXIVIACIÓN:**

Se realizaron 6 experimentos en matraces Erlenmayer de 250 ml:

- E1: 1 g calcopirita natural andina, 100 ml medio Norris y  $\text{O}_2$
- E2: 1 g calcopirita natural andina, 100 ml medio Norris,  $2,6 \cdot 10^8$  cel/ml y  $\text{O}_2$
- E3: 1 g calcopirita natural andina, 100 ml medio Norris y  $\text{N}_2$
- E4: 1 g calcopirita natural andina, 100 ml medio Norris + 1 g/l  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{O}_2$
- E5: 1 g calcopirita natural andina, 100 ml m. Norris + 1 g/l  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $2,6 \cdot 10^8$  cel/ml y  $\text{O}_2$
- E6: 1 g calcopirita natural andina, 100 ml medio Norris + 1 g/l  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{N}_2$

Todos los experimentos se realizaron a  $70^\circ\text{C}$  y 150 rpm. Se tomaron muestras de  $\text{Cu}^{+2}$  (absorción atómica),  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $(\text{SO}_4)^{2-}$  (UV-visible), además, una vez terminado los experimentos se analizó cobre, hierro y azufre total en el sólido por ICP.

También se ajustó el modelo del núcleo sin reaccionar para determinar si el fenómeno es controlado por difusión, reacción química o mixto.

#### **2.2.4 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA SUPERFICIE:**

Se realizaron voltametrías cíclicas en un potenciostato – galvanostato a la calcopirita natural andina 80 – 120 # en medio Norris a pH 1,5 a temperatura ambiente. La velocidad de barrido fue 10 mV/s y el número de ciclos fue 5. El potencial de reposo del mineral en el medio basal fue 350 mV vs Ag/AgCl. Posteriormente se realizaron voltametrías cíclicas con las mismas características anteriores a la superficie de la calcopirita lixiviada en diferentes condiciones y se tomaron muestras de sólido a los días 5, 10 y 15, estas muestras se secaron y se montaron sobre un electrodo de oro mediante una cinta conductora de carbón y se aisló el resto de la superficie con teflón. Las condiciones de lixiviación fueron:

- Anaeróbica ( $N_2$ ) – abiótica por 15 días.
- Aeróbica ( $O_2$ ) – abiótica por 5 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – abiótica por 10 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – abiótica por 15 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – biótica (*S. metallicus*) por 5 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – biótica (*S. metallicus*) por 10 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – biótica (*S. metallicus*) por 15 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – abiótica con 1 g/l  $Fe^{+3}$  por 5 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – abiótica con 1 g/l  $Fe^{+3}$  por 10 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – abiótica con 1 g/l  $Fe^{+3}$  por 15 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – biótica (*S. metallicus*) con 1 g/l  $Fe^{+3}$  por 5 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – biótica (*S. metallicus*) con 1 g/l  $Fe^{+3}$  por 10 días
- Aeróbica ( $O_2$ ) – biótica (*S. metallicus*) con 1 g/l  $Fe^{+3}$  por 15 días

#### **2.2.5 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LA CALCOPIRITA:**

Se realizaron dos tipos de mediciones: la primera en una celda clásica de tres electrodos para determinar los potenciales en los que se detecten cambios superficiales sobre la calcopirita, la segunda fue en una celda electroquímica, que

operó a los potenciales antes determinados, adosada a un equipo de XPS para evitar el contacto con el aire antes de realizar las mediciones superficiales de la calcopirita.

#### 2.2.5.1 Caracterización electroquímica

Se realizaron mediciones electroquímicas en una celda de tres electrodos donde el electrodo de trabajo es un electrodo de calcopirita sintética, un contra-electrodo de platino y una referencia de Ag/AgCl. Esta celda fue conectada a un potenciostato, en que se realizaron voltametrías cíclicas entre  $-0.1$  y  $1$  V/EHE a  $5$  mV/s en 4 condiciones:

- A  $25^{\circ}\text{C}$  y  $\text{N}_2$
- A  $25^{\circ}\text{C}$  y  $\text{O}_2$
- A  $65^{\circ}\text{C}$  y  $\text{N}_2$
- A  $65^{\circ}\text{C}$  y  $\text{O}_2$

#### 2.2.5.2 Mediciones Superficiales a través de XPS:

El montaje experimental consiste en una celda electroquímica adosada a un equipo de XPS (figura 2.3), la celda consta de un porta-muestra de titanio en posición horizontal en que se adhiere una muestra de calcopirita sintética masiva, sobre la muestra de calcopirita se deposita una gota de medio nutriente (a temperatura ambiente o  $60^{\circ}\text{C}$  según corresponda al experimento) y se conecta el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el contra electrodo (Pt) a través de la gota de medio nutriente. Para calentar la muestra de utilizó luz y una lupa, la temperatura fue medida a través de una termocupla. Estos experimentos fueron conducidos en un ambiente de  $\text{N}_2$  o aire según corresponda al experimento.

Antes de cada medición se limpio la superficie de la calcopirita electroquímicamente, se aplicaron 10 ciclos entre  $1$  y  $0.5$  V para remover todo lo que pudiera estar absorbido sobre la superficie. Luego los experimentos fueron conducidos en las siguientes condiciones:

1. N<sub>2</sub>, 25°C, 1V/EHE, 20 min.
2. N<sub>2</sub>, 25°C, 0.6V/EHE, 20 min.
3. N<sub>2</sub>, 25°C, 0.3V/EHE, 20 min.
4. N<sub>2</sub>, 25°C, 0 V/EHE, 20 min.
5. O<sub>2</sub>, 60°C, 1V/EHE, 20 min.
6. O<sub>2</sub>, 60°C, 0.6V/EHE, 20 min.
7. O<sub>2</sub>, 60°C, 0.3V/EHE, 20 min.
8. O<sub>2</sub>, 60°C, 0 V/EHE, 20 min.
9. N<sub>2</sub>, 60°C, 1V/EHE, 20 min.
10. N<sub>2</sub>, 60°C, 0.6V/EHE, 20 min.
11. N<sub>2</sub>, 60°C, 0.3V/EHE, 20 min.
12. N<sub>2</sub>, 60°C, 0 V/EHE, 20 min.
13. N<sub>2</sub>, 60°C, 1 hora (sin aplicar potencial)
14. O<sub>2</sub>, 60°C, 1 hora (sin aplicar potencial)

Una vez terminada la experiencia la muestra fue conducida a la cámara de XPS para el análisis de la superficie. Se observa principalmente cobre, hierro, azufre, carbón y oxígeno (los otros picos que no aparecen identificados corresponden a compuestos provenientes de las sales del medio nutriente, que no tienen ningún efecto en la disolución de la calcopirita).

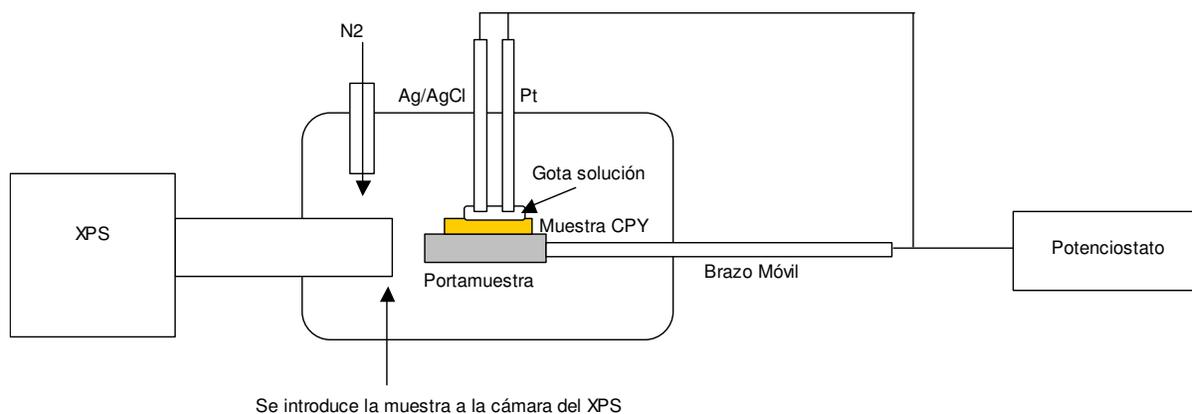


Figura 2.3: Esquema del montaje experimental de la caracterización superficial de la calcopirita

### **2.2.6 DESCRIPCIÓN DE LOS EQUIPOS:**

1. Shaker Environ modelo 3527-6 mecánico
2. Microscopio electrónico de barrido LEO Electron microscopy Ltd. Modelo Leo 1420 VP y un detector EDS OXFORD instruments modelo EDS 7424.
3. Espectrofotómetro UV-Visible HP, modelo Agilent 8453.
4. Cromatógrafo Hitachi, modelo L-3000 con detector con arreglo de diodos.
5. Columna de intercambio aniónico ICsep ANSC, con soporte compuesto por un co-polímero rugoso de enlace cruzado de poliestireno y divinilbenceno, contiene un grupo funcional de amonio cuaternario, el tamaño de partícula es de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ , el rango de pH de operación es 1-13, su capacidad es de 20  $\mu\text{Eq/g}$  la presión máxima es de 1500 psi y el flujo máximo de la fase móvil es 2 ml/min. Las condiciones de trabajo utilizadas:
  - Fase móvil: 4mM  $\text{NaHCO}_3$  y 1,5  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9,5
  - Velocidad de flujo: 1,2 ml/min
  - Longitud de onda: 210 nm
6. Perfilómetro TENCOR instruments modelo Alpha-Step 500
7. ICP-OES OPTIMA 2100 DV
8. Absorción atómica Perkin-Elmer 1100B
9. Potenciostato – galvanostato Bass 100B
10. celda electroquímica adosada a un equipo de XPS Specs

### **CAPITULO 3:**

#### **ADHERENCIA DE *Sulfolobus metallicus* A CALCOPIRITA**

La adherencia de microorganismos mesófilos y termófilos a calcopirita ha sido estudiada por Rodríguez et al (2001 y 2003) en concentrados de calcopirita y confirmaron que existe una relación entre la adherencia y la velocidad de disolución del mineral en bacterias mesofílicas (mezcla de *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum spp*) y en el microorganismo *Sulfolobus spp*. Escobar et al. (2003) determinaron que 68% de los *Sulfolobus metallicus* se adhieren a la superficie de la calcopirita mientras que el otro 32% crece en la solución, la población planctónica se determinó por conteo, MPN y el método de Lowry y la población adherida se determinó por el método de Lowry modificado.

En el presente capítulo de este trabajo se describe la investigación sobre la influencia catalítica de la adherencia de *Sulfolobus metallicus* a calcopirita sintética y natural con distintos tamaños de partículas en matraces Erlenmayer de 250 ml a 70 °C y pH 1,5.

#### **3.1 ADHERENCIA DE *Sulfolobus metallicus* A CALCOPIRITA SINTÉTICA:**

##### **3.1.1 CALCOPIRITA MASIVA PULIDA:**

En una primera serie experimental se montó pequeños trozos de calcopirita sintética masiva en resina epóxica y se pulió la superficie hasta 1µm. Se contactó esta muestra de calcopirita sintética con  $1 \cdot 10^8$  cel/ml de *Sulfolobus metallicus* durante 5, 14 y 21 días en medio Norris en matraces Erlenmayer para medir la adherencia de *S. metallicus*. Además, como experimento blanco, se mantuvo una muestra de la misma calcopirita en medio Norris abiótico durante 21 días. La superficie de la muestra inicial y las muestras tratadas fue observada a través de SEM y analizadas por EDS. La observación de la superficie de la calcopirita expuesta a *Sulfolobus metallicus* mediante SEM mostró que los microorganismos no se adhirieron a las zonas lisas de la superficie y sólo se encontraron en las grietas presentes (ver Figuras 3.2 a,b). Estas grietas se formaron aparentemente durante el proceso de lixiviación y estaban

presentes también en las muestras mantenidas en medio abiótico en que se observó la formación de grietas y un aumento de la rugosidad (ver Figura 1,b).

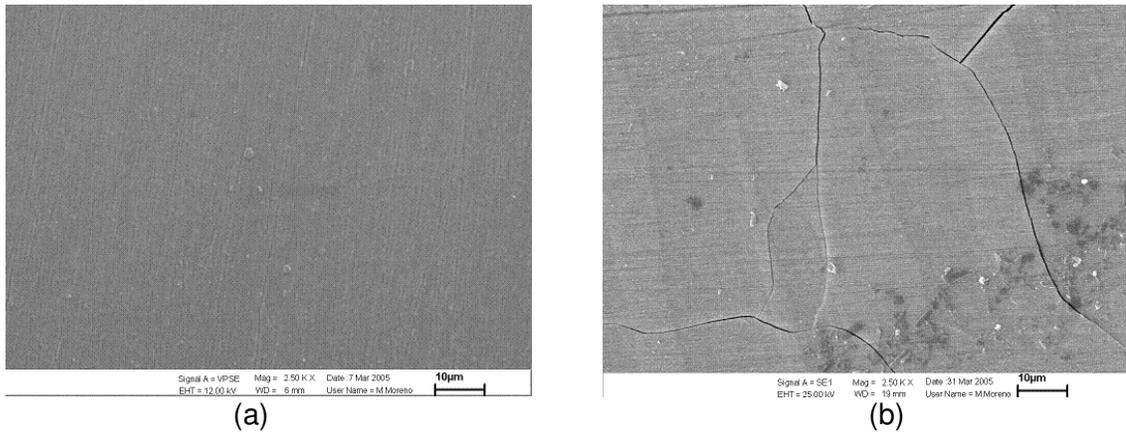


Figura 3.1: (a) superficie de la calcopirita inicial pulida, (b) calcopirita después de 21 días en un medio Norris abiótico.

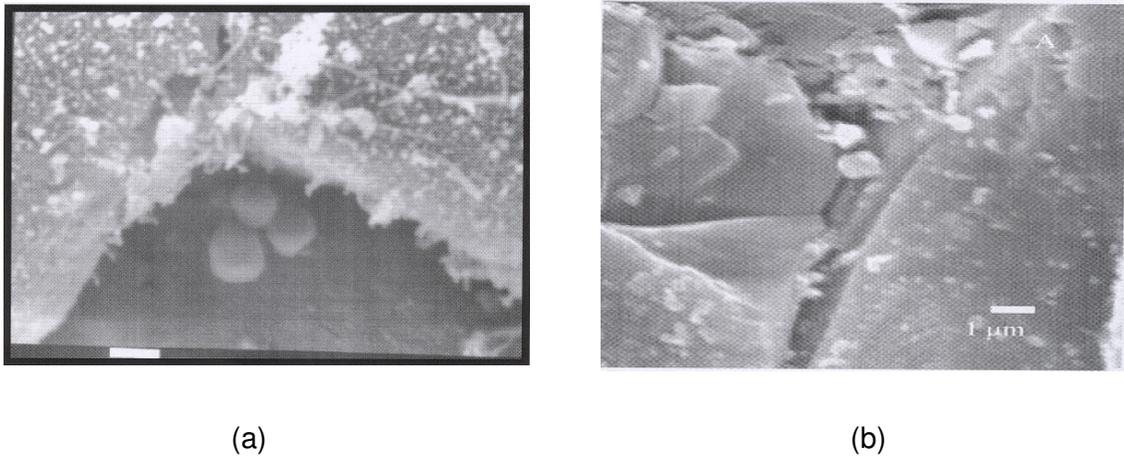


Figura 3.2: calcopirita mantenida en medio Norris con *Sulfobus metallicus*. (a) 5 días; (b) 14 días.

La figura 3.3 muestra los análisis EDS de la superficie de la calcopirita mantenida en medio Norris abiótico. En este caso se observó que la razón Cu:Fe:S sobre la superficie no cambió fuertemente durante el proceso. En cambio en la figura 3.4 se observa que en la calcopirita en contacto con *Sulfobus metallicus* hay una significativa disminución de la proporción de azufre con respecto al hierro y el cobre

presentes lo que indica que la presencia de los microorganismos activa la disolución de este elemento en forma preferencial.

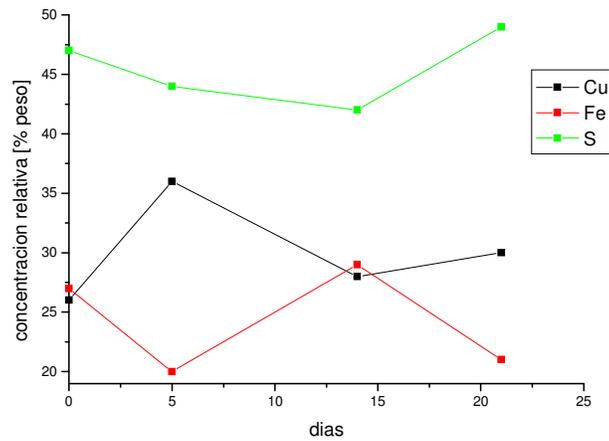


Figura 3.3: variación del porcentaje relativo de Cu, Fe, S en la superficie de calcopirita lixiviada en medio basal abiótico.

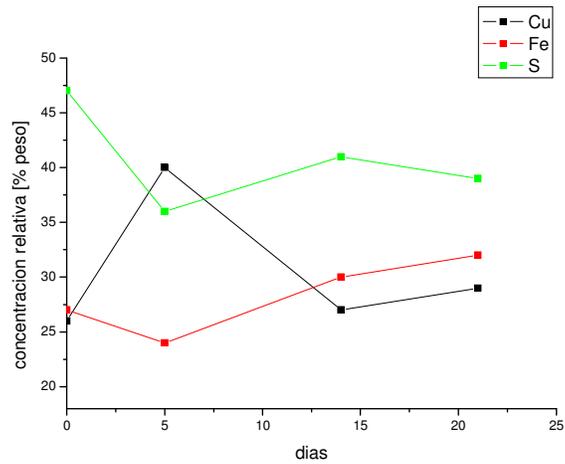


Figura 3.4: variación del porcentaje relativo de Cu, Fe y S en la superficie de calcopirita mantenida en diferentes tiempos en contacto con *Sulfolobus metallicus*.

**3.1.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS MEDIANTE PERFILOMETRÍA:**

A dos muestras de calcopirita sintética masiva y pulida se les hizo una raya superficial de sección triangular. Con un perfilómetro se midió la rugosidad inicial de la superficie de la muestra y las dimensiones de la grieta triangular obtenida (figura 3.5). Luego, una muestra se colocó en medio Norris abiótico durante 20 días y la otra en contacto con los microorganismos durante el mismo tiempo. Al terminar este período, nuevamente en ambas muestras se midió la rugosidad superficial y las dimensiones de la grieta. Con este experimento se buscó determinar si la biolixiviación se produce de manera localizada u homogénea sobre la superficie de la calcopirita y si es afectada por la adherencia de microorganismos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Resumen de mediciones de rugosidad.

		Muestra en medio basal abiótico		Muestra en medio basal con <i>S. metallicus</i>	
		0 días	20 días	0 días	20 días
Zona lisa	Rq	0.17um	0.21um	0.2um	0.1um
Grieta	Profundidad	1.78um	2.3um	4.8um	6.3um
	Ancho	65.7um	69um	62.25um	103.7um

Rq: rugosidad cuadrática media.

Al comparar la rugosidad cuadrática media de la muestra de calcopirita que estuvo en medio basal abiótico con la muestra original, se determinó que la zona lisa se volvió más rugosa y en la grieta se observaron pequeños cambios en el ancho y la profundidad (la forma de la grieta se mantuvo).

En el caso en que se compara la rugosidad cuadrática media de la muestra de calcopirita en contacto con los microorganismos con la muestra original, se observa que la zona plana se volvió más lisa y la grieta es más profunda y ancha. Además, se observó que la grieta se volvió más suave y redonda. Esto indica que la lixiviación de la superficie del mineral fue tanto en la grieta y como sobre la superficie plana.

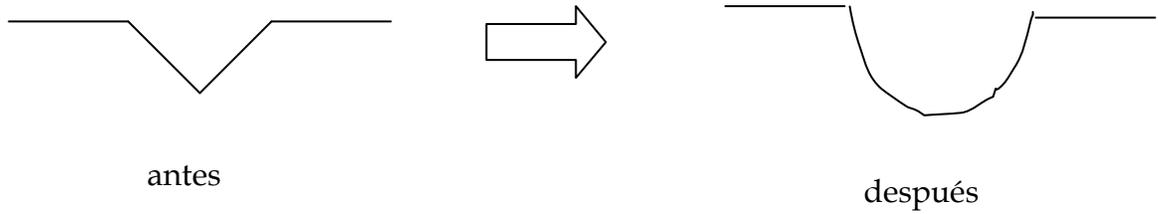


Figura 3.5: evolución de la grieta de calcopirita en contacto con los microorganismos.

En las figuras 3.6-3.8 se observan las imágenes SEM del experimento en contacto con los microorganismos y muestran que prácticamente no hay adherencia de *Sulfolobus metallicus* en la grieta ni sobre la superficie.

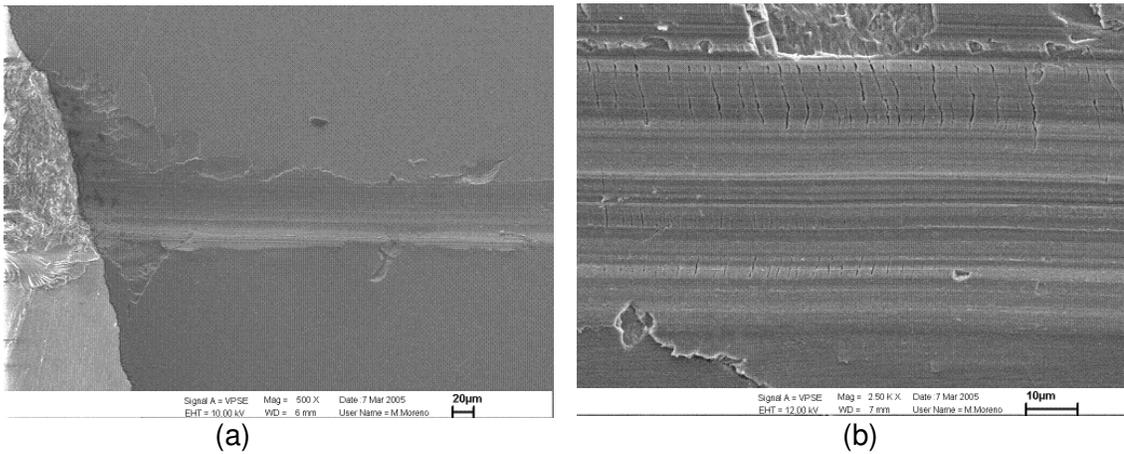


Figura 3.6: (a) y (b) superficie de la calcopirita con la grieta.

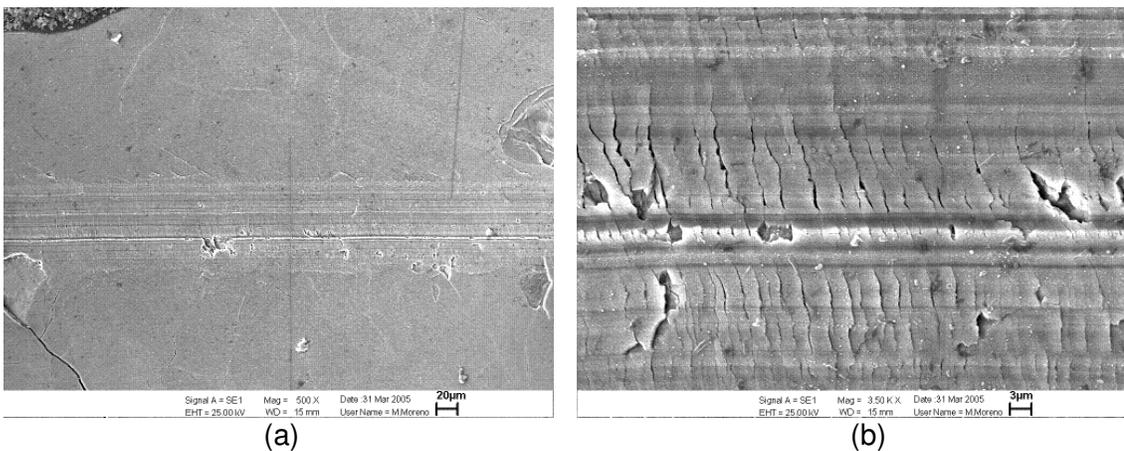
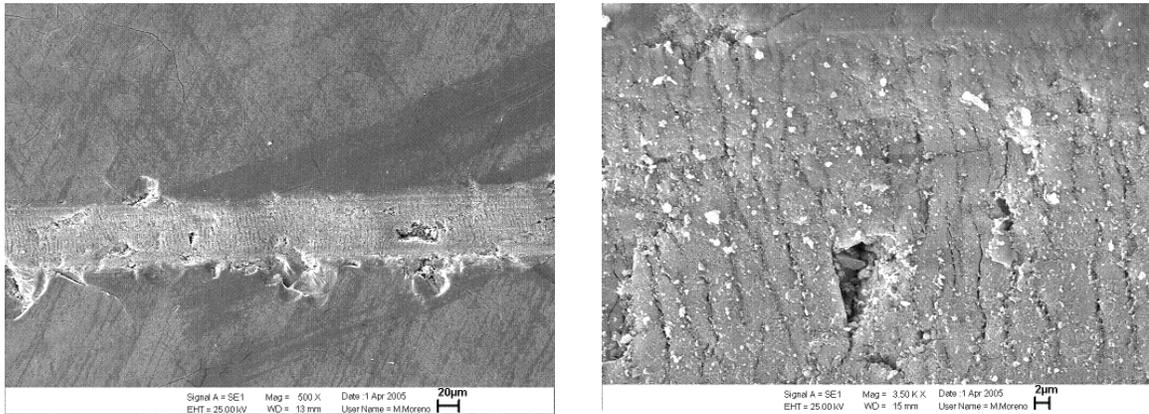


Figura 3.7: (a) y (b) superficie de la calcopirita con la grieta en medio abiótico durante 20 días.



(a)

(b)

Figura 3.8: (a) y (b) superficie de la calcopirita con la grieta en contacto con *Sulfolobus metallicus* durante 20 días.

Los análisis de EDS en la grieta y sobre la superficie que se presentan en las tabla 3.2, se pueden ver diferencias en la concentración relativa de Cu, Fe y S en la muestra que estuvo con los microorganismos y la que estuvo sólo en el medio basal abiótico. Se observa que casi no hay variación de azufre entre ambas muestras y que el hierro disminuye en una mayor proporción en la muestra sólo con medio Norris. Además, la proporción de cobre sobre la superficie es mayor después de finalizada la lixiviación abiótica. En ambos casos no se incluyó el carbono y oxígeno detectado ya que ambos elementos se encontraban manera homogénea sobre la superficie.

Tabla 3.2: curvas de concentración relativa [%] de Cu, Fe y S en la muestra de calcopirita.

Muestra	Día	Cu [%]	Fe [%]	S [%]
Abiótico	0	26	27	47
	20	56	10	21
<i>S. metallicus</i>	0	26	27	47
	20	33	26	26

En resumen, este experimento nos indica que la biolixiviación de la calcopirita (sintética) se produce de manera homogénea sobre la superficie aunque los

microorganismos no se hayan adherido a la superficie. En el caso abiótico la lixiviación es menor, pero también hay extracción preferencial del azufre.

### **3.1.3 CALCOPIRITA MASIVA TRATADA CON Fe(III) DURANTE 5 DÍAS**

Se efectuó un experimento de adherencia de *S. metallicus* sobre una muestra de calcopirita sintética masiva pulida que fue previamente lixiviada en una solución férrica. De esta manera se pretendió modificar la superficie del mineral y así determinar si este factor ayuda a aumentar la adherencia de *Sulfolobus metallicus* a la calcopirita.

Para ello una muestra de calcopirita sintética masiva pulida se dejó 5 días en una solución 0.1 M de Fe(III) y 0.01 M de Fe(II). Posteriormente la muestra se removió de esta solución y se dejó en un medio basal sin hierro inoculado con *Sulfolobus metallicus* ( $1 \times 10^8$  células/ml). Se tomaron muestras del sólido a los 5 y 14 días las cuales se observaron por SEM. Las imágenes muestran que existen microorganismos en ambas muestras. En la figura 3.9 se observa que a los 5 días de contacto hay muy pocos microorganismos adheridos, en cambio en la figura 3.10, a los 14 días de contacto se observan una mayor cantidad de colonias de microorganismos en algunas zonas de la muestra. Es decir, al pretratar el mineral con férrico aumenta el grado de adherencia sobre la superficie de la calcopirita pulida.

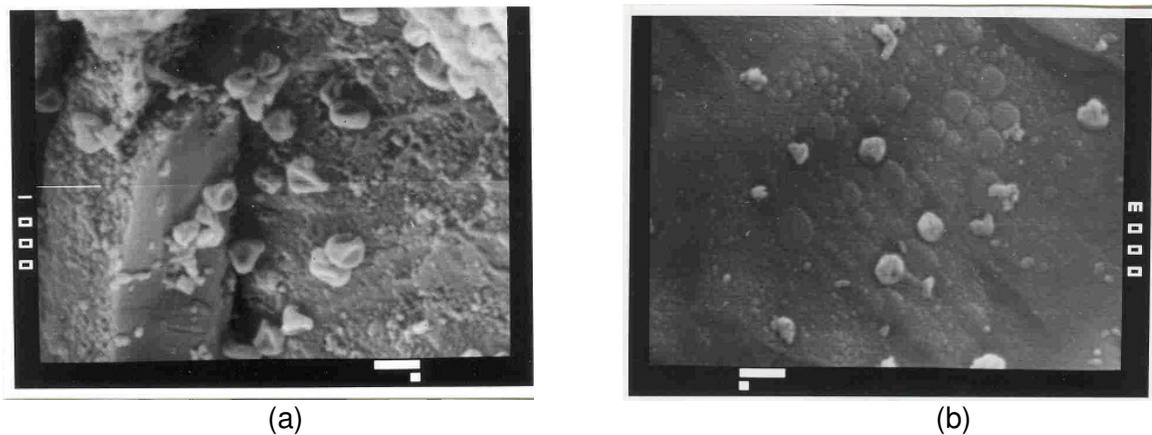


Figura 3.9: (a) y (b) Colonias de *Sulfolobus metallicus* (5 días) sobre calcopirita tratada con Fe(III).

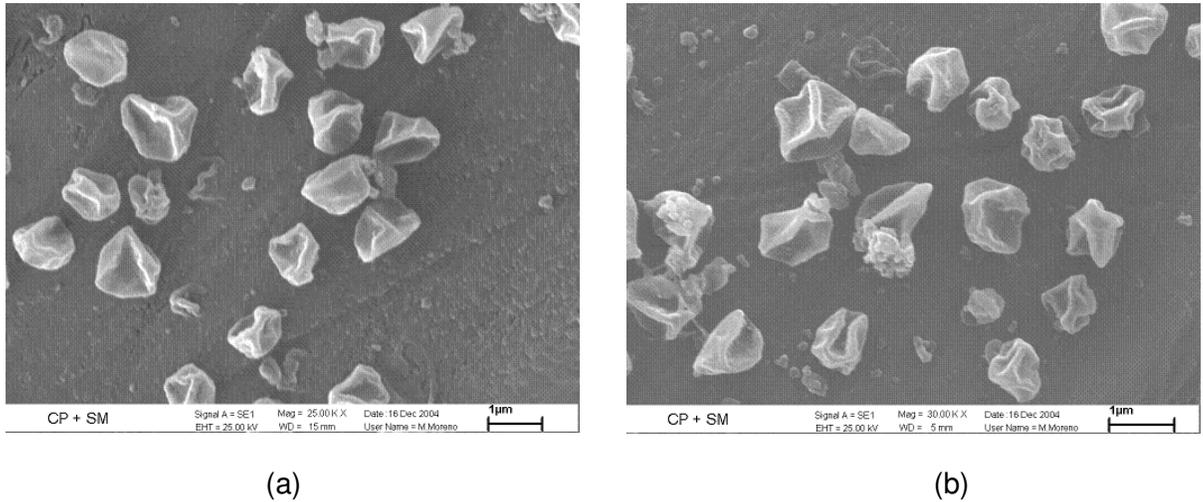


Figura 3.10: (a) y (b) colonias de *Sulfolobus metallicus* (14 días) sobre calcopirita tratada con Fe(III).

Los análisis de EDS de la tabla 3.3 muestran que al poner la calcopirita en la solución de Fe(III) la concentración de hierro sobre la superficie aumentó al doble con respecto a la calcopirita inicial y al contactar la muestra con los microorganismos la proporción en el sólido de hierro y azufre (en menor medida) disminuyó, en cambio el cobre se mantuvo constante. En este análisis no se incluyó la concentración de oxígeno que puede estar asociado a la precipitación de jarositas.

Tabla 3.3: concentración relativa de Cu, Fe, S sobre calcopirita tratada con Fe(III) y en contacto con *Sulfolobus metallicus*.

	Días	Cu	Fe	S
Cp + Fe <sup>+3</sup>	0	19	46	26
Sm	14	19	26	23

En resumen, el contactar la calcopirita con una solución férrica aumentó la concentración de hierro sobre la superficie. Esto indica que en la pre-lixiviación inicial con férrico, más que obtenerse una capa de azufre, se formó una película importante de jarositas. Sin embargo, esta modificación superficial igual llevó a aumentar la

adherencia de *Sulfolobus metallicus* sobre el mineral. Probablemente esto se deba a que el hierro depositado sobre la superficie cambie la rugosidad superficial de la muestra de calcopirita sintética o la carga superficial o bien la lixiviación férrica produjo una delgada capa de azufre sobre la superficie, lo que permite que los microorganismos lazos de adsorción mas fuertes sobre la superficie del mineral.

#### 3.1.4 CALCOPIRITA MOLIDA:

Una muestra de 1 g de calcopirita sintética molida entre 1 y 2 mm de diámetro aproximadamente fue inoculada con  $1 \cdot 10^8$  células/ml en medio Norris en matraces Erlenmayer y se tomaron muestras de mineral a los 6, 12 y 18 días que fueron analizadas nuevamente por SEM-EDS. El objetivo de este experimento fue determinar los cambios en la adherencia de los microorganismos al tener una calcopirita con superficie más rugosa. Observaciones con SEM mostraron que a los 6 días hay muy pocas células adheridas (ver Figuras 3.11 a,b), en cambio, a los 12 días se observaron en algunas grietas sobre la superficie colonias de microorganismos y formas irregulares que podría ser algún tipo de biofilm (ver Figura 3.12 a,b). A los 18 días ya se observa una colonización masiva sobre la superficie en todas las grietas, ahora producto del crecimiento de los microorganismo inicialmente adheridos a estas zonas (3.13 a,b).

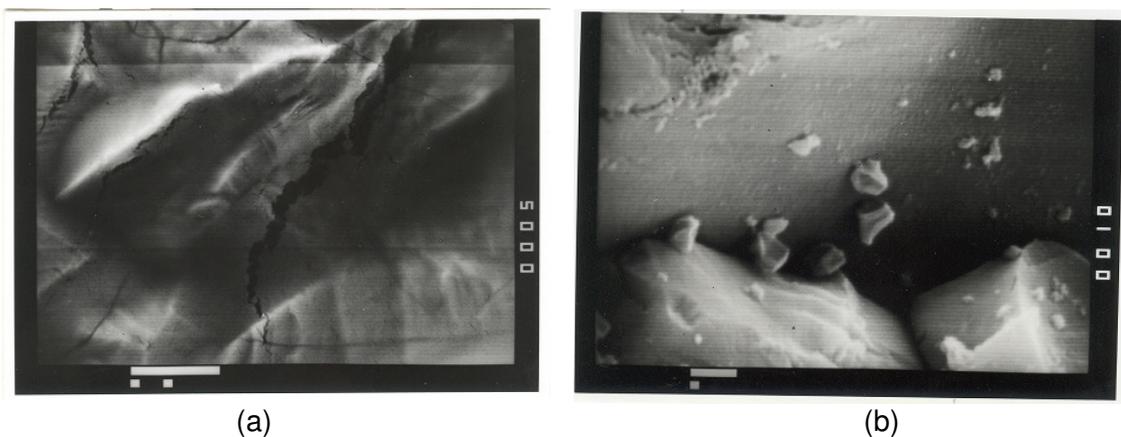
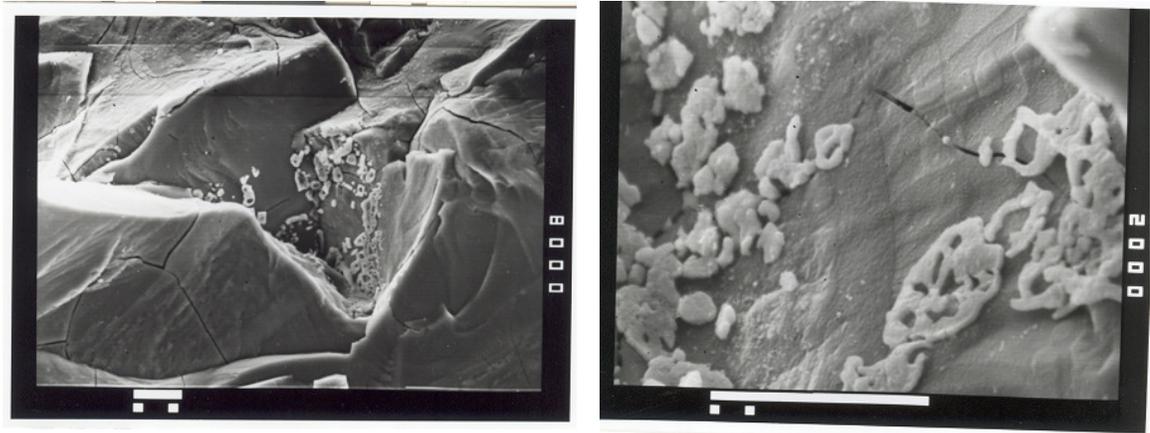


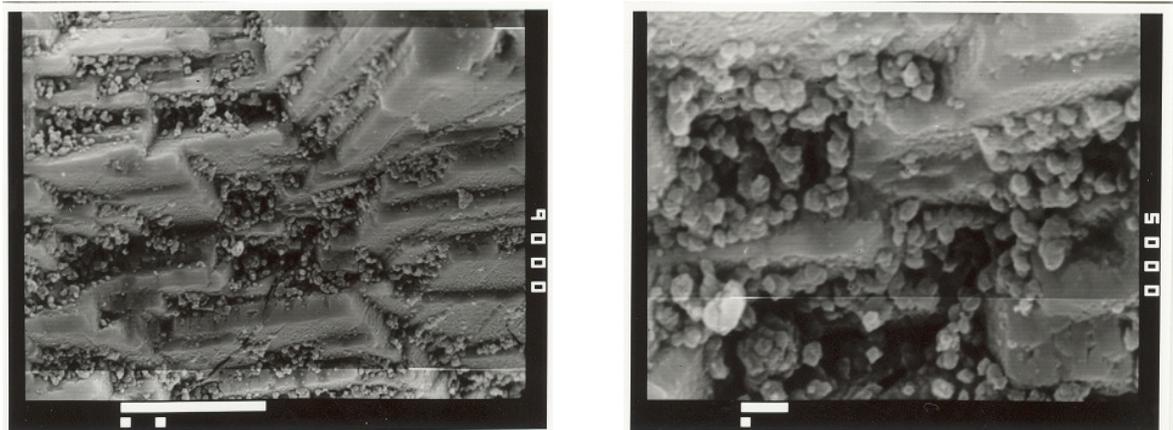
Figura 3.11: (a) y (b) calcopirita molida en contacto con *Sulfolobus metallicus* durante 6 días.



(a)

(b)

Figura 3.12: (a) y (b) calcopirita molida en contacto con *Sulfolobus metallicus* durante 12 días.



(a)

(b)

Figura 3.13: (a) y (b) calcopirita molida en contacto con *Sulfolobus metallicus* durante 18 días.

En la figura 3.14, los análisis de EDS muestran, al igual que en la figura 3.4, que el azufre presente en la superficie del mineral disminuye respecto a la composición inicial, aunque este proceso es más acelerado durante los primeros 12 días.

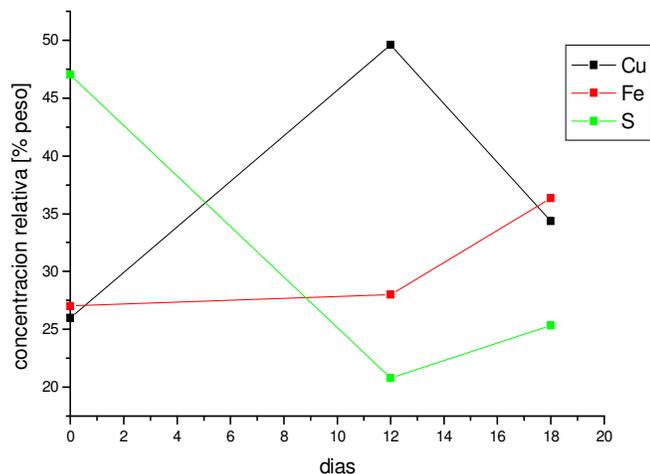


Figura 3.14: variación de la concentración relativa de Cu, Fe, S sobre la superficie de la calcopirita en contacto con *Sulfolobus metallicus*.

Los resultados de esta sección indican que la adherencia de *S. metallicus* sobre calcopirita ocurre de manera heterogénea sobre la superficie, y se focaliza en las grietas y depresiones presentes en la superficie de las partículas de mineral. Por otro lado, prácticamente no hay adherencia en las superficies más expuestas de las partículas. Esto parece indicar en principio que la adherencia de estos microorganismos se focaliza en zonas cóncavas donde la solución forma zonas estancas y los microorganismos están protegidos del embate de la agitación. Esto tiene sentido en el caso del *Sulfolobus metallicus*, microorganismos que no se ha reportado que sean capaces de producir exopolisacáridos y por lo tanto no serían capaces de establecer fuertes lazos de unión con la superficie del mineral.

Al aumentar el tiempo de permanencia del mineral molido en contacto con los microorganismos se observa una mayor adherencia de las células, tendencia que no se observó en el caso de la calcopirita pulida, la cual tenía muy pocas grietas. Por otro lado, las zonas donde los microorganismos se adhieren no se lixivian más rápido ya que no se observan hoyos o algún tipo de marca superficial sobre la superficie a la que se han adherido. Sin embargo, de la comparación de los resultados del análisis

elemental en muestras pulidas (Figura 3.4) y particuladas (Figura 3.14) lixiviadas con *S. metallicus* se puede concluir que la mayor adherencia obtenida en este último caso sí parece tener influencia sobre la velocidad relativa de remoción de azufre desde la superficie de la calcopirita.

### **3.2 EFECTO DEL AUMENTO DE LA POBLACIÓN DE MICROORGANISMOS INOCULADOS SOBRE LA ADHERENCIA Y LA CINÉTICA DE LIXIVIACIÓN DE LA CALCOPIRITA NATURAL PARTICULADA.**

Se realizaron tres experimentos donde se contactó la calcopirita con tres poblaciones distintas de *Sulfolobus metallicus* ( $1,6 \cdot 10^8$ ,  $1 \cdot 10^8$  y  $6 \cdot 10^7$  cel/ml). Se buscó determinar si al aumentar la población de microorganismos en solución la adherencia de estos microorganismos al sólido y la recuperación de cobre aumentan.

La figura 3.15 muestra la variación del pH en los tres matraces en donde los experimentos se comportan de manera similar hasta el día 3 y luego se observa que la mayor variación de pH se presenta en M3 (menor población de células) pero al día 14 los 3 matraces presentan un pH similar (entre 1,50-1,52). En las figuras 3.16 y 3.17 se observa la población en la solución (en los tres matraces) y la población adherida al mineral respectivamente. En los tres casos se observa en un principio una disminución en la población planctónica (figura 3.16) que probablemente se deba a un período de ajuste del inóculo y no necesariamente a que los microorganismos se adhieran a la superficie del mineral, ya que en los primeros días de los experimentos prácticamente no se observa *S. metallicus* sobre la superficie de la calcopirita (figura 3.17), (y la adherencia de ellos al vidrio es muy baja (menor al 5%)). Luego, la población planctónica comienza a aumentar. Sobre el mineral se observa que las células se van adhiriendo a medida que pasa el tiempo y existe una mayor adherencia cuando hay una mayor población planctónica.

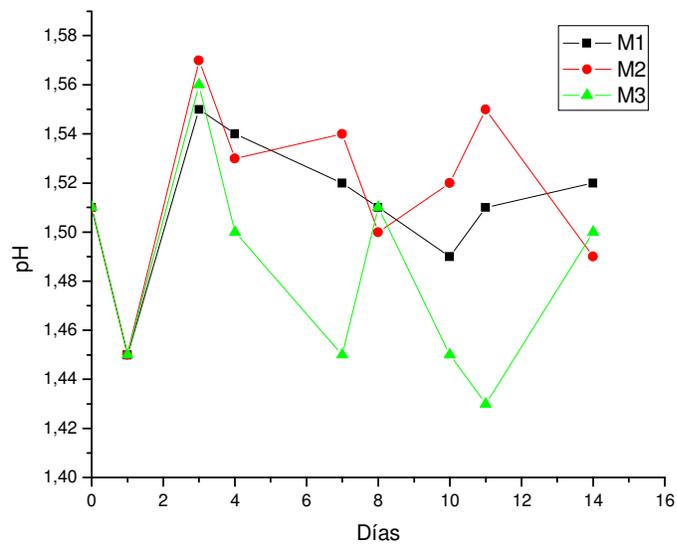


Figura 3.15: variación de pH en M1, M2, M3

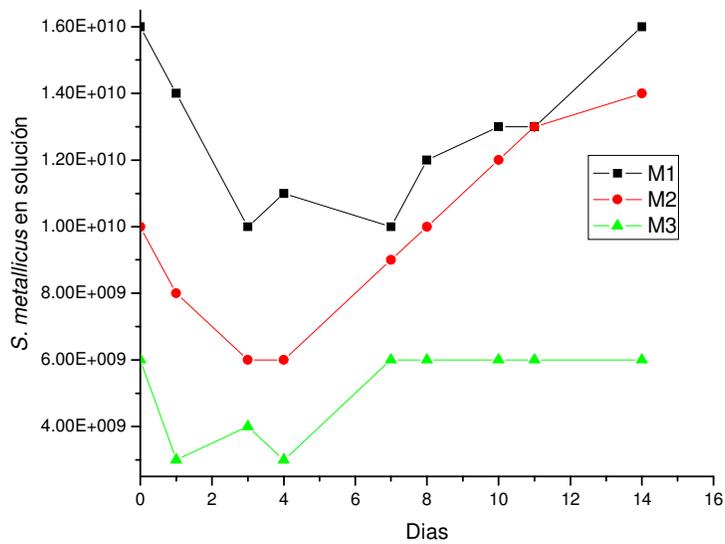


Figura 3.16: población planctónica en M1, M2, M3

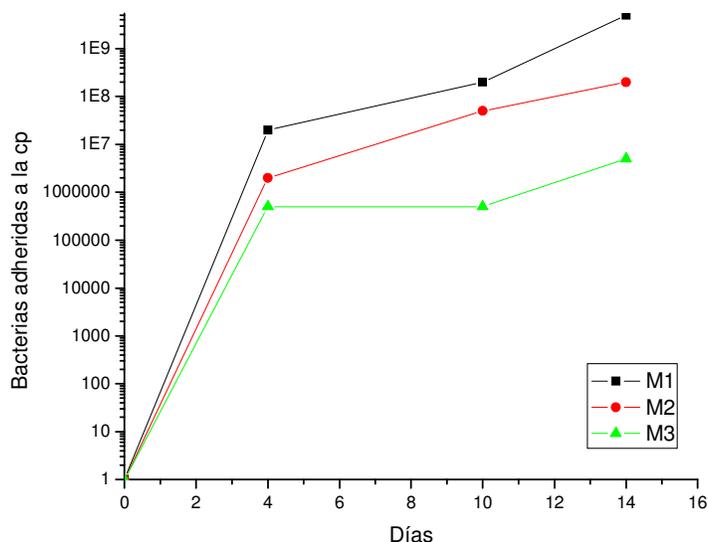
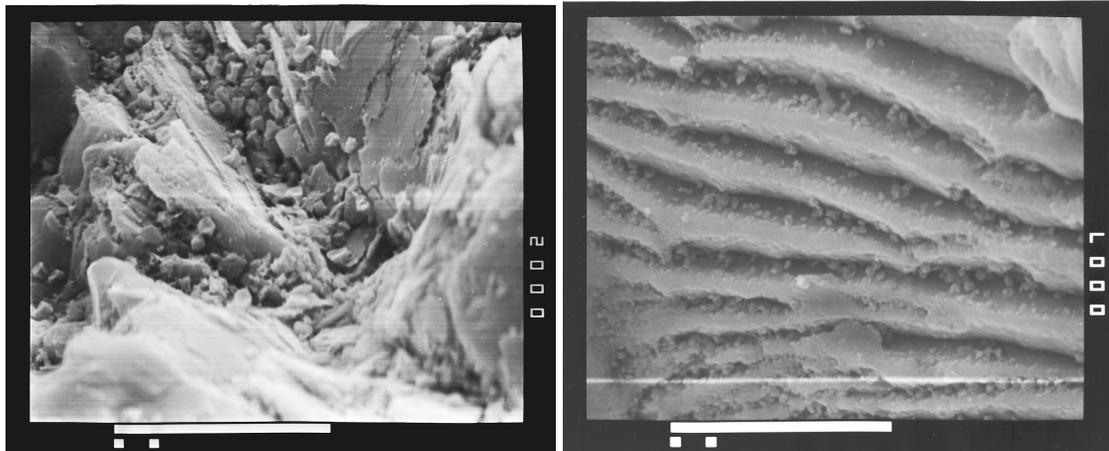


Figura 3.17: población Adherida a la calcopirita en M1, M2, M3

Se observó además mediante SEM que los microorganismos que se adhieren están mayoritariamente sobre grietas en el mineral, al igual que el caso observado sobre calcopirita sintética, y al cabo de 14 días en el caso de M1 se observa sólo un 10% (aproximadamente) de la superficie del mineral cubierta por ellos. En el caso de M2 y M3 es sólo un 5%. En la figura 3.18 se presentan micrografías de los *S. metallicus* sobre grietas de la calcopirita. Por otro lado, los compuestos intermedios de azufre detectados en la solución en M1, M2 y M3 se presentan en la tabla 3.4:

Tabla 3.4: compuestos intermedios de azufre detectados por HPLC

Estado: S <sup>-2</sup> .	Estado: S <sup>+2</sup> .	Estado: S <sup>+4</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .
(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>



(a)

(b)

Figura 3.18: imágenes SEM: (a) M1 en 10 días, (b) M2 en 14 días

En las figuras 3.19, 3.20 y 3.21 se presenta la recuperación de cobre, de hierro y sulfato producido respectivamente. En estas figuras se observa que las recuperaciones de cobre, hierro y sulfato son similares en los tres casos, siendo M1 y M2 las más altas y M3 levemente más baja. Esto indicaría que un aumento de la población en la solución y sobre el mineral no resulta en mejores recuperaciones de cobre.

En la figura 3.22 se observa que rápidamente el hierro total está como  $\text{Fe}^{+3}$  en M1 y M2 producto de la oxidación de los microorganismos y que la conversión a  $\text{Fe}^{+3}$  en el caso de M3 es más lenta ya que hay menos *S. metallicus* en la solución.

La conclusión principal de esta subsección es que al aumentar la cantidad de células inoculadas aumenta la cantidad de células adheridas a la superficie, principalmente adherida a grietas, pero esto no lleva a aumento importante en la recuperación de cobre.

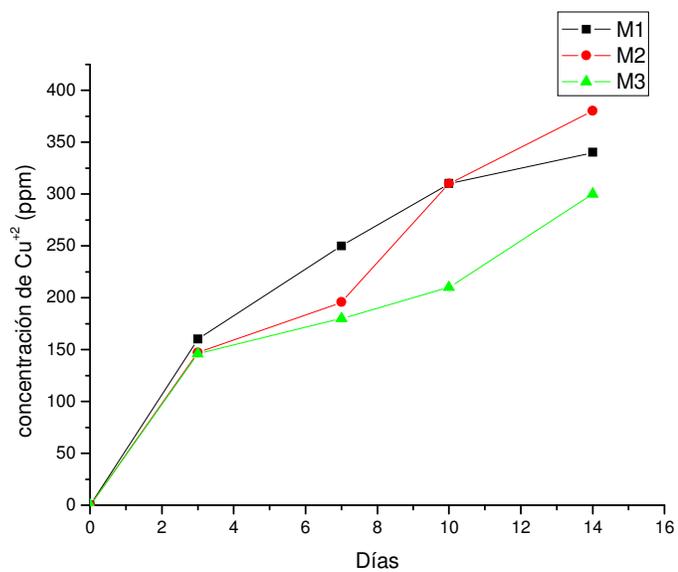


Figura 3.19: recuperación de  $\text{Cu}^{+2}$  en M1, M2, M3

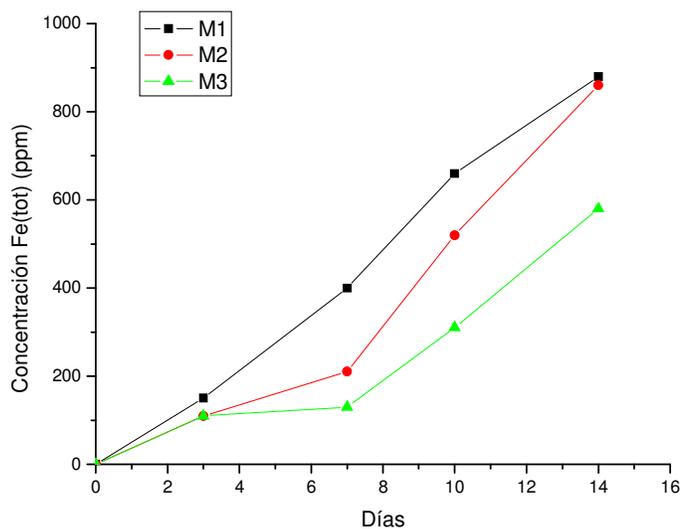


Figura 3.20: recuperación de  $\text{Fe}(\text{tot})$  en M1, M2, M3

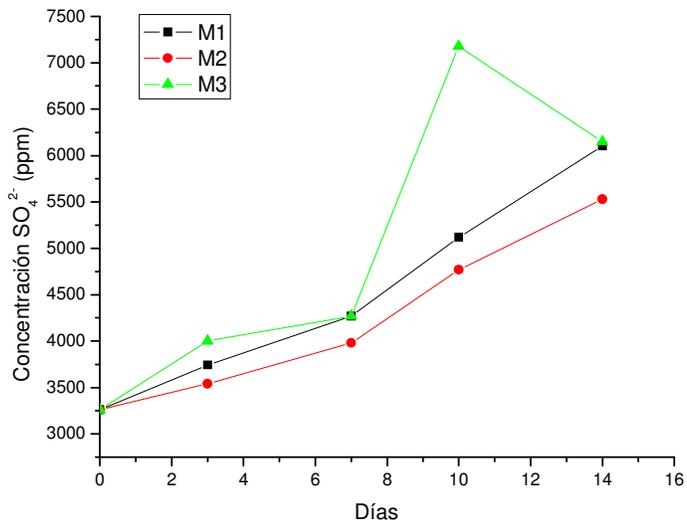
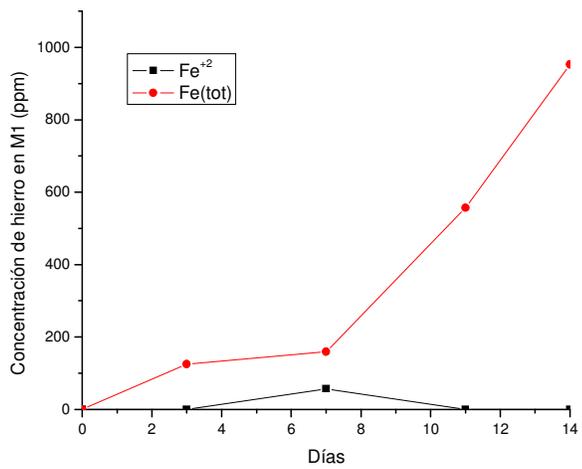
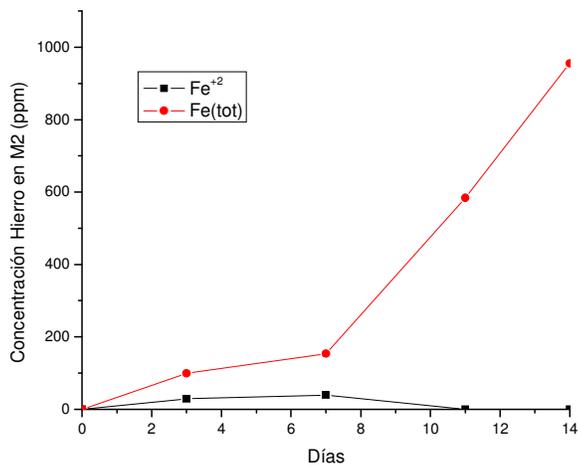


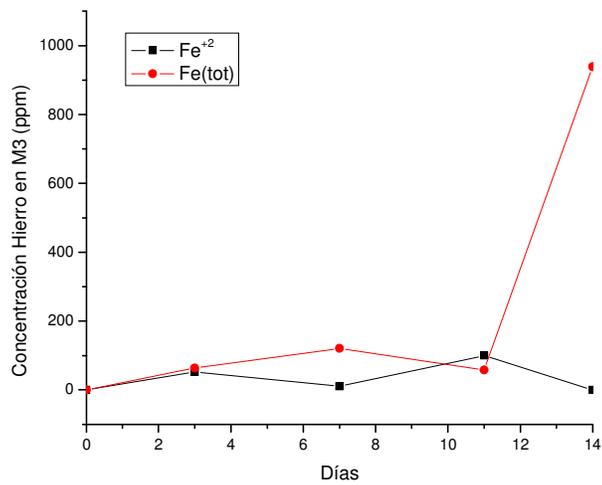
Figura 3.21: recuperación de  $(\text{SO}_4)^{2-}$  en M1, M2, M3



(a)



(b)



(c)

Figura 3.22: Fe(total) y Fe<sup>+2</sup> en (a) M1, (b) M2 y (c) M3

### **3.3 EFECTO DE LA CRISTALINIDAD EN LA ADHERENCIA DE *S. metallicus* A CALCOPIRITA MASIVA NATURAL**

Se agregó un experimento en que dos muestras masivas naturales pulidas fueron analizadas la orientación principal de la superficie a través de difracción de rayos X. Se determinaron 2 planos: (1,1,2) terminación superficial con exceso de azufre en la muestra 1 y (3,1,2) terminación superficial con exceso de hierro en la muestra 2. Estos planos corresponden a aquellos que estadísticamente predominan sobre la superficie de la calcopirita. Es decir, es el plano principal por sobre el resto de los otros planos que hay sobre la superficie del mineral.

Ambas muestras se colocaron en contacto con los microorganismos durante 10 días. Se analizó la superficie, se monitoreó además los iones en solución (cobre, hierro y sulfato) y la población.

No se determinó ninguna diferencia entre ambas muestras en términos de la evolución de la población o iones en la solución. Además tampoco se observaron microorganismos adheridos a la superficie en ambas muestras. Por lo que se puede concluir que no existe una influencia de la orientación cristalográfica en la biolixiviación de la calcopirita.

### **3.4 DISCUSIONES DEL CAPÍTULO**

Al comparar los análisis de EDS en las figuras 3.3 y 3.4 se observa que en la superficie de la calcopirita masiva sintética en contacto con los microorganismos hay una pequeña disminución de la concentración de azufre hasta el quinto día. Luego a partir de ese día la concentración relativa de azufre se mantiene baja pero hubo un pequeño aumento del hierro. Esta situación indica que ocurrió una lixiviación preferencial del azufre ya que esta disminución del azufre no se presenta en el caso abiótico. Esto se puede interpretar como un gatillamiento de la disolución del azufre de la calcopirita mediante oxidación a compuestos solubles intermedios de azufre. Además, a partir de las imágenes SEM de la superficie de la calcopirita molida (sintética y natural) se pudo

determinar que la adherencia se produce de manera heterogénea sobre la superficie, principalmente sobre las grietas formadas sobre la superficie del mineral, que en principio correspondería solamente a sitios más protegidos del movimiento de la solución, donde se forman zonas estancas.

Por otro lado, la adherencia de las células influye en la lixiviación del mineral ya que al comparar los análisis de EDS se observa que sobre la superficie en que se adhieren los microorganismos (muestra molida) existe una mayor oxidación de azufre que en el caso de la muestra pulida en contacto con las células (figura 3.14 respecto de la figura 3.4). en el Anexo A se describe la adherencia de *S. metallicus* a pirita natural donde se observa que los microorganismos se adsorben en los sitios que presentan un mayor ataque sobre la superficie y disuelven preferencialmente el azufre sobre la superficie.

En la sección 3.1.3, se estudió los cambios superficiales en el mineral a través de mediciones de perfilometría. Este experimento indica que la biolixiviación de la calcopirita (sintética) se produce de manera homogénea sobre la superficie aunque los microorganismos no se hayan adherido a la superficie, ya que se producen profundos cambios en la topografía de la superficie del mineral. La razón por la que no se observan microorganismos adheridos a la superficie puede ser que ellos estén sobre grietas más profundas o bajo los precipitados que se depositan sobre la superficie del mineral o bien, existe un segundo rol de los *S. metallicus* que no es sólo oxidar el azufre presente sino también un efecto en que los microorganismos que están ubicados en las grietas catalizan la reacción de reducción catódica del oxígeno sobre la calcopirita. Al acelerar esta reacción, se acelera la disolución anódica que ocurriría distribuida sobre todo el resto de la calcopirita.

El prelixiviar la superficie de la calcopirita con  $Fe^{+3}$  llevó a tener un aumento en la población adherida a la superficie. Aparentemente, se producen cambios superficiales que favorecen la adherencia de los *S. metallicus* sobre la superficie en las zonas planas sin precipitación de jarositas, donde sin pretratar no se observan microorganismos. Esto puede deberse a tres posibles cambios superficiales: (1) debido a la precipitación de las jarositas como cambios topográficos, (2) cambios en la carga

superficial de la calcopirita con este pre-tratamiento que facilita la adsorción de la células al mineral. Una situación como esta observaron Vilinska et al. (2007) en el caso de *At. ferroxidans* crecidas en ion ferroso al interactuar con la pirita y la calcopirita de manera diferente, permitiendo la coagulación selectiva de un mineral por sobre el otro a diferentes condiciones de pH. o bien (3) a la generación de una capa delgada de azufre en las zonas planas aunque a través de EDS esto no pudo ser comprobado. Vilcáez et al (2008) demostraron que agregar azufre y ácido sulfúrico a experimentos de biolixiviación de calcopirita con termófilos, entre ellos *S. Metallicus*, e ion férrico aumenta la velocidad de la disolución de este mineral ya que regula el pH y favorece la generación de biomasa. Además, estos autores probaron que se obtenía una mayor recuperación de cobre con los microorganismos que tienen una menor capacidad de regenerar el  $Fe^{+3}$ , es decir que mantuvieran por mayor tiempo una condición de bajo Eh. En el caso de estos experimentos, en las zonas planas probablemente se mantienen condiciones locales de mayor azufre sobre la superficie que favoreció la adsorción de células y también en este sistema local se generaron condiciones de bajo Eh que llevan a aumentar la disolución de la calcopirita.

En la sección 3.2 que corresponde a la biolixiviación de calcopirita natural con *S. metallicus*, se observó por un lado, mediante SEM que los microorganismos que se adhieren están mayoritariamente sobre grietas en el mineral, al igual que el caso observado sobre calcopirita sintética. Por otro lado fue posible observar que las recuperaciones de cobre, hierro y sulfato son similares en los tres casos a pesar que se detectó que a partir del 4 día hay al menos un orden de magnitud en la población adherida al sulfuro de diferencia entre M1-M2 y M2-M3. Esto indicaría que un aumento de la población en la solución y sobre el mineral no resulta en mejores recuperaciones de cobre. Es decir, la adherencia es necesaria para, por un lado, producir productos intermedios solubles de azufre que la población planctónica lleva a sulfato, además de llevar el  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ .

Al comparar los resultados obtenidos sobre la calcopirita sintética y natural se observa que la velocidad de oxidación del azufre sobre la superficie del mineral sintético es mayor cuando se observa una población adherida de microorganismos (figura 3.4 y

figura 3.8). En cambio, sobre la superficie de la calcopirita natural un aumento en la adherencia de los microorganismos no lleva a obtener una mayor oxidación de azufre a sulfato (ni cobre) lo que indicaría que una mayor adherencia no afecta la disolución de la calcopirita natural. La aparente diferencia entre ambos resultados podría deberse a que es necesaria una adherencia mínima por parte de los microorganismos a la superficie de la calcopirita que producen compuestos intermedios de azufre que la población planctónica lleva hasta sulfato.

### **3.5 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO**

- La adherencia ocurre de manera heterogénea sobre la superficie, pero sí existe una relación de la adherencia con la morfología ya que estos microorganismos se adhieren mayormente a las grietas que corresponde a sitios más protegidos. No existe una relación entre adherencia y cristalinidad.
- Al aumentar el tiempo de permanencia del mineral en contacto con los microorganismos se observa una mayor adherencia de las células (solo en el caso de la calcopirita molida, en el caso de mineral pulido no se observa que el grado de adherencia aumente). Al pretratar la calcopirita con férrico aumenta el grado de adherencia sobre la superficie del mineral pulido.
- En los análisis de EDS se observa que sobre las muestras en que se han adherido microorganismos existe una mayor oxidación de azufre,
- Un aumento de la población en la solución y sobre el mineral no lleva tener mejores recuperaciones de cobre, es decir. La adherencia sólo es necesaria para producir productos intermedios de azufre que la población planctónica lleva hasta sulfato y llevar el  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ .

## **CAPITULO 4:**

### **MECANISMO DE ACCIÓN DE *Sulfolobus metallicus* SOBRE LA CALCOPIRITA.**

La biolixiviación de calcopirita con *Sulfolobus metallicus* es un proceso eficiente en la oxidación de compuestos residuales de azufre (polisulfuros) formados durante la disolución química del sulfuro (Escobar et al. 2003). Córdova et al. (2008) determinaron que el papel de los microorganismos es regenerar el agente oxidante y disolver el azufre formado en el proceso. A pesar de la acción positiva de las células en la regeneración de  $Fe^{+3}$  este produce precipitación del  $Fe^{+3}$  como jarosita, que podría ser responsable de la pasivación de la calcopirita.

En el presente capítulo se investiga el mecanismo de acción de *Sulfolobus metallicus* a calcopirita natural en matraces Erlenmayer a 70 °C y pH 1,5 en medios basales sin y con  $Fe^{+3}$  inicial en solución.

#### **4.1 MECANISMO DE ACCIÓN DE *S. metallicus* EN SOLUCIONES SIN HIERRO INICIAL**

Con el objetivo de comparar el crecimiento de los microorganismos adheridos a la superficie de la calcopirita con el crecimiento de la población planctónica se colocó dentro de un matraz Erlenmayer de 250 ml un tubo de polipropileno de alta densidad hueco en que al final del tubo en se coloca un filtro millipore ® de 0.1  $\mu m$ , a este tubo se le agrega de medio Norris con los microorganismos y en el interior del matraz se coloca el medio, el mineral y presencia o ausencia de microorganismos. Ver diagrama del montaje en la figura 2.2

Para determinar el mecanismo de acción de *Sulfolobus metallicus* se realizaron cuatro tipos de experimentos:

- (1) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó la Calcopirita y el medio Norris en presencia de aire.

- (2) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó la Calcopirita y el medio Norris en una atmósfera de nitrógeno.
- (3) En un reactor de doble cámara (Figura 1) se colocó en el compartimiento A medio y  $3 \cdot 10^8$  cel/ml iniciales y en el compartimiento B se colocó la calcopirita, el medio y  $9 \cdot 10^7$  cel/ml iniciales.
- (4) En un reactor de doble cámara, en el compartimiento A se colocó medio Norris y  $1 \cdot 10^8$  cel/ml iniciales y en el compartimiento B se colocó la calcopirita y el medio Norris.

Los 4 experimentos se colocaron en el shaker durante 16 días. Se monitorearon el pH y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar el cobre, hierro total y sulfato en solución.

En las figuras 4.1 a la 4.4 se presentan los resultados de la variación del pH, cobre, hierro y sulfato en los experimentos 1 a 4. Al comparar el pH de los 4 experimentos (figura 4.1) podemos ver que hasta el día 5 en el experimento abiótico en presencia de aire la solución se acidifica más rápido que en los 3 restantes experimentos pero luego el pH comienza a aumentar. En general se puede afirmar que la disminución del pH en este proceso está relacionada con la oxidación del azufre de la calcopirita a sulfato y el aumento del pH está relacionado con el consumo de protones en la reacción de oxidación del ión ferroso (ecuación 7). En los experimentos inoculados con microorganismos termófilos también se produce acidificación y, en menor medida, en el caso con  $N_2$ . Por otro lado, en la figura 4.2 se observa que se produce una mayor cantidad de cobre liberado en el caso en que las células se encuentran en ambos compartimientos, seguidos por el caso en que los *S. metallicus* se encuentran en una cámara separada y el caso abiótico con  $O_2$ . Es interesante notar que en el día 16 la cantidad de cobre liberado en el experimento abiótico con  $O_2$  es un 38% del cobre liberado en el caso en que hay microorganismos en los dos compartimientos. En el caso en que los microorganismos están separados del mineral el cobre liberado es similar al experimento abiótico con  $O_2$ , lo que esto indica que si las células no pueden acercarse al mineral es como si no estuvieran presentes en la lixiviación de  $Cu^{+2}$ . El caso abiótico con  $N_2$  es 3,6% del cobre liberado en el caso en que hay microorganismos en los dos compartimientos, por lo que sin  $O_2$  casi no se produce

lixiviación del cobre. Toda esta información indica que cuando los *S. metallicus* no pueden acercarse a la superficie de la calcopirita, y la concentración de hierro en solución es muy baja, la disolución de cobre se debe a una acción química del oxígeno disuelto sobre la calcopirita.

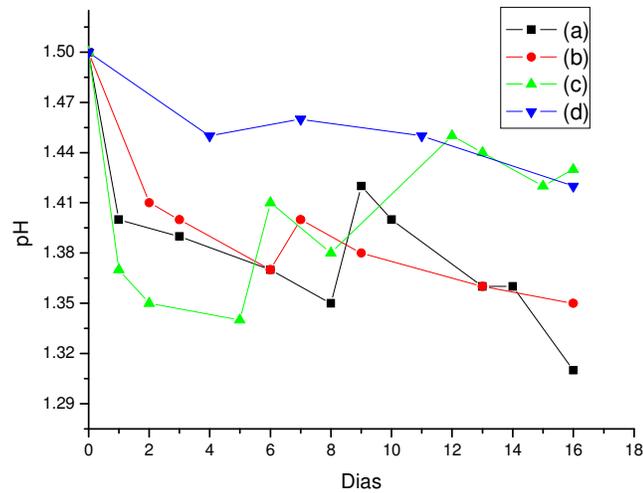


Fig. 4.1: evolución de pH de los experimentos de lixiviación en: (a): los Mos están en ambos compartimentos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (d) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

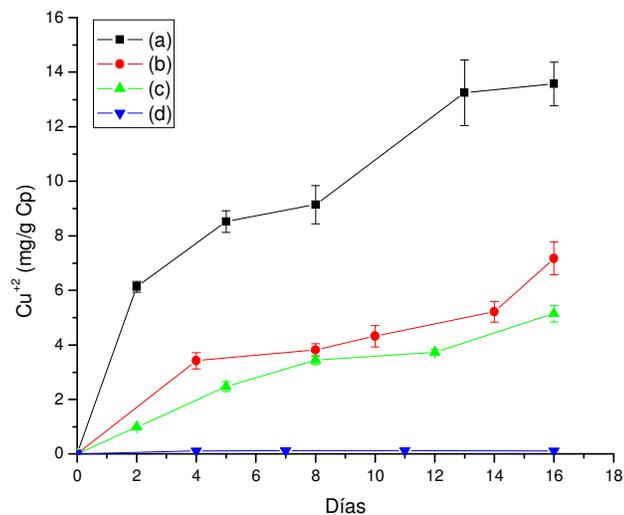


Fig. 4.2: Cu<sup>2+</sup> de los experimentos de lixiviación en: (a) los Mos están en ambos compartimentos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (d) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

En el caso del hierro total, figura 4.3, se observa que en los casos en que hay *S. metallicus* el hierro aumenta hasta el quinto día pero luego disminuye. Esto puede deberse a que en un principio el hierro total se encuentra en la solución como  $\text{Fe}^{+2}$ , que los microorganismos oxidan y luego comienza a precipitar el  $\text{Fe}^{+3}$  como jarosita (Stott et al. 2001). El tiempo donde se alcanza el máximo de hierro disuelto indica el momento cuando la velocidad de precipitación se hace más rápida que la tasa de remoción desde la calcopirita. Este fenómeno no se observa en los casos sin microorganismos donde la concentración de hierro total va aumentando probablemente sólo como  $\text{Fe}^{+2}$ . Además, se observa que en los casos abióticos la razón molar Cu:Fe es aproximadamente 1:1 lo que es consistente con la estequiometría de disolución de la calcopirita.

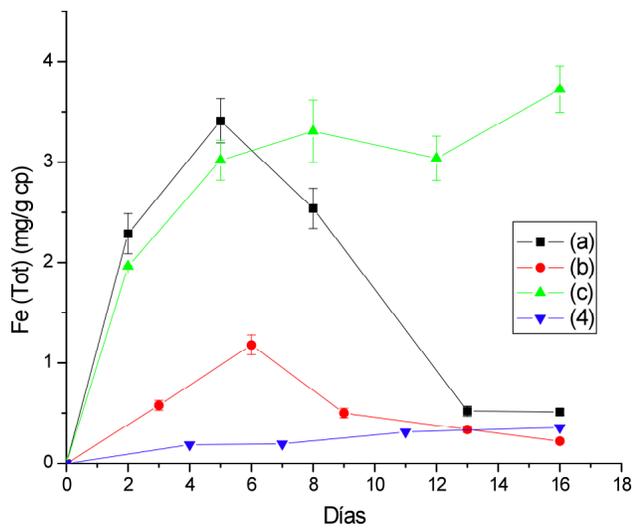


Fig. 4.3: Fe(total) de los experimentos de lixiviación en: (a) los Mos están en ambos compartimientos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de  $\text{O}_2$  (abiótico) y (d) en presencia de  $\text{N}_2$  (abiótico).

En la Figura 4.4 se presentan los datos de concentración de ión sulfato en los 4 experimentos. En los experimentos con microorganismos se observa que se produce sulfato, en cambio en los experimentos abióticos el sulfato comienza a disminuir. De

las curvas de sulfato de los dos experimentos con *S. metallicus* se observa que hay una cantidad similar de sulfato, a pesar de que hay una mayor cantidad de cobre y hierro en la solución en el caso en las células están en ambos compartimientos. Esto puede deberse a que los microorganismos mantengan parte del azufre que se libera del mineral como otro(s) compuesto(s) distinto(s) del sulfato.

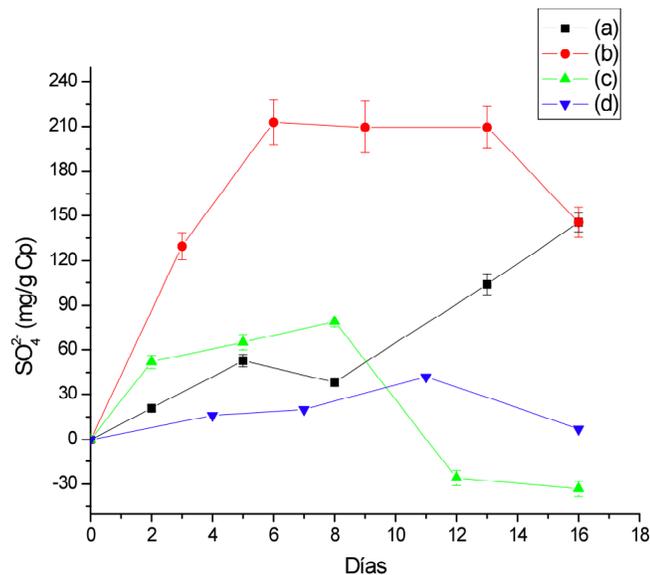


Fig. 4.4: Sulfato de los experimentos de lixiviación en: (a) los Mos están en ambos compartimientos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (d) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

En las figuras 4.5 y 4.6 se presenta el crecimiento de los microorganismos en la solución. En la figura 4.6 se observa que al separar los microorganismos del mineral la población disminuye rápidamente, en cambio, en la figura 4.5 al colocar los *S. metallicus* en ambos compartimientos, los microorganismos de compartimento A (separados del mineral) en un principio crecen y luego disminuyen, aunque ya a los 6 días la población se mantiene bastante constante. Esto indica que es necesaria la adherencia de algunos microorganismos a la superficie del mineral para producir algún compuesto intermedio que queda en la solución y que los microorganismos libres

toman para seguir su crecimiento. Este comportamiento sería similar al mecanismo observado para *At. ferrooxidans* en la oxidación de azufre elemental (Shrihari et al. (1993)). La disminución de la población en el compartimiento A se podría deber a que a medida que el tiempo pasa durante la experiencia la población que hay en la solución en el compartimiento B también aumenta (adheridos a la superficie del sulfuro) impidiendo que los compuestos intermedios puedan llegar al compartimiento A. En el anexo B se presenta una comparación de este experimento con calcopirita sintética y sobre azufre, donde se observa el mismo comportamiento por parte de los *Sulfolobus metallicus* que el caso anteriormente descrito, es decir que es necesaria la adherencia de algunos microorganismos a la superficie de la calcopirita o de azufre para producir algún compuesto intermedio que queda en la solución y que los microorganismos libres toman para seguir su crecimiento.

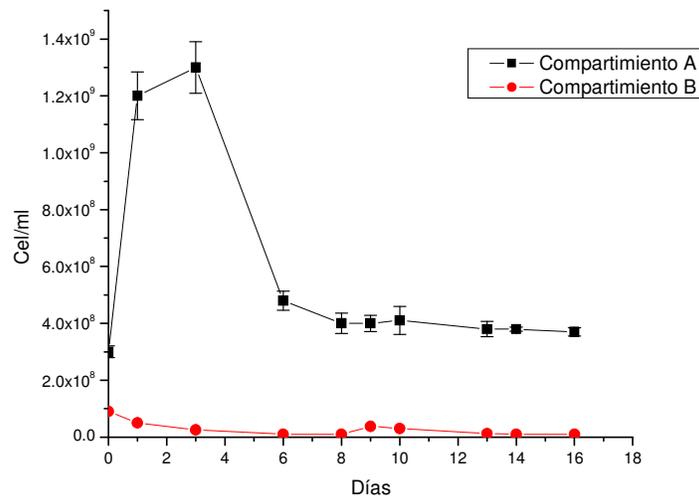


Fig. 4.5: Evolución de los *S. metallicus* en el caso en que se encuentran en ambos compartimientos.

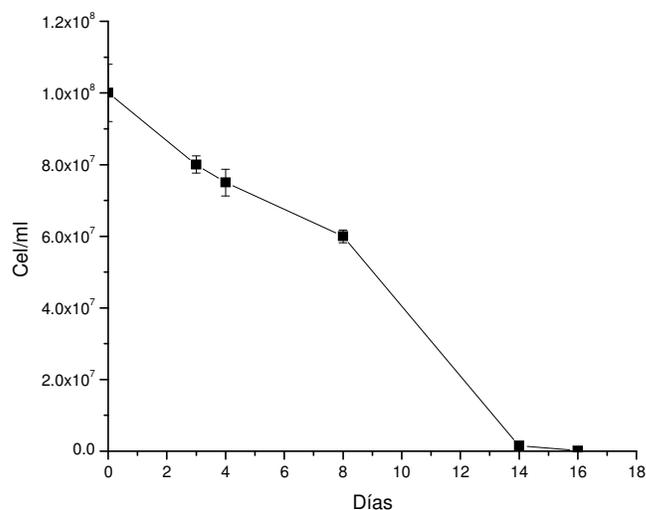


Fig. 4.6: Evolución de los *S. metallicus* en el caso en que se encuentran separados del mineral.

#### **4.2 TIPOS DE ACTIVIDAD OXIDATIVA:**

Para determinar el tipo de actividad oxidativa de los *S. metallicus* sobre el azufre de la calcopirita se realizó un set de tres experimentos: (a) se contactó la calcopirita con *S. metallicus*, (b) la calcopirita fue puesta en el medio basal (abiótico) en presencia de O<sub>2</sub> y (c) la calcopirita fue puesta en el medio basal (abiótico) en presencia de N<sub>2</sub>. En estos experimentos se monitoreó los diferentes compuestos oxidados del azufre en solución, mediante la técnica de HPLC.

En la figura 4.7 se presenta la evolución del Eh de las soluciones en los 3 experimentos. En ellas se observa que hay diferentes estados de oxidación que predominan en los experimentos abióticos e inoculado. En el caso abiótico oxigenado en un principio el Eh baja y luego a partir del día 10 comienza a aumentar. Es posible que esto se deba a que en la lixiviación de la calcopirita se produzca Fe<sup>+2</sup> que haría bajar el Eh y a partir del día 10 el Fe<sup>+2</sup> comience a oxidarse debido al O<sub>2</sub> presente. En

cambio en el caso con los microorganismos se observa que el Eh se mantiene en valores altos permanentemente debido a que los microorganismos oxidan el  $\text{Fe}^{+2}$  que se produce a partir de la disolución de la calcopirita.

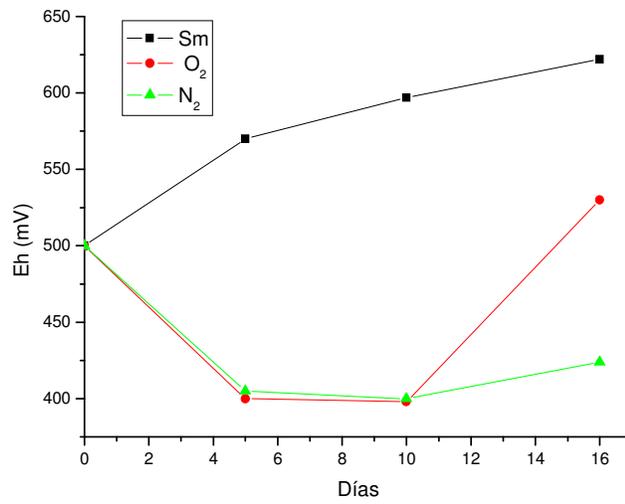


Fig. 4.7: Eh la solución con *S. metallicus*, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.

En la figura 4.8 se presenta la concentración de  $\text{Cu}^{+2}$  en la solución para los tres experimentos. Se observa que la mayor concentración de cobre en la solución se produce en presencia de los microorganismos seguido por el caso de la calcopirita en presencia de O<sub>2</sub> y finalmente el caso en que la calcopirita está en presencia de N<sub>2</sub>. Además, al comparar los resultados del experimento con microorganismos con los del caso abiótico aireado se observa que un tercio de la concentración de cobre en la biolixiviación se debe a la presencia del O<sub>2</sub>. Estos resultados son comparables con los resultados obtenidos con el set de experimentos reportados en la sección 4.1.

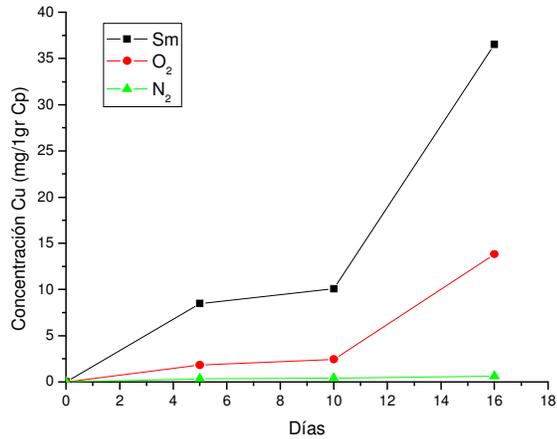
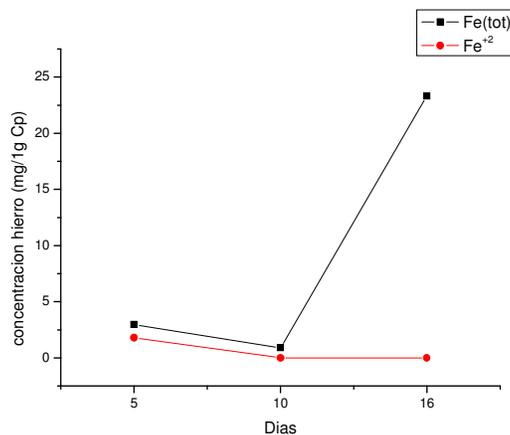
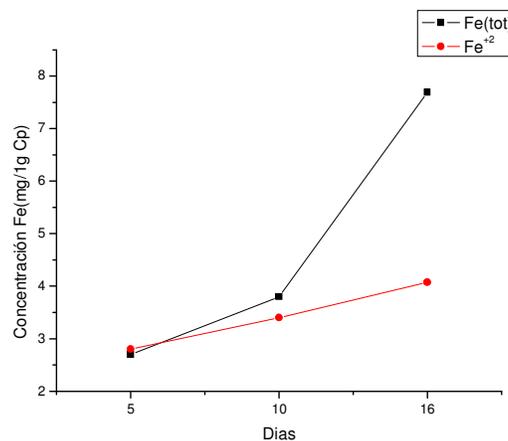


Fig. 4.8: Concentración de cobre en la solución con *S. metallicus*, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>.

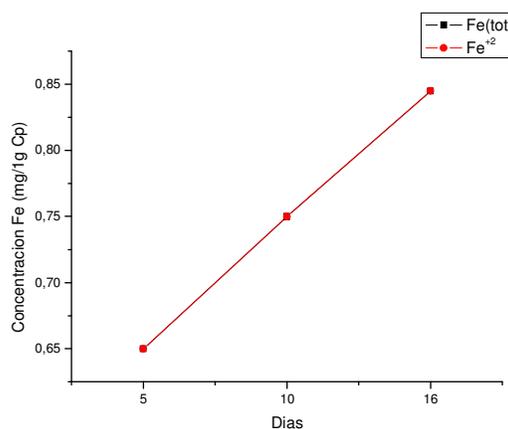
En las figuras 4.9(a), (b) y (c) se presentan las curvas de hierro total y Fe<sup>+2</sup> para los tres experimentos. En la figura 4.8 se observa que en presencia de los microorganismos hasta el día 10 se encuentra que el hierro total en la solución es aproximadamente 50% como Fe<sup>+2</sup> y 50% como Fe<sup>+3</sup>. Luego, después del día 10 se observa que todo el hierro presente en la solución está como Fe<sup>+3</sup>. En la figura 4.8(b) se observa que el hierro presente en la solución sin microorganismos se encuentra 50% como Fe<sup>+2</sup> y 50% como Fe<sup>+3</sup>. En la figura 4.8(c) se observa que cuando no hay O<sub>2</sub> el hierro en la solución está como Fe<sup>+2</sup>. Al comparar las curvas de hierro total del experimento con *S. metallicus* con los datos de hierro total del experimentos de hierro total realizados en el reactor de doble cámara se observa un efecto debido a la separación de los *S. metallicus* del mineral que hace que el hierro en solución disminuya, por lo tanto, la población planctónica favorece la oxidación a Fe<sup>+3</sup> y posterior precipitación de este ión.



(a)



(b)



(c)

Fig.4.9: concentración de Fe(tot) y Fe<sup>+2</sup> en la solución (a) con *S. metallicus*, (b) en presencia de O<sub>2</sub> y (c) en presencia de N<sub>2</sub>.

Los compuestos de azufre intermedios se monitorearon durante la lixiviación de la calcopirita en los tres experimentos a través de HPLC. En las tablas 4.1, 4.2 y 4.3 se presentan los compuestos de azufre detectados en distintos tiempos de lixiviación. En ellas se observa que el caso en que la solución está en un ambiente de N<sub>2</sub> sólo se

detectó bisulfato ( $\text{HSO}_4^-$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (especies con el azufre en estado de oxidación  $\text{S}^{+6}$ ). Estas especies corresponden a las presentes en el medio basal. En cambio en el caso en que la solución está en contacto con el  $\text{O}_2$  se detectó, además del bisulfato y sulfato, bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), especie en que el azufre está como  $\text{S}^{+4}$ . En el caso de la solución en presencia de *S. metallicus* se detectó también tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) y sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), en que el azufre está presente como  $\text{S}^{+4}$  y  $\text{S}^{+6}$  respectivamente.

Tabla 4.1: compuestos intermedios de azufre en la solución en presencia de *S. metallicus*.

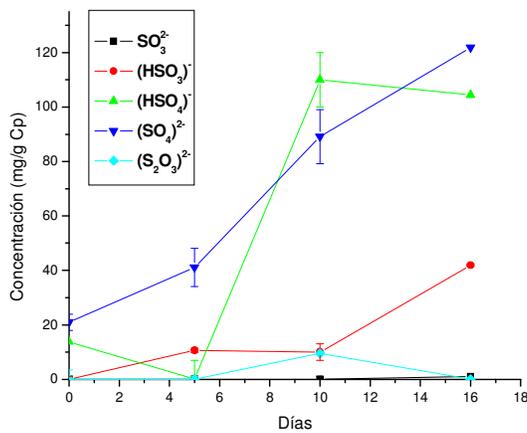
Días	Estado: $\text{S}^{+2}$ .	Estado: $\text{S}^{+4}$ .	Estado: $\text{S}^{+4}$ .	Estado: $\text{S}^{+6}$ .	Estado: $\text{S}^{+6}$ .
5	--	--	$(\text{HSO}_3)^-$	--	$(\text{SO}_4)^{2-}$
10	$(\text{S}_2\text{O}_3)^{2-}$	--	$(\text{HSO}_3)^-$	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$
16	--	$(\text{SO}_3)^{2-}$	$(\text{HSO}_3)^-$	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$

Tabla 4.2: compuestos intermedios de azufre en la solución en presencia de  $\text{O}_2$ .

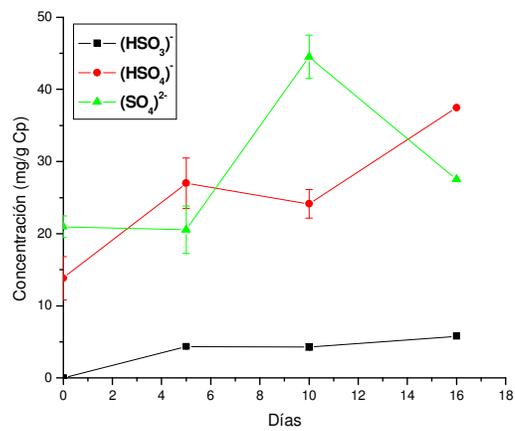
Días	Estado: $\text{S}^{+2}$ .	Estado: $\text{S}^{+4}$ .	Estado: $\text{S}^{+4}$ .	Estado: $\text{S}^{+6}$ .	Estado: $\text{S}^{+6}$ .
5	--	--	$(\text{HSO}_3)^-$	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$
10	--	--	$(\text{HSO}_3)^-$	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$
16	--	--	$(\text{HSO}_3)^-$	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$

Tabla 4.3: compuestos intermedios de azufre en la solución en presencia de  $\text{N}_2$ .

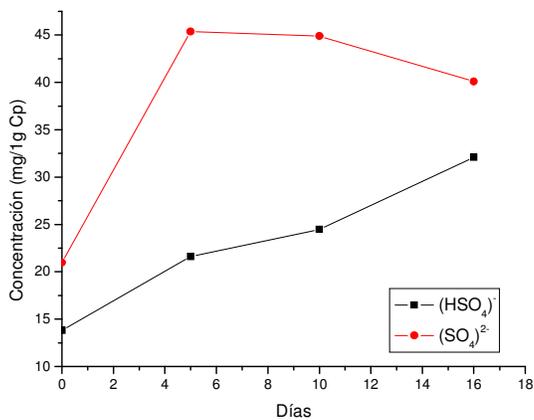
Días	Estado: $\text{S}^{+2}$ .	Estado: $\text{S}^{+4}$ .	Estado: $\text{S}^{+4}$ .	Estado: $\text{S}^{+6}$ .	Estado: $\text{S}^{+6}$ .
5	--	--	--	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$
10	--	--	--	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$
16	--	--	--	$(\text{HSO}_4)^-$	$(\text{SO}_4)^{2-}$



(a)



(b)



(c)

Fig.4.10: concentración de los compuestos de azufre detectados en la solución (a) con *S. metallicus*, (b) en presencia de  $\text{O}_2$  y (c) en presencia de  $\text{N}_2$ .

Una vez terminado los experimentos se analizó a través de DRX los sólidos. Tabla 4.4, y se determinó que: En los tres casos se observa que la lixiviación favorece un cambio de calcopirita tetragonal a cúbica.

La muestra originalmente contiene 98% calcopirita tetragonal y 2% pirita cúbica.

Tabla 4.4: Análisis DRX-rietveld de los sólidos

muestra	grado cristalinidad	Calcopirita tetragonal [%]	Calcopirita cúbica [%]	FeS [%]
Sm	menor	97	2	1
O <sub>2</sub>	intermedio	99	1	0
N <sub>2</sub>	intermedio	>99	<1	0

#### **4.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE *S. metallicus* EN PRESENCIA DE 1 g/L Fe<sup>+3</sup>:**

Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en la sección anterior, es decir, en ausencia de hierro inicial, se realizaron un set de experimentos complementarios en presencia de hierro inicial con un montaje experimental similar al descrito en la sección 4.1 pero a estos nuevos experimentos se les agregó 1 g/l de Fe<sup>+3</sup>.

Para determinar el mecanismo de acción de *Sulfolobus metallicus* se realizaron cinco tipos de experimentos:

- (1) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó de Calcopirita y medio Norris + Fe<sup>+3</sup> en presencia de aire.
- (2) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó Calcopirita y medio Norris + Fe<sup>+3</sup> en presencia de aire y se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para regenerar el férrico.
- (3) En un matraz Erlenmayer de 250 ml se agregó Calcopirita y medio Norris + Fe<sup>+3</sup> en una atmósfera de nitrógeno.
- (4) En un reactor de doble cámara (Figura 2.2) se colocó en el compartimiento A 2,2\*10<sup>8</sup> cel/ml iniciales + medio Norris + Fe<sup>+3</sup> y en el compartimiento B y 2\*10<sup>8</sup> cel/ml iniciales + medio Norris + Fe<sup>+3</sup>.
- (5) En un reactor de doble cámara (Figura 2.2), en el compartimiento A se colocó 2,2\*10<sup>8</sup> cel/ml iniciales + medio Norris + Fe<sup>+3</sup> y en el compartimiento B se colocó medio Norris + Fe<sup>+3</sup>.

Los 5 experimentos se colocaron en el shaker durante 12 días. Se monitorearon el pH, Eh, la población y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar el cobre, hierro total y sulfato en solución que fueron analizadas por la técnica de absorción atómica. También, se analizó el medio de cultivo, determinando los compuestos intermedios de azufre a través de HPLC y los compuestos de hierro por espectrofotometría UV-Visible

En las figuras 4.11 a la 4.14 se presentan el pH, cobre, hierro y sulfato en los experimentos 1 a 5 anteriormente descritos. Al comparar el pH en los 5 experimentos se observa una acidificación del medio en los casos en que hay microorganismos y un consumo de ácido en los casos abióticos. Por otro lado, se produce una mayor cantidad de cobre liberado en los casos abióticos aireados, seguidos por los casos en que hay *S. metallicus* y en último caso el experimento abiótico en presencia de aire. En los casos con microorganismos la recuperación de cobre es comparable en los casos que el microorganismo puede o no aproximarse a la calcopirita. En cuanto al hierro total se observa que en los casos en que hay células el hierro total disminuye rápidamente. Este fenómeno es más lento en los casos sin microorganismos. Esto indica que existe un efecto inhibitorio por parte de los *S. metallicus* ya que harían precipitar más rápido el hierro (que los casos abiótico-aeróbicos) impidiendo una futura lixiviación del mineral lo que justificaría la baja recuperación de cobre. También en estos experimentos con microorganismos se observa que se produce sulfato debido a que la oxidación del azufre de la calcopirita es mayor que el sulfato utilizado en la precipitación de las jarositas, en cambio en los experimentos abióticos este fenómeno es inverso ya que el sulfato comienza a disminuir, al igual que los casos sin agregar  $Fe^{+3}$  inicialmente. Adicionalmente en el caso abiótico en presencia de  $N_2$  se observa que estequiométricamente se consume el férrico presente y se libera cobre en razón Cu:Fe aproximadamente 1:5, una vez que el férrico se consume la recuperación de cobre se detiene pues ya no existe ningún agente oxidante en el sistema.

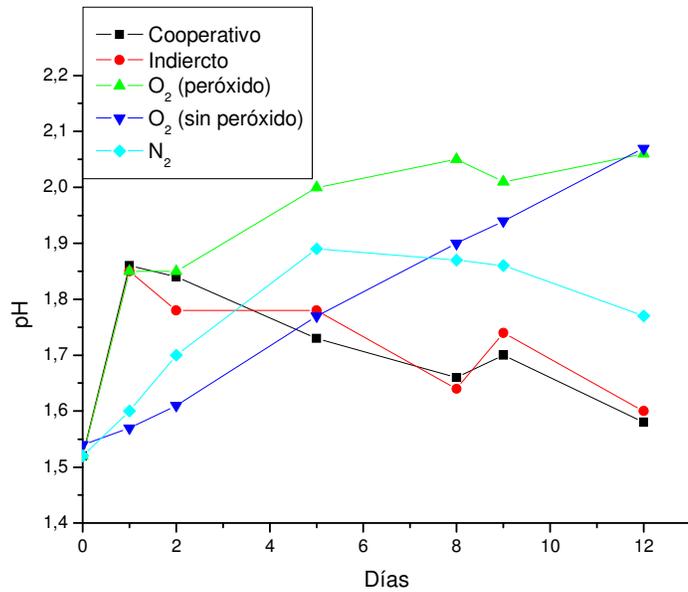


Fig. 4.11: evolución de pH de los experimentos de lixiviación en: (a): los *S. metallicus* están en ambos compartimientos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (d) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (e) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

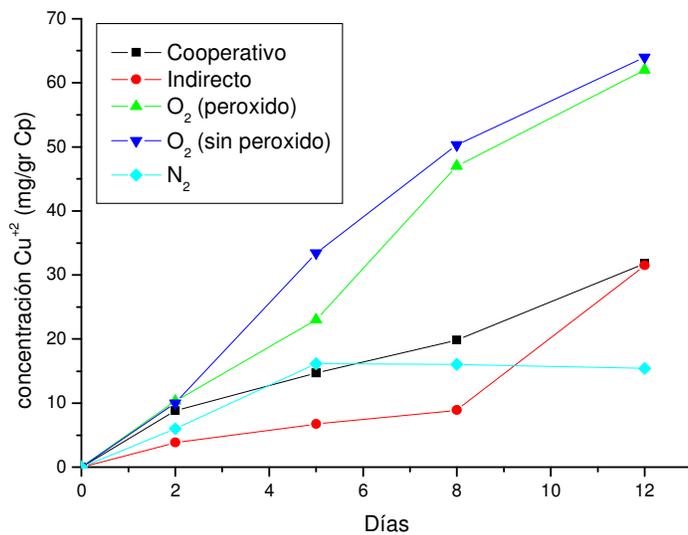


Fig. 4.12: Cu<sup>+2</sup> de los experimentos de lixiviación en: (a) los *S. metallicus* están en ambos compartimientos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (d) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (e) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

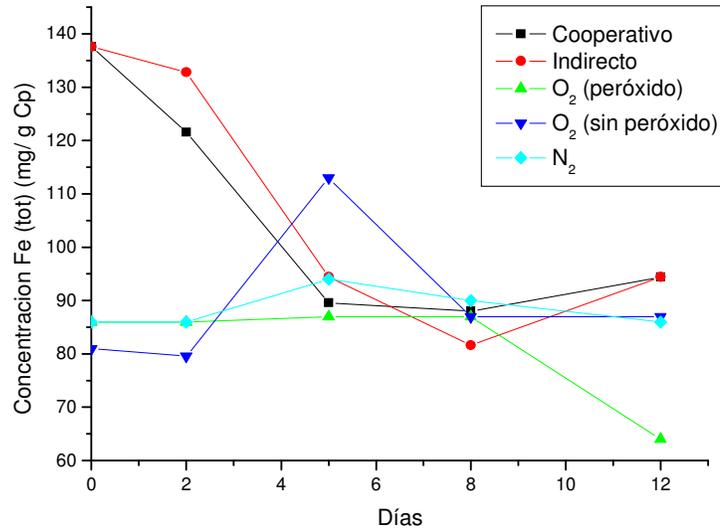


Fig. 4.13: Fe(total) de los experimentos de lixiviación en: (a) los *S. metallicus* están en ambos compartimientos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (d) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (e) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

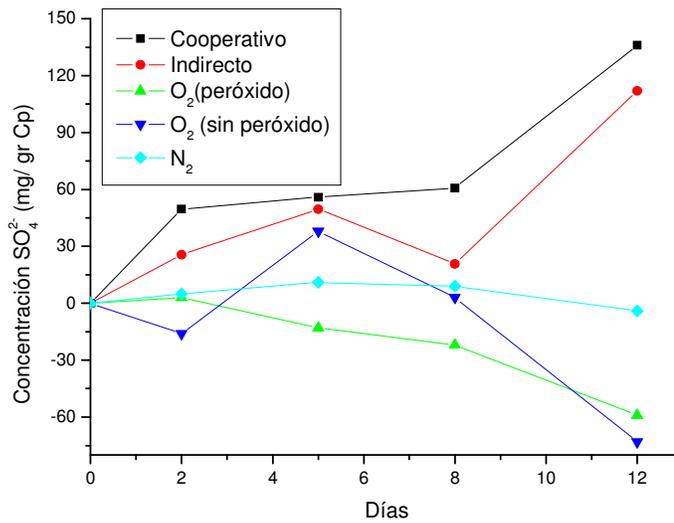


Fig. 4.14: Sulfato de los experimentos de lixiviación en: (a) los *S. metallicus* están en ambos compartimientos, (b) separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (d) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (e) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

En las figuras 4.15 y 4.16 se presenta el crecimiento de los microorganismos en la solución. En la figura 4.15 se observa que al colocar las células en ambos compartimientos, la población de ambos compartimientos se comporta de manera similar, donde en un principio decrece y luego se mantiene alrededor de  $1 \cdot 10^7$  cel/ml. En la figura 4.16 se observa que al separar los microorganismos del mineral la población disminuye y luego a partir del día 8 la población se mantiene alrededor de  $1 \cdot 10^7$  cel/ml. Esto muestra que en presencia de hierro en la solución no es necesaria la adherencia de microorganismos a la superficie del mineral para mantener viable la población de microorganismos. Además, en ambas figuras se observa que la población planctónica de microorganismos en los últimos días de la experiencias se mantiene en aproximadamente  $1 \cdot 10^7$  cel/ml, indicando que esa es la población viable una vez que se llega a una condición de equilibrio en este sistema.

Con toda esta información es posible determinar que los microorganismos en presencia de  $Fe^{+3}$  inicial puedan actuar a sin la necesidad de adherirse a la superficie de la calcopirita, es decir, los *S. metallicus* que se mantienen libres en la solución llevan  $Fe^{+2}$  producido por la lixiviación de la calcopirita a  $Fe^{+3}$  que finalmente actúa sobre el mineral o precipita como jarosita.

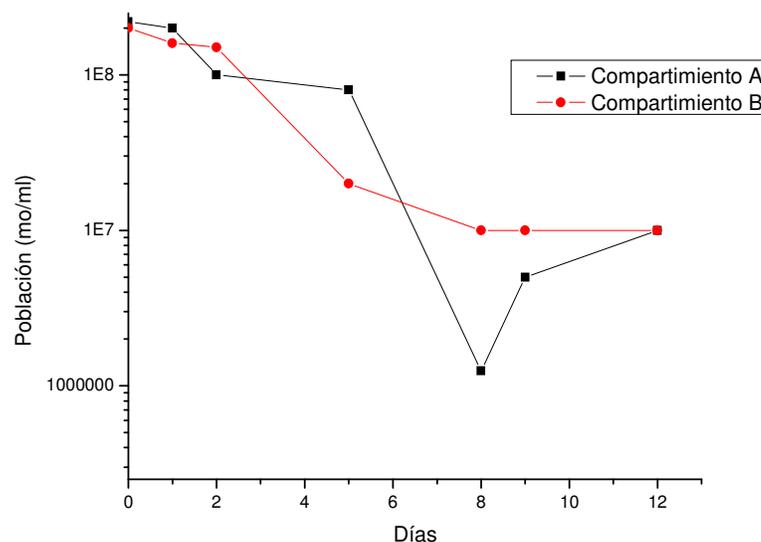


Fig. 4.15: Evolución de los *S. metallicus* en el caso en que se encuentran en ambos compartimientos.

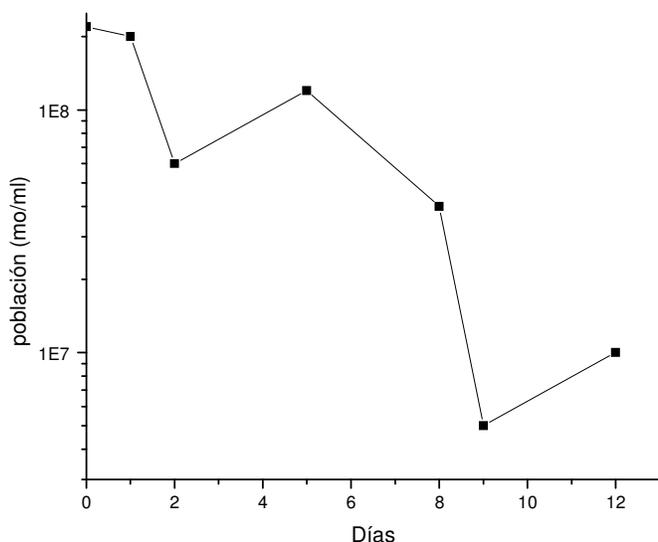


Fig.4.16: Evolución de los *S. metallicus* en el caso en que se encuentran separados del mineral.

En la figura 4.17 se presenta la evolución del Eh de las soluciones. En ella se observa que en el caso abiótico con  $N_2$  el Eh en un principio baja y luego se mantiene. Esto se debe a que no hay ningún agente oxidante que lleve el  $Fe^{+2}$  producido nuevamente a  $Fe^{+3}$ . El caso abiótico-aeróbico en que se agregó  $H_2O_2$  no presenta mayores cambios que el caso en que no se agregó este reactivo. A pesar que, al momento en que este se agregó, el valor de Eh aumentó hasta alrededor de 660 mV vs Ag/AgCl, pero este aumento de Eh duró sólo un par de horas sin obtener ninguna diferencia visible en los resultados. En cambio, en el caso con los microorganismos se observa que el Eh en el compartimiento B se mantiene alto ya que las células mantienen todo el hierro que hay en la solución como  $Fe^{+3}$ . En el compartimiento A se midió un Eh similar al compartimiento B.

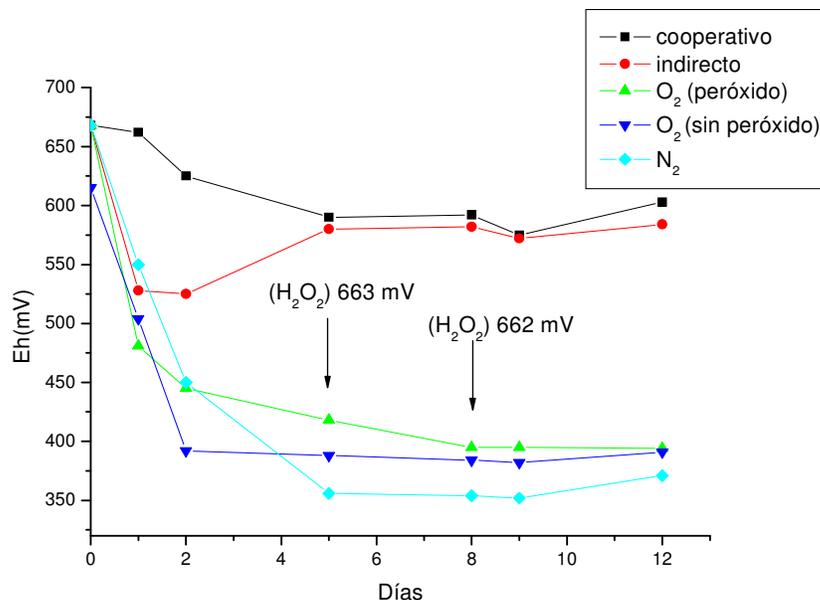
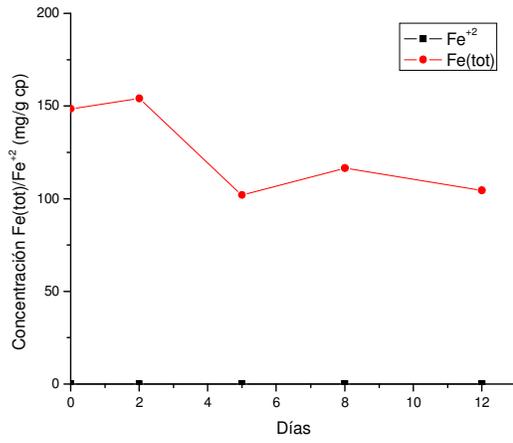


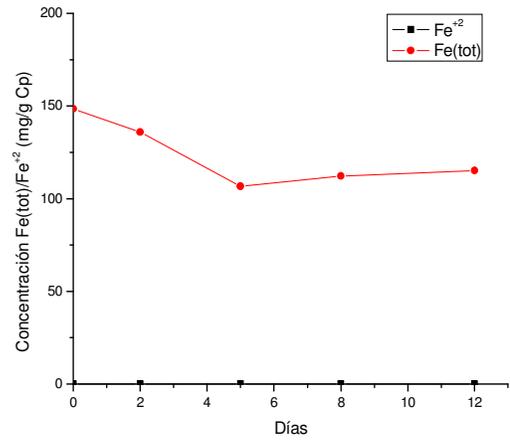
Fig. 4.17: Eh en la solución con (a) los *S. metallicus* están en ambos compartimientos, (b) microorganismos separados del mineral, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (d) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (e) en presencia de N<sub>2</sub> (abiótico).

En las figuras 4.18(a), (b), (c), (d) y (e) se presentan las curvas de hierro total y Fe<sup>+2</sup> para los cuatro experimentos. En las figuras 4.18 (a) y (b) se observa que en presencia de los microorganismos todo el hierro total en la solución está como Fe<sup>+3</sup>. En cambio en los casos abióticos rápidamente el hierro se transforma a Fe<sup>+2</sup>.

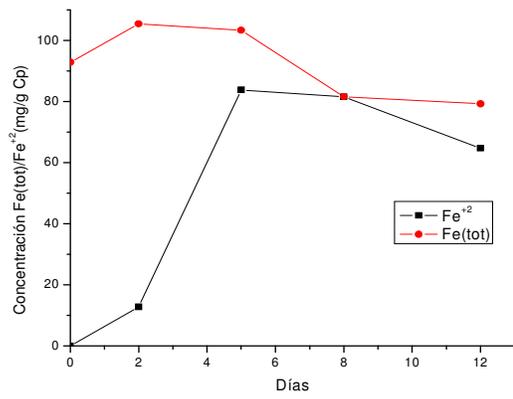
En las tablas 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8 se presentan los compuestos de azufre detectados en las soluciones de los cinco experimentos. Se observan compuestos intermedios de azufre similares salvo en el caso abiótico-aeróbico (con y sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) donde además se detectó tetrionato.



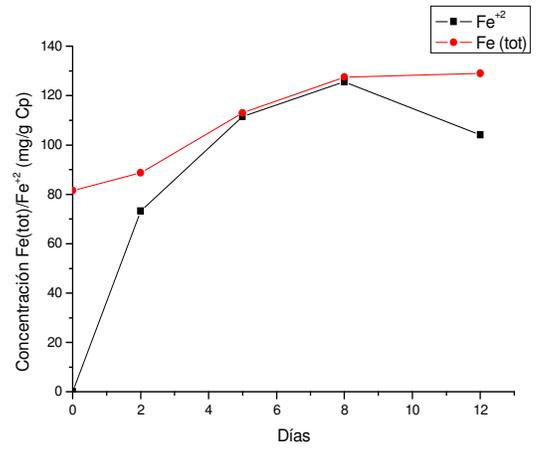
(a)



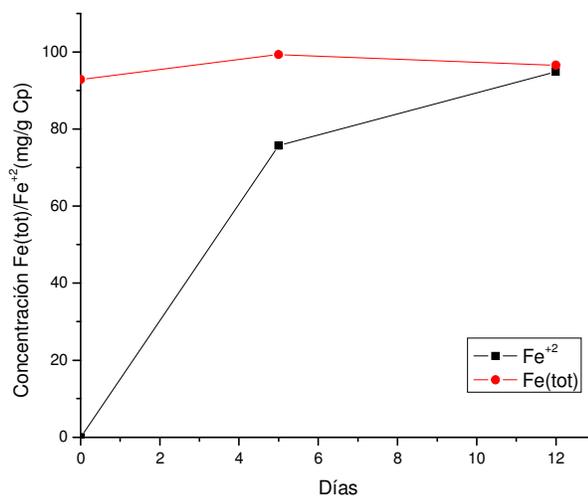
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig.4.18: concentración de Fe(tot) y Fe<sup>+2</sup> en la solución (a) cooperativo, (b) indirecto, (c) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (d) en presencia de O<sub>2</sub> (abiótico) y (e) en presencia de N<sub>2</sub>.

Tabla 4.5: compuestos intermedios de azufre en la solución en caso cooperativo e indirecto.

Días	Estado: S <sup>-2</sup> .	Estado: S <sup>+2</sup> .	Estado: S <sup>+4</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .
5	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
9	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
12	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>

Tabla 4.6: compuestos intermedios de azufre en la solución en presencia de O<sub>2</sub> (con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Días	Estado: S <sup>-2</sup> .	Estado: S <sup>+2</sup> .	Estado: S <sup>+2</sup> .	Estado: S <sup>+4</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .
5	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
9	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
12	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>

Tabla 4.7: compuestos intermedios de azufre en la solución en presencia de O<sub>2</sub>.

Días	Estado: S <sup>-2</sup> .	Estado: S <sup>+2</sup> .	Estado: S <sup>+4</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .
5	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
9	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
12	--	(S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>

Tabla 4.8: compuestos intermedios de azufre en la solución en presencia de N<sub>2</sub>.

Días	Estado: S <sup>-2</sup> .	Estado: S <sup>+2</sup> .	Estado: S <sup>+4</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .	Estado: S <sup>+6</sup> .
5	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
9	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>
12	(S) <sup>2-</sup>	(S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(SO <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	(HSO <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	(SO <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>

La principal diferencia observada entre los compuestos detectados en los 5 experimentos es el caso abiótico-aeróbico en que se detectó tetratiónato y el caso en que se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en que se observó tetratiónato y tiosulfato. Por otro lado, los compuestos de azufre detectados en los casos abiótico-N<sub>2</sub>, abiótico-O<sub>2</sub> y con *S. metallicus* son los mismos, una posible explicación puede ser que las primeras etapas de la disolución de la calcopirita sean realizada principalmente por el hierro presente y no por los microorganismos. Estas células entonces, principalmente oxidarían el Fe<sup>+2</sup> y los compuestos de azufre que se forman luego de la disolución de la calcopirita.

Análisis de difracción de los sólidos:

En todas las muestras lixiviadas (Tabla 4.9) se observa azufre alpha cristalino y calcopirita poco cristalina. Se observó también que la jarosita (K-jarosita) está amorfa tendiendo a la cristalinidad. El orden de amorficidad de las muestras es: O<sub>2</sub>>Indirecto>cooperativo>N<sub>2</sub>. El error asociado a la medición es del 10%.

En el caso O<sub>2</sub> (agregando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sin agregarlo) se detectó la presencia de azufre formado en el sólido. Esto indica que la lixiviación abiótica en presencia de O<sub>2</sub> y hierro

forma azufre elemental sobre la superficie del mineral además de la precipitación de jarositas, lo que explicaría la disminución de sulfato en la solución durante la experiencia. En el caso que hay presencia de microorganismos se detecta muy poco azufre elemental detectado ya que estas células son capaces de oxidarlo.

Por otro lado, los porcentajes de jarositas detectados son mayores en el caso abiótico aeróbico que en los casos con microorganismos pero la masa de sólido en los casos abióticos aeróbicos son menores que los casos con microorganismos. Lamentablemente, no se pudo determinar la masa de sólido con la suficiente precisión como para realizar un análisis más detallado.

Tabla 4.9:

muestra	Grado cristalinidad	Calcopirita tetragonal [%]	Calcopirita cúbica [%]	Azufre [%]	Jarosita [%]
cooperativo	Intermedio	76.53	0	2.16	21.31
indirecto	Menor	80.36	0	4.34	15.30
O <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Menor	44.69	0	30.52	24.78
O <sub>2</sub> (sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Menor	39	0	35	36
N <sub>2</sub>	Intermedio	>98	<1	<1	0

La muestra originalmente contiene 98% calcopirita tetragonal y 2% pirita cúbica.

#### **4.4 MODELO CINETICO DE LIXIVIACION**

Se realizaron 6 experimentos en matraces Erlenmayer de 250 ml para determinar el modelo cinético de lixiviación, en esta ocasión no se utilizó el reactor de doble cámara para los microorganismos sino que sólo se puso en contacto los microorganismos con el mineral.

- E1: 1 g cpy natural, 100 ml medio Norris y O<sub>2</sub>,
- E2: 1 g cpy natural, 100 ml medio Norris, 2,6\*10<sup>8</sup> cel/ml y O<sub>2</sub>,
- E3: 1 g cpy natural, 100 ml medio Norris y N<sub>2</sub>,
- E4: 1 g cpy natural, 100 ml medio Norris + 1 g/l Fe<sup>+3</sup> y O<sub>2</sub>,
- E5: 1 g cpy natural, 100 ml medio Norris +1 g/l Fe<sup>+3</sup>, 2,6\*10<sup>8</sup> cel/ml y O<sub>2</sub>
- E6: 1 g cpy natural, 100 ml medio Norris + 1 g/l Fe<sup>+3</sup> y N<sub>2</sub>.

Todos los experimentos se realizaron a 70°C y 150 rpm. Se tomaron muestras de Cu<sup>+2</sup> (absorción atómica), Fe<sup>+2</sup>, Fe<sup>+3</sup> y (SO<sub>4</sub>)<sup>2-</sup> (UV-visible). Además, una vez terminado los experimentos se analizó cobre, hierro y azufre total en el sólido por ICP, para realizar un balance de masa de los elementos presentes en la lixiviación. El detalle de estos resultados se presentan en el anexo C. Estas experiencias se realizaron para ajustar el modelo del núcleo sin reaccionar y determinar si el fenómeno es controlado por difusión, por reacción o mixto. En la figura 4.19 se observan las recuperaciones de cobre para cada uno de los casos. A estos experimentos no se les realizó un duplicado ya que los valores las tendencias de la concentración de cobre en solución corresponden a las obtenidas en las secciones anteriores.

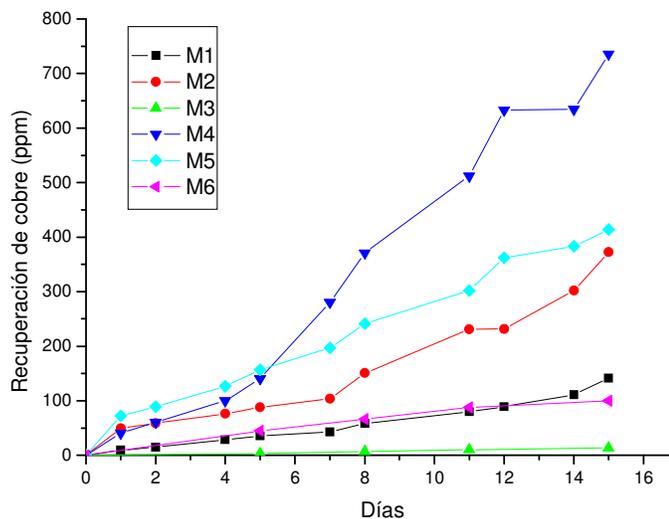


Figura 4.19: recuperación de cobre en M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de Fe<sup>+3</sup>, M5: *S. metallicus* en presencia de Fe<sup>+3</sup>, M6: abiótico-anaeróbico en presencia de Fe<sup>+3</sup>

Modelo del núcleo sin reaccionar:

Se ajustó el modelo del modelo del núcleo sin reaccionar a los 6 experimentos, Tabla 4.11, de la siguiente manera: (Levenspiel 2000)

Difusión :

$$T = \tau(1-3(1-x)^{2/3}+2(1-x))$$

x= recuperación de cobre,  $\tau$ = tiempo que se demora el sulfuro en lixivarse completamente, T=tiempo.

Reacción :

$$T = \tau(1-(1-x)^{1/3})$$

Y un modelo Mixto:

$$T = y\tau(1-3(1-x)^{2/3}+2(1-x)) + (1-y)\tau(1-(1-x)^{1/3})$$

Curva de cobre corregido, para determinar el valor corregido de  $\tau$  :

$$\text{Recuperación} = (\text{g. solución/g. extracción final solución}) * (\text{extracción final sólido})$$

A modo de resumen se presenta el modelo ajustado y  $\tau$  corregido para todas las experiencias realizadas. El detalle de estos cálculos están en el Anexo C.

Tabla 4.10: resumen modelo del núcleo sin reaccionar.

<b>Muestra</b>	<b>Modelo</b>	<b><math>\tau</math> (días)</b>
<b>M1</b>	Control por reacción química	156
<b>M2</b>	Control por reacción química	154
<b>M3</b>	Control por reacción química	130
<b>M4</b>	Control por reacción química	124
<b>M5</b>	Control por reacción química	125
<b>M6</b>	Control por difusión	303

Con los valores de  $\tau$  corregido se determinó el tiempo teórico necesario para recuperara el 100% del cobre, donde se observa que en el caso en que no hay  $\text{Fe}^{+3}$

inicialmente en la solución el tiempo de lixiviación del mineral es sólo un 20% mayor que en el otro caso. Esto se debe a la formación de precipitados sobre la superficie que disminuyen la velocidad de disolución de la calcopirita. En el caso de M3 no se puede concluir ya que se tomaron pocas mediciones (5 puntos) por lo que tiene asociado un error grande, al igual que M6.

Se determinó que el fenómeno de lixiviación química y biológica de calcopirita es controlado por reacción química sobre la superficie salvo en el caso anaeróbico-abiótico con férrico en la solución, que es controlado por difusión. En el caso en que se utilizó el reactor de doble cámara para los experimentos sin hierro inicial también se ajustó el modelo del núcleo sin reaccionar, figura 4.20, los resultados indican que el fenómeno es controlado por difusión. Estas diferencias indican que mantener parte de la población planctónica físicamente separada del mineral cambia la etapa controlante de la bio-disolución de la calcopirita por la difusión de los compuestos intermedios de azufre desde la calcopirita hasta el tubo donde se encuentran confinados los microorganismos.

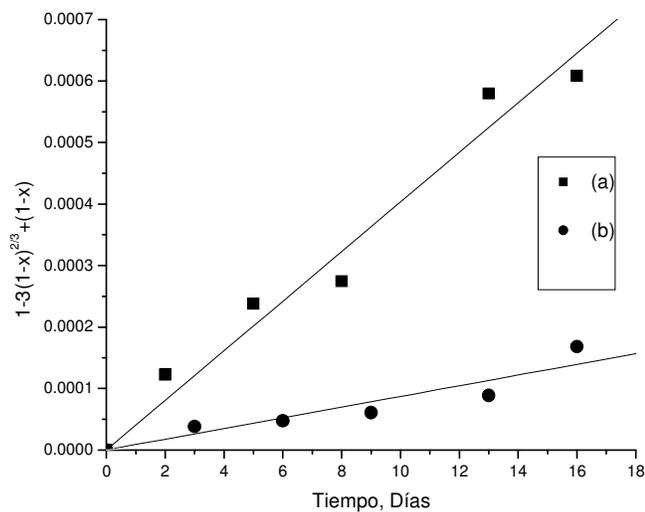


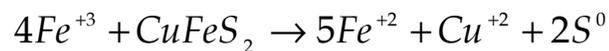
Figura 4.20: Modelo del núcleo sin reaccionar con difusión como etapa controlante para el sistema sin hierro inicial (a) Microorganismos en ambos compartimientos y (b) microorganismos separados del mineral

## **4.5 DISCUSIONES DEL CAPÍTULO**

### **a. Caso sin hierro inicial en la solución**

El aumento en las células planctónicas que se observan en la figura 4.5 se podría analizar en términos de un posible crecimiento de *S. metallicus* por la oxidación de  $Fe^{+2}$  producido durante la disolución de la calcopirita. Se podría estimar una población máxima que podría haber crecido suponiendo la situación extrema en que la calcopirita es disuelta únicamente por una lixiviación férrica y todo el ión férrico necesario ha sido producido por los microorganismos.

Suponiendo que la lixiviación férrica de calcopirita sigue la estequiometría:



El  $Fe^{+3}$  necesario para producir 14 mg de  $Cu^{+2}$  (ver figura 2) puede ser estimado en 49,3 mg. Se sabe que el yield de la oxidación de  $Fe^{+2}$  con *S. metallicus* es  $1,13 \cdot 10^6$  cel/ug  $Fe^{+2}$  (Escobar y Vargas, sin publicar). Con esta información, la población de microorganismos que pueden crecer en 49,3 mg de  $Fe^{+2}$  se estima en  $5,6 \cdot 10^{10}$  cel.

Por otro lado, en 160 ml de solución utilizado para el experimento la población es de  $3,5 \cdot 10^8$  cel/ml. Este resultado demuestra que la oxidación de  $Fe^{+2}$  por *S. metallicus* no da cuenta por sí solo del aumento de la población observada en el compartimento A, que sólo alcanza a  $1,3 \cdot 10^9$  cel/ml. Por lo tanto, el aumento de la población planctónica debe incluir la oxidación de compuestos intermedios solubles de azufre.

En las figuras 4.10(a), (b) y (c) de la sección 4.2 se presentan la evolución de los compuestos de azufre detectados en los tres experimentos. En estas figuras se observa que la mayor concentración de estos compuestos se produce en presencia de los microorganismos ya que ellos aceleran el proceso. La formación de  $(SO_4)^{2-}$  y  $(HSO_4)^-$  es alrededor de 4 veces más rápido que el caso aeróbico-abiótico: En el caso inoculado se forman 100 mg de  $SO_4^{2-}$  y 80 mg de  $(HSO_4)^-$  mientras que en el caso

abiótico aeróbico se formó 10 mg  $\text{SO}_4^{2-}$  y 25 mg  $(\text{HSO}_4)^-$ , es decir, *S. metallicus* producen  $180-35 = 145$  mg de especies  $\text{S}^{+6}$ . Por otro lado, la formación de  $(\text{HSO}_3)^-$  es 8 veces más rápido que el caso abiótico: 40 mg (caso inoculado)- 5 mg (caso abiótico-aeróbico) = 35 mg de especies  $\text{S}^{+4}$ . Además, en el caso inoculado se observa esporádicamente  $(\text{S}_2\text{O}_3)^{2-}$ . Las mediciones de concentraciones en el caso con *S. metallicus* presentan un 15% de error y el caso abiótico en presencia de  $\text{O}_2$  un 5% de error.

Se puede calcular la velocidad de formación de la especie  $\text{S}^{+4}$  sumando la masa acumulada en el experimento, 35 mg, a la masa consumida, que corresponde a la masa  $\text{S}^{+6}$  formada (145 mg). Por lo tanto se puede decir que la formación de las especies  $\text{S}^{+4}$  es 24% ( $35/145 * 100$ ) más rápido que la formación de las especies  $\text{S}^{+6}$ . Este comportamiento se puede relacionar a que los microorganismos se adhieren desde el principio al sulfuro y se mantienen en un contacto cercano a la capa de especies de sulfuros formada en la superficie de la calcopirita, este comportamiento ya había sido observado por otros autores (Rodríguez et al. 2003 y Escobar et al. 2003).

Se calculó también los moles de cobre, hierro y azufre liberados en estos tres experimentos y se verificó que para los casos abióticos en presencia de aire y de nitrógeno la razón molar Cu:Fe:S es aproximadamente 1:1:2. En el caso inoculado con *S. metallicus* se determinó que la razón molar de Cu:Fe:S es aproximadamente 1:1:4. Esto indica una lixiviación selectiva del azufre por parte de los microorganismos, esta situación ya se había observado en el capítulo anterior a través de EDS.

Con esta información se puede justificar las diferencias detectadas en la figura 4.4 donde las concentraciones de sulfato que se observan en ambos experimentos realizados en el reactor de doble cámara en que el sulfato es similar, se debe a que existe una cantidad importante de azufre en la solución que no se ha transformado a sulfato aún, si no que permanece como alguno(s) de los otros compuestos detectados. El caso en que los *S. metallicus* se encuentran separados del mineral tiene una mayor concentración de sulfato debido a que el oxígeno produce bisulfito que los microorganismos que se encuentran separados del mineral toman y rápidamente

pasan a sulfato (a una velocidad mayor que la que el mismo oxígeno pasaría el bisulfito a sulfato).

La información anterior indica que los microorganismos que se han adherido a la calcopirita producen un compuesto intermedio que es el tiosulfato que los microorganismos que están libres en la solución toman y oxidan a sulfito y bisulfito que finalmente pasa a sulfato. En el caso de la solución sin microorganismos en presencia de  $O_2$  el azufre proveniente del mineral pasa a la solución como bisulfito que finalmente pasa a sulfato.

En la figura 4.21 se propone un esquema del mecanismo de acción de *Sulfolobus metallicus* sobre la calcopirita natural. En este esquema se puede observar el ciclo  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  producido por los microorganismos en la solución y la secuencia de compuestos de azufre producidos por éstos. En esta secuencia se propone que una parte de los microorganismos se han adherido a la calcopirita produciendo un compuesto intermedio que es el tiosulfato que los microorganismos que quedan libres en la solución oxidan a sulfito y bisulfito que finalmente pasa a sulfato. Además, en el esquema se presenta la secuencia de la lixiviación de la calcopirita promovida por el oxígeno en que el oxígeno ataca la superficie del mineral liberando bisulfito que posteriormente pasa a sulfato.

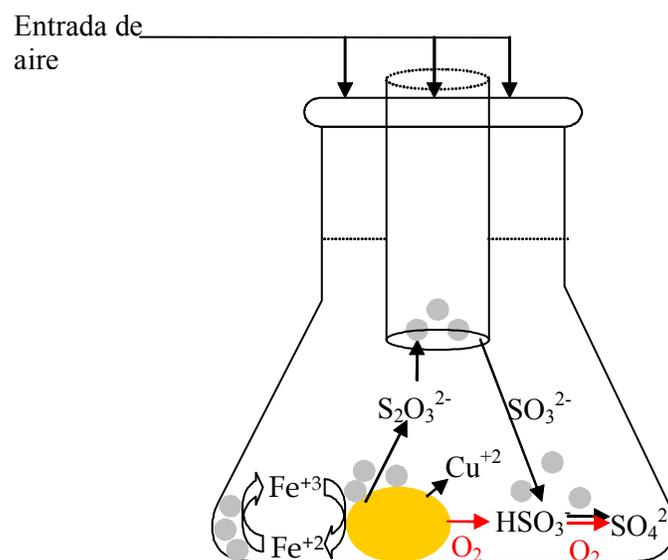


Fig.4.21: Esquema del mecanismo de acción de *S. metallicus* sobre calcopirita.

b. Caso con férrico inicial en la solución

En la sección 4.3 se presenta la lixiviación de calcopirita con 1g/l de  $\text{Fe}^{+3}$  en presencia y ausencia de *S. metallicus*, donde se observa que las mejores recuperaciones de cobre se producen en los casos abióticos aireados. Una posible explicación puede ser que al mantener el Eh de la solución en un valor alrededor de 450 mV vs Ag/AgCl se favorezca una reducción catódica del oxígeno sobre la superficie y así se acelere la disolución anódica que ocurriría distribuida sobre toda la superficie de la Calcopirita. Hiroyoshi et al. (1997) reportaron un resultado similar de disolución abiótica de la calcopirita en presencia de ferroso sobre calcopiritas de distintos orígenes. Estos autores determinaron que el ferroso por si solo no es capaz de disolver la calcopirita sino que necesita la presencia de oxígeno en la solución, pero no aclararon la naturaleza del fenómeno. Third et al. (2000) obtuvieron también que los mejores resultados de disolución de calcopirita se obtenían en presencia de ferroso y ausencia de microorganismos a 37°C, indicando que la disolución de la calcopirita es fuertemente dependiente del Eh en la solución, parámetro que tiene una influencia mucho mayor que la cantidad o la actividad de bacterias.

Al observar las figuras 4.15, 4.16 se determinó que en presencia de iones férricos la población planctónica es capaz de mantenerse aunque no tengan acceso directo al mineral. Por otra parte, los resultados de los compuestos intermedios de azufre muestran que no se observan grandes diferencias en los compuestos intermedios producidos entre los casos inoculados y los abióticos. Finalmente, de los análisis de DRX de los sólidos se determinó que el caso abiótico produce una gran cantidad de  $\text{S}^0$  sobre la superficie, en cambio en los casos inoculados se observa cantidad mucho menor (35% vs 4%). Una posible explicación es que los microorganismos que tienen acceso a la superficie oxidan ese azufre producido por la lixiviación férrica a un compuesto de azufre intermedio ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) que los microorganismos planctónicos utilicen para crecer. En el caso en que los microorganismos se mantienen separados del mineral, lo que sucedería es que el  $\text{S}^0$  formado sobre la superficie del mineral reaccione con  $\text{HSO}_3^-$  formando  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  que utilicen los microorganismos o directamente tomen el  $\text{S}^{2-}$  de la solución. Este razonamiento se debe a que no se puede explicar la

biolixiviación de la calcopirita sólo por la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  por parte de los microorganismos ya que al hacer el mismo razonamiento aplicado en la sección 4.5.a. párrafo 2, para producir 35 mg de cobre necesito 123,5 mg de  $\text{Fe}^{+3}$  que producirían  $1,4 \cdot 10^{11}$  células, pero el sistema fue inoculado sólo con  $2,2 \cdot 10^8$  cel/ml. Por lo tanto, la disolución del cobre viene dado por el  $\text{Fe}^{+3}$  y por la oxidación del azufre sobre la superficie por parte de los microorganismos.

Esta información muestra que el principal mecanismo de acción de los microorganismos es: (1) llevar el  $\text{Fe}^{+2}$  en solución a  $\text{Fe}^{+3}$ , (2) oxidar el azufre producido por la lixiviación férrica o bien oxidar los compuestos de azufre intermedios producidos ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ). Esto indica que el mecanismo de disolución de la calcopirita en presencia de 1 g/l  $\text{Fe}^{+3}$  es principalmente química y que los microorganismos toman el azufre producido durante este proceso como fuente de energía. En cambio en los casos abióticos el mecanismo de disolución de la calcopirita viene dado por la presencia de oxígeno y el hierro presente en la solución como ferroso (Eh bajo).

#### **4.6 CONCLUSIONES DEL CAPITULO:**

##### **a. Casos sin hierro inicial en la solución:**

1. La máxima recuperación de cobre se obtiene cuando parte los microorganismos son capaces de adherirse a la superficie de la calcopirita seguido por el caso abiótico aireado y finalmente el caso abiótico anaeróbico (donde casi no se produce disolución)
2. Se determinó que es necesaria la adherencia de una parte de la población de microorganismos a la superficie del mineral para aumentar la velocidad de lixiviación de la calcopirita y para mantener la población de microorganismos.

3. El mecanismo de acción de los *S. metallicus* sobre calcopirita es el siguiente: una parte de los microorganismos que se han adherido a la calcopirita producen un compuesto intermedio que es el tiosulfato que los microorganismos que quedan libres en la solución toman y oxidan a sulfito y bisulfito que finalmente pasa a sulfato. Además, se produce la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  por los microorganismos en la solución.
4. Se detectó que existe un efecto importante en la liberación de cobre y hierro total desde el mineral debido a la presencia del  $\text{O}_2$ .

b. Casos con 1 g/l  $\text{Fe}^{+3}$  inicial en la solución

5. La máxima recuperación de cobre se obtiene en el caso abiótico aireado seguido por los casos inoculados (donde la recuperación es similar) y finalmente el caso abiótico anaeróbico.
6. El mecanismo de disolución de la calcopirita es principalmente química. En los casos inoculados, los microorganismos toman el azufre o algún compuesto intermedio de azufre producido durante el proceso férrico de disolución como fuente de energía y además regenera el  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ . En cambio en los casos abióticos el mecanismo de disolución de la calcopirita viene dado por la reducción catódica del oxígeno sobre la superficie del mineral y el hierro presente en la solución como ferroso (Eh bajo).

## **CAPITULO 5:**

### **EFFECTO DEL OXÍGENO EN LA DISOLUCIÓN DE LA CALCOPIRITA A 60°C**

Gómez et al. (1996) estudiaron la respuesta de un electrodo de calcopirita a dos distintas temperaturas 25° y 68° C a pH 2, donde se observó que a ambas temperaturas durante la disolución anódica de la calcopirita, se forma un film pasivo sobre la superficie que restringe las reacciones de oxidación en el medio por un control difusional del film. Las diferencias observadas a 25 y 68 °C son diferencias en la estructura física de los films complejos de sulfuros, poli-sulfuros y azufre elemental, que son formados electroquímicamente. En este capítulo se busca determinar: (1) la naturaleza de estos films, (2) el efecto que produce la temperatura y (3) el efecto de la presencia de oxígeno en el sistema en la disolución de la calcopirita.

#### **5.1 CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE LA CALCOPIRITA:**

En esta sección se estudió los cambios superficiales que se producen sobre calcopirita sintética a 25°C 65°C en presencia de O<sub>2</sub> y de N<sub>2</sub>. Para esto, se realizaron voltametrías cíclicas entre -0.1 y 1 V/EHE a 5 mV/s en 4 condiciones:

- A 25°C y N<sub>2</sub>
- A 25°C y O<sub>2</sub>
- A 65°C y N<sub>2</sub>
- A 65°C y O<sub>2</sub>

En la figura 5.1 se observa que las curvas a 25°C presentan un pico a +0.3 V/EHE debido a la transformación superficial de la calcopirita en sulfuro secundario como Cu<sub>2</sub>S (Hiroyoshi 2007) este pico también es posible observarlo con nitrógeno ya que el sistema no esta totalmente sellado. Al aumentar la temperatura se observa que ya no se observa el pico a +0.3 V y además las corrientes se vuelven más irreversibles, es más, en presencia de O<sub>2</sub> el sistema es más irreversible que en un ambiente con N<sub>2</sub> a 65°C.

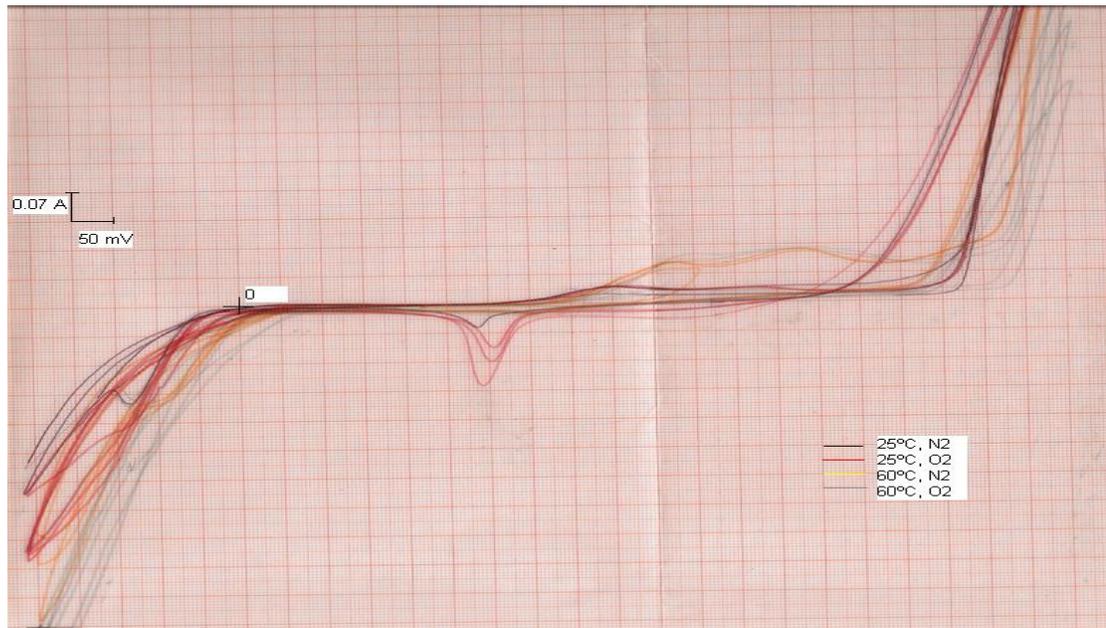


Figura 5.1: voltametrías cíclicas (a) N<sub>2</sub>, 25°C, (b) O<sub>2</sub>, 25°C, (c) N<sub>2</sub>, 65°C, (d) O<sub>2</sub>, 65° C

Con la información anterior, se realizaron 16 experiencias para determinar los cambios superficiales que sufre la calcopirita al variar el potencial al que es sometida a través de XPS. El montaje experimental de la celda consta de un porta-muestra de titanio en posición horizontal en que se adhiere una muestra de calcopirita sintética masiva, sobre la muestra de calcopirita se deposita una gota de medio nutriente y se conecta el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el contra electrodo (Pt) a través de la gota de medio nutriente. Para calentar la muestra de utilizó luz y una lupa. Ver figura 2.3.

Antes de cada medición se limpio la superficie de la calcopirita electroquímicamente, se aplicaron 10 ciclos entre 1 y 0.5 V para remover todo lo que pudiera estar absorbido sobre la superficie.

1. N<sub>2</sub>, 25°C, 1V/EHE, 20 min.
2. N<sub>2</sub>, 25°C, 0.6V/EHE, 20 min.
3. N<sub>2</sub>, 25°C, 0.3V/EHE, 20 min.
4. N<sub>2</sub>, 25°C, 0 V/EHE, 20 min.
5. O<sub>2</sub>, 60°C, 1V/EHE, 20 min.

6. O<sub>2</sub>, 60°C, 0.6V/EHE, 20 min.
7. O<sub>2</sub>, 60°C, 0.3V/EHE, 20 min.
8. O<sub>2</sub>, 60°C, 0 V/EHE, 20 min.
9. N<sub>2</sub>, 60°C, 1V/EHE, 20 min.
10. N<sub>2</sub>, 60°C, 0.6V/EHE, 20 min.
11. N<sub>2</sub>, 60°C, 0.3V/EHE, 20 min.
12. N<sub>2</sub>, 60°C, 0 V/EHE, 20 min.
13. N<sub>2</sub>, 60°C, 1 hora (sin aplicar potencial)
14. O<sub>2</sub>, 60°C, 1 hora (sin aplicar potencial)

Una vez terminada la experiencia la muestra fue conducida a la cámara de XPS sin tener contacto con el aire (ver esquema 2.3) para el análisis de la superficie. En las figuras 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5 se presentan el barrido general de la superficie de las muestras en las distintas condiciones, donde se observa principalmente cobre, hierro, azufre, carbón y oxígeno (los otros picos que no aparecen identificados corresponden a compuestos provenientes de las sales del medio nutriente, que no tienen ningún efecto en la disolución de la calcopirita). En las figuras 5.6, 5.7 y 5.8 se presentan los estados de oxidación del cobre, hierro y azufre respectivamente.

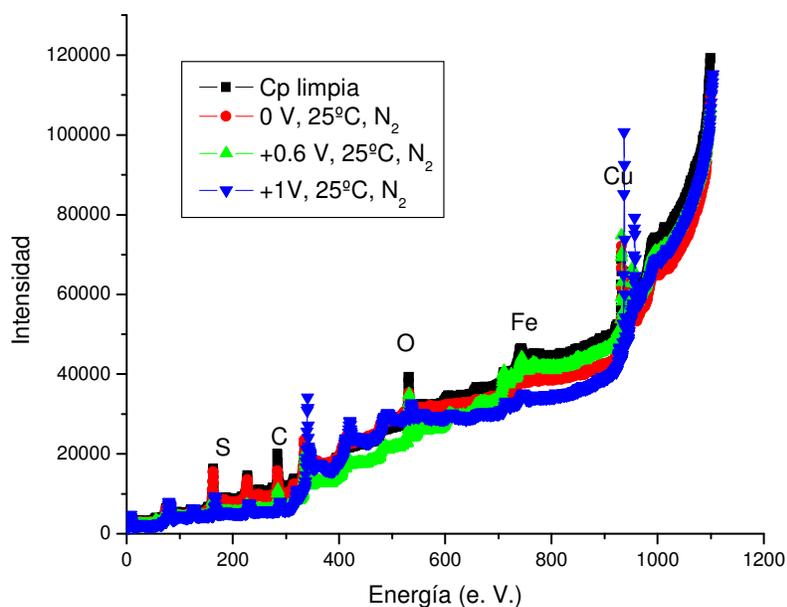


Figura 5.2: barrido superficial de la calcopirita a 25°C y N<sub>2</sub>: (a) limpieza electroquímica, (b) 0 V, (c) 0.6 V y (d) 1V/EHE

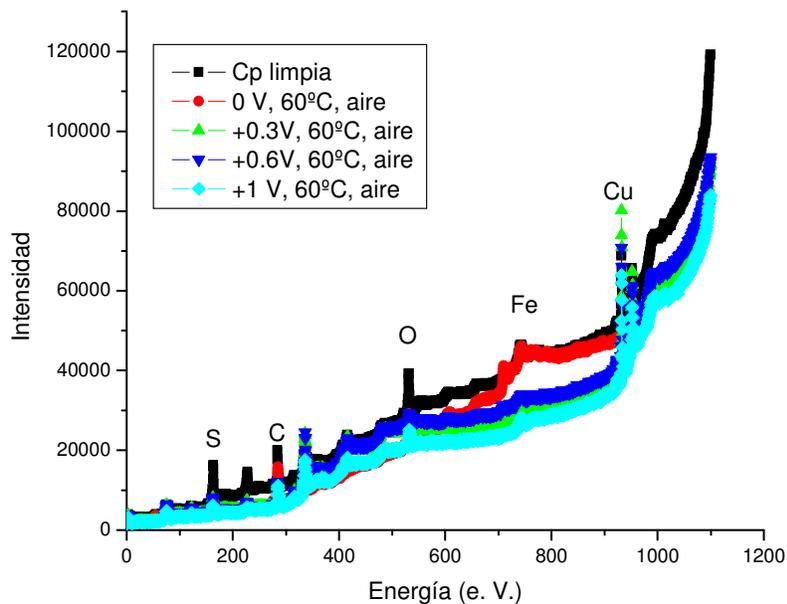


Figura 5.3: barrido superficial de la calcopirita a 60°C y O<sub>2</sub>: (a) limpieza electroquímica, (b) 0 V, (c) 0.3 V, (d) 0.6 V y (e) 0 V/EHE

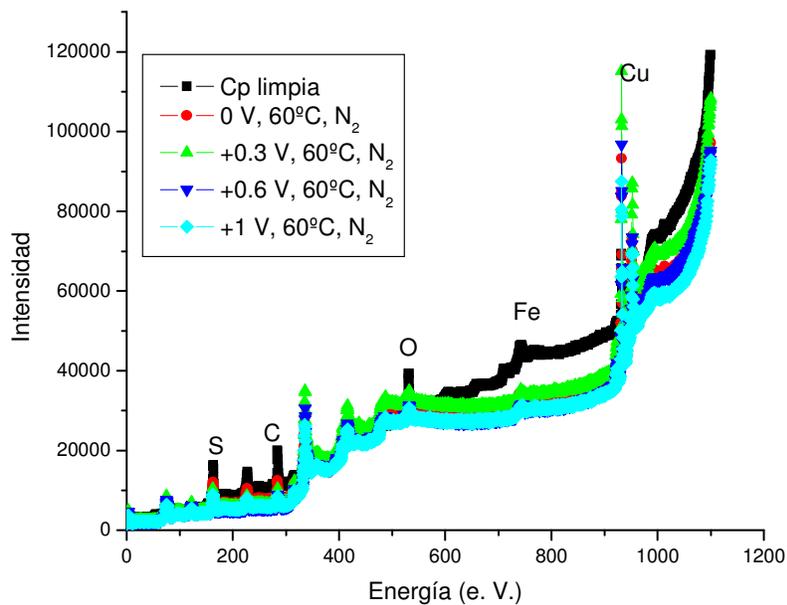


Figura 5.4: barrido superficial de la calcopirita a 60°C y N<sub>2</sub>: (a) limpieza electroquímica, (b) 0 V, (c) 0.3 V, (d) 0.6 V y (e) 0 V/EHE

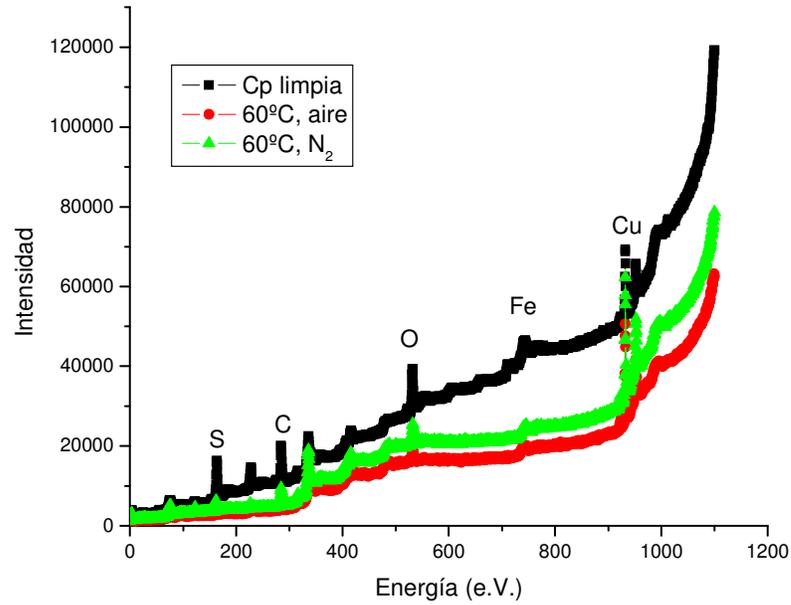
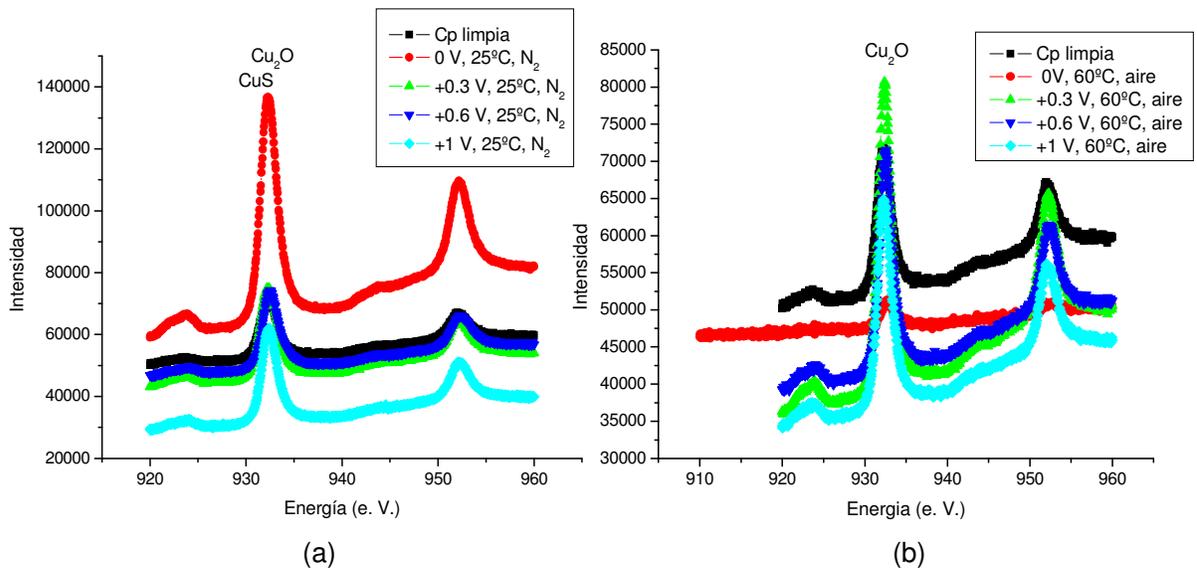


Figura 5.5: barrido superficial de la calcopirita: (a) limpieza electroquímica, (b) 60°C y O<sub>2</sub>, (c) 60°C y N<sub>2</sub>.

5.1.1 Análisis de los estados de oxidación del cobre en cada una de las muestras.



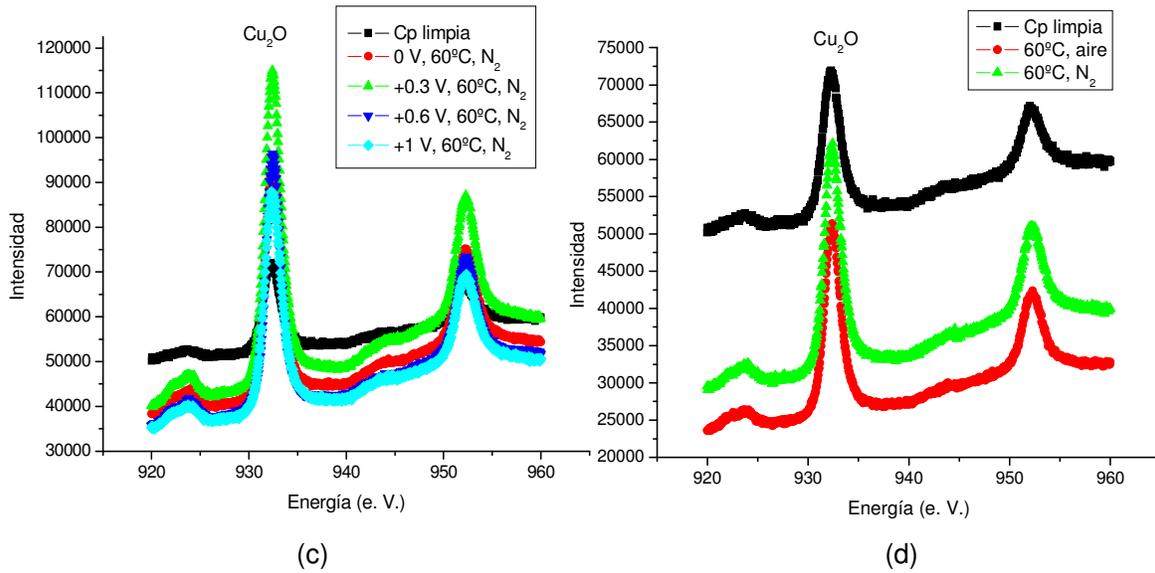
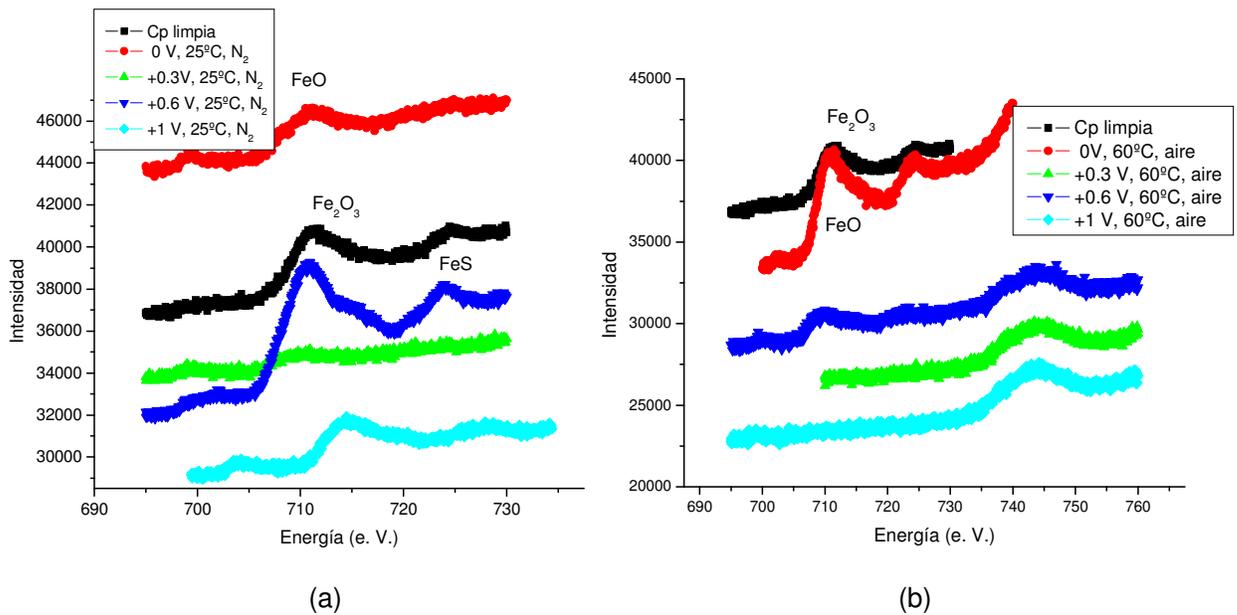
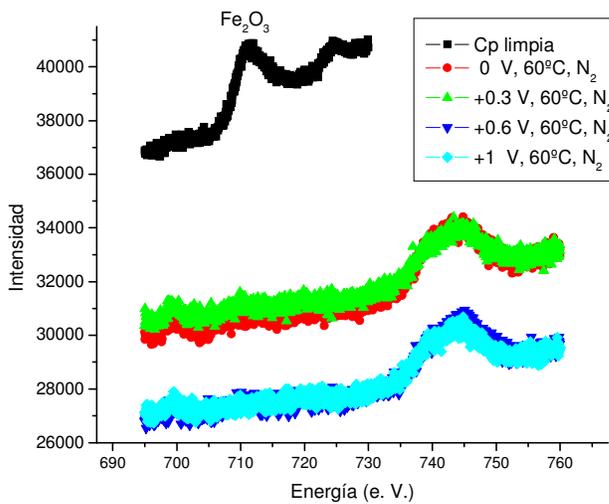


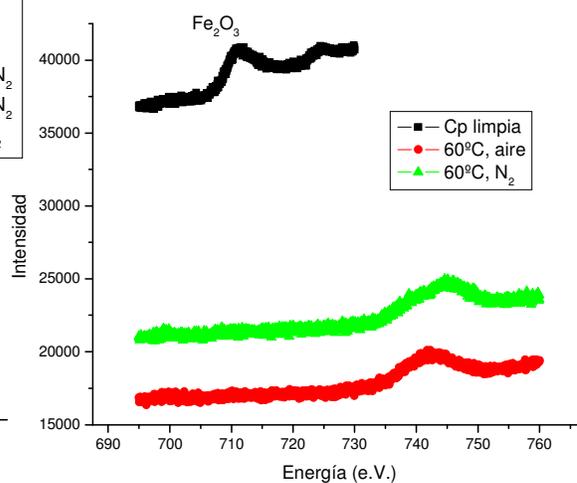
Figura 5.6: espectro del cobre en las distintas condiciones experimentales: (a) 25°C y N<sub>2</sub>, (b) 60°C y O<sub>2</sub>, (c) 60°C y N<sub>2</sub>, (d) 60°C sin aplicar potencial externo.

### 5.1.2 Análisis de los estados de oxidación del hierro en cada una de las muestras.





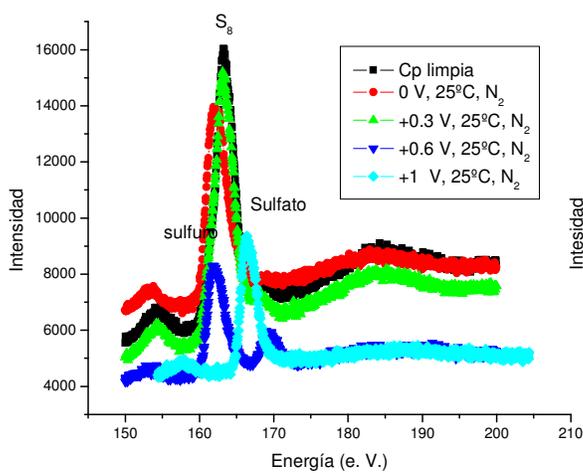
(c)



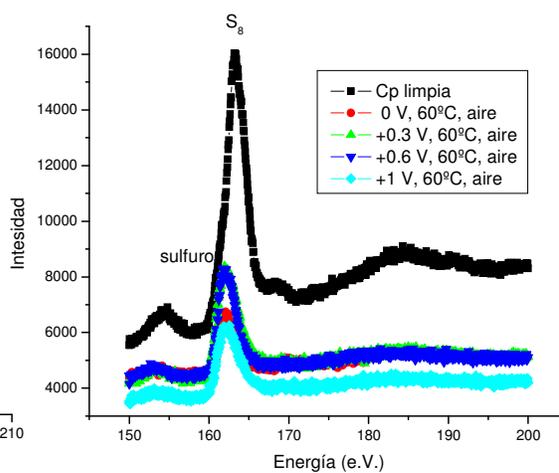
(d)

Figura 5.7: espectro del hierro en las distintas condiciones experimentales: (a) 25°C y N<sub>2</sub>, (b) 60°C y O<sub>2</sub>, (c) 60°C y N<sub>2</sub>, (d) 60°C sin aplicar potencial externo.

### 5.1.3 Análisis de los estados de oxidación del azufre en cada una de las muestras.



(a)



(b)

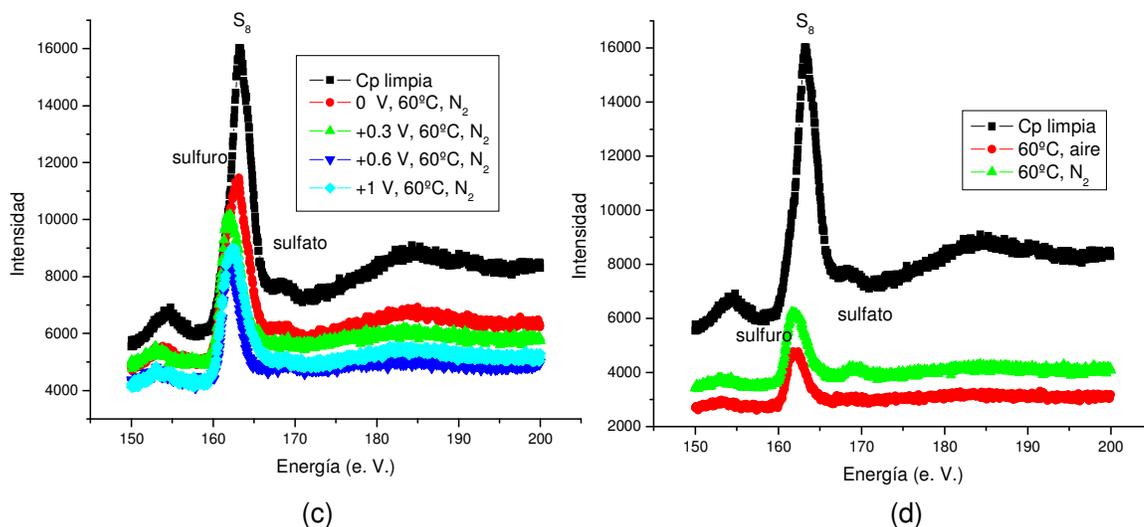


Figura 5.8: espectro del azufre en las distintas condiciones experimentales: (a) 25°C y N<sub>2</sub>, (b) 60°C y O<sub>2</sub>, (c) 60°C y N<sub>2</sub>, (d) 60°C sin aplicar potencial externo.

## 5.2 DISCUSIONES DEL CAPÍTULO:

En la figura 5.6 se observa la formación de CuS a potenciales menores que 0.3 V/EHE sobre la superficie a temperatura ambiente (25°C), además de la formación de Cu<sub>2</sub>O. Al aumentar la temperatura no se observa ningún cambio en el estado de oxidación del cobre (siempre se presenta como Cu<sub>2</sub>O), lo que sugiere que a alta temperatura el cobre sale directamente hacia la solución sin pasar por algún compuesto intermedio (como por ejemplo CuS). Por otro lado, a 60°C (en presencia de N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>) a 0.3 V se detecta la mayor concentración de cobre superficial; en los casos en que no se aplicó potencial la cantidad de cobre en ambos casos es similar, pero mayor a la muestra limpia.

En la figura 5.7 se observa a 25°C FeO sobre la superficie en todos los casos (además, en el caso a 0.6 V se detectó además FeS). Al aumentar la temperatura a 60°C no se detecta hierro sobre la superficie en ningún caso (aplicando potencial y no haciéndolo) salvo el caso a 0 V/EHE en presencia de O<sub>2</sub>. Esto indicaría que el hierro pasa a la solución directamente a alta temperatura (similarmemente al caso del cobre).

En la figura 5.8 se detecta a 25°C y N<sub>2</sub> sulfuro, sulfato a 0.6 V y S<sub>8</sub> a 0.3 V que va disminuyendo al ir aumentando el potencial aplicado. A 60°C en presencia de aire se determinó principalmente sulfuro sobre la superficie, pero en ambiente anaeróbico se detecta además sulfato y S<sup>8</sup> sobre la superficie a distintos potenciales. En el caso de las muestras donde no se aplica potencial en presencia de aire se detecta sulfuro y el caso en presencia de N<sub>2</sub> se detectó además del sulfuro, sulfato (seguramente es proveniente de las sales que contiene el medio nutriente).

En el anexo D se presentan los espectros del carbón y del oxígeno. En el caso del carbón se observa carbón elemental y carbón unido al azufre superficial (C-S) en los casos a 25 y 60°C en que se aplicaron los distintos potenciales, en los casos en que no se aplicó el potencial, en un ambiente anaeróbico no se detecta carbón sobre la superficie, en cambio, en presencia de aire se detecta carbón elemental y carbón unido al azufre (C-S). En el caso del oxígeno se determinó la presencia de hidróxidos y fosfatos al aplicar los potenciales en las distintas condiciones experimentales. En los casos donde no se aplicó potencial sólo se detecta fosfato sobre la superficie.

En resumen, se observó que a 60°C las especies de azufre y a 25°C los sulfuros de cobre limitan la cinética de disolución interfacial y que la oxidación producida por el oxígeno en la formación del sulfato dependen de la temperatura.

Por un lado, a 25°C el producto de solubilidad del CuS es muy bajo, debido a una banda de valencia derivado de la mezcla de estados S3p/Cu3d que limita cinéticamente la oxidación. Es por esto que el hoyo en el estado Cu3d no rompe el enlace químico sino que aumenta el estado de oxidación de las especies de cobre.

A 60°C la limitación en la disolución de la calcopirita sintética viene dada por la presencia de distintos estados del azufre en la superficie, ya que en el caso anaeróbico se detecta sulfato, sulfuro y S<sup>8</sup>, donde la disolución de la calcopirita es más lenta, y en el caso aeróbico hay sólo sulfuro, es decir la presencia de oxígeno oxida el film de azufre formado sobre la superficie pasándolo a sulfato en solución favoreciendo así, la disolución de la calcopirita ya que dejaría limpia la superficie para una posterior disolución del mineral.

Esta información parece indicar que en la biolixiviación de calcopirita a 70°C se debe a un efecto conjunto del oxígeno y de los *S. metallicus* ya que ambos tienen la capacidad de oxidar azufre, elemento que resulta ser limitante en la disolución de este mineral en sistemas sin hierro inicial en solución.

### **5.3 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO:**

- A temperatura ambiente y en presencia de oxígeno la disolución de la calcopirita se produce a través de una etapa intermedia formándose CuS sobre la superficie a bajos potenciales, este sulfuro de cobre limita la cinética de disolución de la calcopirita. Al aumentar la temperatura se observa que el cobre en la calcopirita pasa directamente a la solución.
- En el caso del hierro no se observa este elemento sobre la superficie a alta temperatura, lo que sugiere que el hierro también pasa directamente desde la estructura de la calcopirita a la solución.
- A 60°C se observa sulfuro, S<sup>0</sup> y sulfato en los casos anaeróbicos y principalmente sulfuro en el caso aeróbico, además la cantidad de azufre sobre el mineral en el caso anaeróbico es mayor, esto parece indicar que en ausencia de oxígeno se forma un film de azufre sobre la calcopirita limita la disolución del mineral. Cuando el oxígeno está presente en el sistema, éste oxida los compuestos de azufre formados sobre la calcopirita dejando limpia la superficie para su posterior disolución.
- La biolixiviación de calcopirita a 70°C se debe a un efecto conjunto del oxígeno y de los *S. metallicus* ya que ambos tienen la capacidad de oxidar azufre, elemento que resulta ser limitante en la disolución de este mineral a través de la formación de una capa pasiva de azufre en sistemas sin hierro inicial en solución.

## **CAPITULO 6:**

### **DISCUSIONES Y CONCLUSIONES**

#### **6.1 DISCUSIONES**

A partir de las imágenes SEM de la superficie de la calcopirita molida (sintética y natural) se pudo determinar que la adherencia se produce de manera heterogénea sobre la calcopirita, principalmente sobre las grietas formadas sobre la superficie del mineral, que en principio correspondería solamente a sitios más protegidos del movimiento de la solución, donde se forman zonas estancas. Por otro lado, la adherencia de las células influye en la lixiviación del mineral ya que al comparar los análisis de EDS se observa que sobre la superficie en que se adhieren los microorganismos (muestra molida) existe una mayor oxidación de azufre que en el caso de la muestra pulida en contacto con las células.

Se complementaron estos resultados con estudios de cambios superficiales en el mineral a través de mediciones de perfilometría y pre-lixiviando la superficie de la calcopirita con  $Fe^{+3}$ . Estos resultados indicaron que la biolixiviación de la calcopirita (sintética) se produce de manera homogénea sobre la superficie aunque los microorganismos no se observen sobre a la superficie, ya que se producen profundos cambios en la topografía de la superficie del mineral. El prelixiviar la superficie de la calcopirita con  $Fe^{+3}$  llevó a tener un aumento en la población adherida a la superficie.

Aparentemente, es posible introducir cambios superficiales, pre-lixiviando la superficie con  $Fe^{+3}$ , que favorezcan la adherencia de los *S. metallicus* sobre la superficie en las zonas planas donde sin pretratar no se observan microorganismos. Esto puede deberse a tres posibles cambios superficiales: (1) debido a la precipitación de las jarositas como cambios topográficos, (2) cambios en la carga superficial de la calcopirita con este pre-tratamiento que facilita la adsorción de la células al mineral o bien (3) a la generación de una capa delgada de azufre en las zonas planas aunque a través de EDS esto no pudo ser comprobado.

Por otro lado, sobre la calcopirita natural fue posible observar que las recuperaciones de cobre, hierro y sulfato son similares aunque la concentración del inóculo fue distinta. Esto indicaría que un aumento de la población en la solución y sobre el mineral no resulta en mejores recuperaciones de cobre.

A partir de las observaciones realizadas a través de la microscopía electrónica y al comparar los resultados obtenidos sobre la calcopirita sintética y natural se determinó que la velocidad de oxidación del azufre sobre la superficie del mineral sintético es mayor cuando se observa una población adherida de microorganismos y el caso en que se utilizó calcopirita natural donde un aumento en la adherencia de los microorganismos no lleva a obtener una mayor oxidación de azufre a sulfato indicaría que una mayor adherencia no afecta la disolución de la calcopirita natural. La aparente diferencia entre ambos resultados podría deberse a que es necesaria una adherencia mínima por parte de los microorganismos a la superficie de la calcopirita que producen compuestos intermedios de azufre que la población planctónica lleva hasta sulfato.

Para determinar el mecanismo de acción de los *Sulfolobus metallicus* sobre calcopirita en ausencia de hierro inicial, se realizaron experiencias donde se comparó el crecimiento de los microorganismos adheridos a la superficie de la calcopirita con el crecimiento de la población planctónica. Se determinó que el crecimiento de la población planctónica físicamente separada del mineral no se puede deber sólo a la oxidación del  $\text{Fe}^{+3}$  producido en la disolución de la calcopirita sino que se determinó a través de HPLC que los compuestos de azufre detectados en el proceso de biolixiviación permiten la viabilidad de la población de microorganismos y que se observa que la mayor concentración de estos compuestos en presencia de los microorganismos ya que ellos aceleran el proceso. La formación de  $(\text{SO}_4)^{2-}$  y  $(\text{HSO}_4)^-$  es alrededor de 4 veces más rápido que el caso aeróbico-abiótico. Por otro lado, la formación de  $(\text{HSO}_3)^-$  es 8 veces más rápido que el caso abiótico. Además, en el caso inoculado se observa esporádicamente  $(\text{S}_2\text{O}_3)^{2-}$ .

Se calculó los moles de cobre, hierro y azufre liberados en estos tres experimentos y se verificó que para los casos abióticos en presencia de aire y de nitrógeno la razón

molar Cu:Fe:S es aproximadamente 1:1:2. En el caso inoculado con *S. metallicus* se determinó que la razón molar de Cu:Fe:S es aproximadamente 1:1:4. Esto indica una lixiviación selectiva del azufre por parte de los microorganismos, esta situación ya se había observado a través de EDS.

La información anterior indica que los microorganismos que se han adherido a la calcopirita producen un compuesto intermedio que es el tiosulfato que los microorganismos que están libres en la solución toman y oxidan a sulfito y bisulfito que finalmente pasa a sulfato. En el caso de la solución sin microorganismos en presencia de O<sub>2</sub> el azufre proveniente del mineral pasa a la solución como bisulfito que finalmente pasa a sulfato.

En el caso el mecanismo de acción de los *Sulfolobus metallicus* sobre calcopirita en presencia de 1 g/l de hierro inicial, se observó que las mejores recuperaciones de cobre se producen en los casos abióticos aireados. Una posible explicación puede ser que al mantener el Eh de la solución en un valor alrededor de 450 mV vs Ag/AgCl se favorezca una reducción catódica del oxígeno sobre la superficie y así se acelere la disolución anódica que ocurriría distribuida sobre toda la superficie de la Calcopirita. Hiroyoshi et al. (1997) reportaron un resultado similar de disolución abiótica de la calcopirita en presencia de ferroso sobre calcopiritas de distintos orígenes. Third et al. (2000) obtuvieron también que los mejores resultados de disolución de calcopirita se obtenían en presencia de ferroso y ausencia de microorganismos a 37°C, indicando que la disolución de la calcopirita es fuertemente dependiente del Eh en la solución, parámetro que tiene una influencia mucho mayor que la cantidad o la actividad de bacterias.

En los casos inoculados se determinó que en presencia de iones férricos la población planctónica es capaz de mantenerse aunque no tengan acceso directo al mineral. Por otra parte, los resultados de los compuestos intermedios de azufre muestran que no se observan grandes diferencias en los compuestos intermedios producidos entre los casos inoculados y los abióticos. Finalmente, de los análisis de DRX de los sólidos se determinó que el caso abiótico produce una gran cantidad de S<sup>0</sup> sobre la superficie, en

cambio en los casos inoculados se observa cantidad mucho menor (35% vs 4%). Una posible explicación es que los microorganismos que tienen acceso a la superficie oxiden ese azufre producido por la lixiviación férrica a un compuesto de azufre intermedio ( $S_2O_3^{2-}$ ) que los microorganismos planctónicos utilicen para crecer. En el caso en que los microorganismos se mantienen separados del mineral, lo que sucedería es que el  $S^0$  formado sobre la superficie del mineral reacciona con  $HSO_3^-$  formando  $S_2O_3^{2-}$  que utilizarían los microorganismos como fuente de energía o directamente tomen el  $S^{2-}$  de la solución.

Esta información muestra que el principal mecanismo de acción de los microorganismos es: (1) llevar el  $Fe^{+2}$  en solución a  $Fe^{+3}$ , (2) oxidar el azufre producido por la lixiviación férrica o bien oxidar los compuestos de azufre intermedios producidos ( $S_2O_3^{2-}$ ). Esto indica que el mecanismo de disolución de la calcopirita en presencia de 1 g/l  $Fe^{+3}$  es principalmente química y que los microorganismos toman compuestos de azufre producidos durante este proceso como fuente de energía. En cambio en los casos abióticos el mecanismo de disolución de la calcopirita viene dado por la presencia de oxígeno y el hierro presente en la solución como ferroso (Eh bajo).

Con el objeto de explicar el efecto que tiene el oxígeno en la disolución de la calcopirita a 70° C se realizaron un set de experiencias ya que se observó que este tiene una importante participación en la biolixiviación de la calcopirita, aproximadamente 40% de la biodisolución en ausencia de hierro inicial en la solución podría deberse sólo al efecto del oxígeno presente en el sistema. Los resultados obtenidos a través de XPS indicaron que al aumentar la temperatura a 60° C no se observa ningún cambio en el estado de oxidación del cobre (siempre se presenta como  $Cu_2O$ ), lo que sugiere que a alta temperatura el cobre sale directamente hacia la solución sin pasar por algún compuesto intermedio (como por ejemplo  $CuS$ ). Tampoco se detecta hierro sobre la superficie en ningún caso (aplicando potencial y no haciéndolo) salvo el caso a 0 V/EHE en presencia de  $O_2$ . Esto indicaría que el hierro pasa también a la solución directamente a alta temperatura.

A 60°C en presencia de aire se determinó principalmente sulfuro sobre la superficie, pero en ambiente anaeróbico se detecta además sulfato y  $S^0$  sobre la superficie a distintos potenciales. En el caso de las muestras donde no se aplica potencial en presencia de aire se detecta sulfuro y el caso en presencia de  $N_2$  se detectó además del sulfuro, sulfato (seguramente es proveniente de las sales que contiene el medio nutriente).

Esto indica que a 60°C la limitación en la disolución de la calcopirita sintética viene dada por la presencia de distintos estados del azufre en la superficie, ya que en el caso anaeróbico se detecta sulfato, sulfuro y  $S^0$ , donde la disolución de la calcopirita es más lenta, y en el caso aeróbico hay sólo sulfuro, es decir la presencia de oxígeno oxida el film de azufre formado sobre la superficie pasándolo finalmente a sulfato en solución favoreciendo así, la disolución de la calcopirita ya que dejaría limpia la superficie para una posterior disolución del mineral.

Esta información parece indicar que en la biolixiviación de calcopirita a 70°C se debe a un efecto conjunto del oxígeno y de los *S. metallicus* ya que ambos tienen la capacidad de oxidar azufre, elemento que resulta ser limitante en la disolución de este mineral en sistemas sin hierro inicial en solución.

## **6.2 CONCLUSIONES**

### **6.2.1 CASOS SIN HIERRO INICIAL EN LA SOLUCIÓN:**

La máxima recuperación de cobre se obtiene cuando parte los microorganismos son capaces de adherirse a la superficie de la calcopirita seguido por el caso abiótico aireado y finalmente el caso abiótico anaeróbico (donde casi no se produce disolución).

Se determinó que es necesaria la adherencia de una parte de la población de microorganismos a la superficie del mineral para aumentar la velocidad de lixiviación de la calcopirita y para mantener la población de microorganismos. Esta adherencia

comienza en las grietas sobre la superficie y luego ocurre de manera heterogénea sobre la superficie ya que al aumentar el tiempo de permanencia del mineral en contacto con los microorganismos se observa una mayor adherencia de las células. Análisis de EDS muestran que en presencia de los microorganismos existe una mayor oxidación de azufre.

El mecanismo de acción de los *S. metallicus* sobre calcopirita es el siguiente: una parte de los microorganismos que se han adherido a la calcopirita producen un compuesto intermedio que es el tiosulfato que los microorganismos que quedan libres en la solución toman y oxidan a sulfito y bisulfito que finalmente pasa a sulfato. Además, se produce la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  por los microorganismos en la solución.

Se detectó que existe un efecto importante en la liberación de cobre desde el mineral debido a la presencia del  $\text{O}_2$  y la temperatura ( $70^\circ\text{C}$ ), porque (1) se detectó que el cobre y el hierro pasan directamente desde la estructura de la calcopirita a la solución a alta temperatura. (2) En el caso del azufre se observó que en ausencia de oxígeno se forma un film de azufre sobre la calcopirita limita la disolución del mineral. Cuando el oxígeno está presente en el sistema, éste oxida los compuestos de azufre formados sobre la calcopirita dejando limpia la superficie para su posterior disolución.

### **6.2.2 CONCLUSIONES CASIS CON 1 g/l $\text{Fe}^{+3}$ EN LA SOLUCIÓN**

La máxima recuperación de cobre se obtiene en el caso abiótico aireado seguido por los casos inoculados (donde la recuperación es similar) y finalmente el caso abiótico anaeróbico.

El mecanismo de disolución de la calcopirita es principalmente química. En los casos inoculados, los microorganismos toman el azufre o algún compuesto intermedio de azufre producido durante el proceso férrico de disolución como fuente de energía y además regenera el  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ . En cambio en los casos abióticos el mecanismo de disolución de la calcopirita viene dado por la reducción catódica del oxígeno sobre la superficie del mineral y el hierro presente en la solución como ferroso (Eh bajo).

## **REFERENCIAS:**

Acevedo F., Gentina J., Valencia., "Optimization of pulp density and particle size in biooxidation of pyritic gold concentrate by *Sulfolobus metallicus*". World Journal of Microbiology and Biotechnology 20 (2004) 865-869.

Akcil A., Ciftci H., Deveci H., "Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyretic chalcoppyrite concentrate"., Minerals Engineering 20 (2007) 310-318.

Antonijevic M., Bogdanovic G., "Investigation of the leaching of chalcoppyritic ore in acidic solutions". Hydrometallurgy 73 (2004) 245-256.

Ballester A., Córdova E., "Hidrometalurgia de la calcopirita" En: Proceedings of the III Internacional Copper Hydrometallurgy workshop. Menacho J., Casas J. Eds. Santiago, Chile 2005.

Bengrine A., Ohmura N., Blake R., "*Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* adhere to different sites on the surface of pyrite". En: Biohydrometallurgy: Fundamental, Technology and Sustainable Development, part B, Ciminelli V. and Garcia O. eds., Elsevier, Amsterdam, (2001) 573-581.

Biegler y Swift "Anodic electrochemistry of chalcoppyrite" Journal of Applied Electrochemistry 9 (1979) 545-554.

Clark D.A., Norris P. R., "Oxidation of mineral sulphides by thermophilic microorganisms". Minerals Engineering vol. 9, No 11 (1996) 1119-1125.

Córdova E., Muñoz J., Blázquez M., González F., Ballester A., "Leaching of chalcoppyrite with ferric ion. Part IV: The role of redox potential in the presence of mesophilic and thermophilic bacteria". Hydrometallurgy 93 (2008) 106-115.

Das T., Ayyappan S., Chaudhury G. R., "Factors affecting bioleaching kinetics of sulfide ores using acidophilic micro-organisms". BioMetals 12 (1999) 1-10.

Deveci H., "Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors". Hydrometallurgy 71 (2004) 385-396.

d'Hugues P., Foucher S., Gallé-Cavalloni P., Morin D., "Continuous bioleaching of chalcoppyrite using a novel extremely thermophilic mixed culture". International Journal of Mineral Processing 66 (2002) 107-119.

Durtizac j., "The dissolution of chalcopyrite in ferric sulphate and ferric chloride media". Metall. Trans B 12 (1981), 371-378.

Durtizac j., "Ferric ion leaching of chalcopyrites from different localities". Metall. Trans B 13 (1982), 303-309.

Edwards K., Hu B., Hamers R., Banfield J., "A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals". FEMS Microbiology Ecology 34 (2001) 197-206.

Escobar B., Hevia M., Vargas T. S., "Evaluating the growth of free and attached cells during the bioleaching of chalcopyrite with *Sulfolobus metallicus*". En: Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'03. Tsezos M., Remoudaki E. and Hatzikioseyan A. eds., Elsevier, Amsterdam,(2003)120-128 .

Espejo R., Romero P., "Growth of *Thobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur". Applied and Environmental Microbiology 53 (8) (1987) 1907-1912.

Falco L., Pogliani C., Curutchet G., Donati E., "A comparison of bioleaching using pure cultures of *Acidothiobacillus ferrooxidans* and *Acidothiobacillus thiooxidans* or a mixed cultures of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidobacillus thiooxidans*". Hydrometallurgy 71 (2003) 31-36.

Farquhar M., Wincott P., Wogelius R., Vaughan D., "Electrochemical oxidation of the chalcopyrite surface: an XPS and AFM study in solution at pH 4". Applied Surface Science 218 (2003), 34-43.

Ferreira R., Burkin A., "Acid leaching of chalcopyrite". Hydrometallurgy , IMM, London (1975) 54-66.

Gajardo J., "Estudio electroquímico de la lixiviación de calcopirita en soluciones de sulfato férrico". Tesis para optar al título de ingeniero civil químico. Universidad de Chile (1993).

Gómez C., Figueroa M., Muñoz J., Blázquez M., Ballester A., "Electrochemistry of chalcopyrite". Hydrometallurgy 43(1996) 331-344.

Gómez E., Blázquez M. L., Ballester A., González F., "Study by SEM and EDS of chalcopyrite bioleaching using a new thermophilic bacteria". Minerals Engineering 9 (9) (1996) 985-999.

Gómez E., Ballester A., González F., Blázquez M. L., "Leaching capacity of a new extremely thermophilic microorganism, *Sulfolobus rivotincti*". Hydrometallurgy 52 (1999) 349-366.

Hirato T., Majima H., Awakura Y., "The leaching of chalcopyrite with ferric sulfate". Metall Trans B18 (1987) 489-496.

Hiro Yoshi N., Hirota M., Hirajima T., Tsunekawa M., "A case of ferrous sulfate addition enhancing chalcopyrite leaching". Hydrometallurgy 47 (1997) 37-45.

Hiro Yoshi N., Kuroiwa S., Miki H., Tsunekawa M., Hirajima T., "Effects coexisting metal ions on the redox potentials dependence of chalcopyrite leaching in sulfuric acid solutions". Hydrometallurgy 87 (2007) 1-10.

Hiro Yoshi N., Kuroiwa S., Miki H., Tsunekawa M., Hirajima T., "Synergistic effect of cupric and ferrous ions on active-passive behavior in anodic dissolution of chalcopyrite in sulfuric acid solutions". Hydrometallurgy 74 (2004) 103-116.

Jordan H., Sanhueza A., Gautier V., Escobar B., Vargas T., "Electrochemical study of the catalytic influence of *Sulfolobus metallicus* on bioleaching of chalcopyrite at 70°C". En: Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'05. Harrison S., Rawlings D., Petersen J. eds., Elsevier, Amsterdam, (2005) 11-18.

Kinnunen P., Puhakka A., "Chloride-promoted leaching of chalcopyrite concentrate by biologically-produced ferric ion." Journal of Chemical Technology and Biotechnology (2004) 79, 830-834.

Kinzler K., Gehrke T., Telegdi J., Sand W., "Bioleaching-a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS)". Hydrometallurgy 71 (2003) 83-88.

Klauber C., Parker A., van Bronswijk W., Watling H., "Sulfur speciation of leached chalcopyrite surfaces as determined by X-ray photoelectron spectroscopy." International Journal of Mineral Processing 62 (2001) 65-94.

Klauber C., "A critical review of the surface chemistry of acidic ferric sulphate dissolution of chalcopyrite with regards to hindered dissolution". International Journal of Mineral Processing 86 (2008) 1-17.

Konishi Y., Tokushige M., Asai S., "Bioleaching of chalcopyrite concentrate by acidophilic thermophilic *Acidanus brierleyi*". En: Conference Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99. Ballester A. and Amils R. eds., Elsevier, Amsterdam (1999) 367-376.

Lazaro y Nicol "A rotating ring-disk study of the initial stages of the anodic dissolution of chalcopyrite in acidic solutions". Journal of Applied Electrochemistry 36 (2006) 425-431.

Levenspiel O., "Ingeniería de las reacciones químicas". Ed. Reverté (2000).

López-Juárez A., Gutiérrez- Arenas N., Rivera-Santillán R., "Electrochemical behavior of massive chalcopyrite bioleached electrodes in presence of silver a 35°C" *Hydrometallurgy* 83 (2006) 63-68.

Mikkelsen D., Kappler U., Webb, R., Rasch R., McEwan A., Sly L. "Visualization of pyrite leaching by selected thermophilic archea: nature of microorganism-ore interactions during bioleaching" *Hydrometallurgy* 88 (2007) 143-153.

Muñoz J. A., Gómez C., Ballester A., Blázquez M. L., González F., Figueroa M., "Electrochemical behaviour of chalcopyrite in the presence of silver and *Sulfolobus* bacteria". *Journal of Applied Electrochemistry* 28 (1) (1998) 49-56.

Muñoz J. A., Ballester A., Blázquez M. L., González F., Gómez C., "Studies on the anodic dissolution of chalcopyrite at constant potential: effect of new thermophilic microorganism". *Proceedings of the COPPER 95-COBRE 95 international conference- Vol III* (1995) 409-420.

Nemati M., Lowenadler J., Harrison S. T. L., "Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Sulfolobus Metallicus (BC)*". *Applied Microbiology Biotechnology* 53 (2000) 173-179.

Ndlovu S., Monhemius A., "The influence of crystal orientation on the bacterial dissolution of pyrite". En: *Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS`03*. Tsezos M., Remoudaki E. and Hatzikioseyan A. eds., Elsevier, Amsterdam, (2003) 42- 51.

Parker A., Klauber C., Kougianos A., Watling H. R., van Bronswijk W., "An X-ray photoelectron spectroscopy study of the mechanism of oxidative dissolution of chalcopyrite". *Hydrometallurgy* 71 (2003) 265-276.

Patino E., Sandoval R., Frenay J., "Kinetics of sulfur oxidation : pH and temperatura influence on bioleaching". En: *Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS`03*. Tsezos M., Remoudaki E. and Hatzikioseyan A. eds., Elsevier, Amsterdam, (2003) 30-35.

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

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

Rodríguez Y., Ballester A., Blázquez M. L., González F., Muñoz J. A., “New information on sphalerite bioleaching mechanism at low and high temperature”. *Hydrometallurgy* 71 (2003) 57-66.

Rodríguez Y., Ballester A., Blázquez M. L., González F., Muñoz J. A., “New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature”. *Hydrometallurgy* 71 (2003) 47-56.

Rodríguez Y., Ballester A., Blázquez M. L., González F., Muñoz J. A., “Basic studies on bioleaching of chalcopyrite, sphalerite and pyrite”. En: *Biohydrometallurgy: Fundamental, Technology and Sustainable Development*, Ciminelli V. and Garcia O. eds., Elsevier, Amsterdam, part A (2001) 125-138.

Rodríguez Y., Ballester A., Blázquez M. L., González F., Muñoz J. A., “Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite, and sphalerite”. *Geomicrobiology Journal*, 20 (2003) 131-141.

Rojas-Chapana J., Tributsch H., “Interfacial activity and leaching patterns of *Leptospirillum ferrooxidans* on pyrite”. *FEMS Microbiology Ecology* 1582 (2003) 1-11.

Sampson M. I., Van der Merwe J. W., Harvey T. J., Bath M. D., “Testing the ability of a low grade sphalerite concentrate to achieve autothermality during biooxidation heap leaching”. *Minerals Engineering* (2004) on line.

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

Sandström A., Shchukarev A., Paul J., “XPS characterization of chalcopyrite chemically and bio-leached at high and low redox potential”. *Minerals Engineering* 18 (2005) 505-515.

Sanhueza A., Ferrer I. J., Vargas T., Amils R., Sánchez C., “Attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite of varying structural and electronic properties”. *Hydrometallurgy* 51 (1999) 115-129.

Shrihari, Bhavaraju S., Modak J., Kumar R., Gandhi K., “Dissolution of sulfur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells”. *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1993) 612-616.

Stott M. B., Sutton D. C., Watling H. R., Franzmann P. D., "Comparative leaching of chalcopyrite by selected acidophilic bacteria and archaea". *Geomicrobiology Journal*, 20 (2003) 215-230.

Stott M. B., Watling H. R., Franzmann P. D., Sutton D. C., "The effect of solution chemistry on jarosite deposition during the leaching of chalcopyrite by the thermophilic archaeon, *Sulfolobus metallicus*". En: *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development*, part A, Ciminelli V. and Garcia O. eds., Elsevier, Amsterdam, (2001) 207-215.

Third K., Cord-Ruwisch R., Watling H., "The role of iron-oxidizing bacteria in stimulation or inhibition of chalcopyrite bioleaching". *Hydrometallurgy* 57 (2000) 225-233.

Tributsch H., "Direct versus indirect bioleaching". En: *Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99*. Ballester A. and Amils R. eds., Elsevier, Amsterdam, 51-60.

Vargas T., Sanhueza A., Escobar B., "Studies on the electrochemical mechanism of bacterial catalysis in pyrite dissolution". En: *Biohydrometallurgical Technologies*. Torma A., Wey J. and Lakshmanan V. eds., The Minerals, Metals & Materials Society, (1993) 579-588.

Vilcáez J., Suto K., Inoue C., "Response of thermophiles to the simultaneous addition of sulfur and ferric ion to enhance the bioleaching of chalcopyrite". *Minerals engineering* 21 (2008) 1063-1074.

Vilinska A., Hanumantha Rao K., Forssberg K., "Selective coagulation in chalcopyrite/pyrite system using *Acidithiobacillus* group bacteria". *Advanced Material Research*. Vols 20-21 (2007) 366-370.

Viramontes-Gamboa G., Rivera-Vasquez B., Dixon D., "The active passive behavior of chalcopyrite, comparative study between electrochemical and leaching responses", *Journal of the electrochemical society* 154(2007) 299-311.

Watling H., "The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — A review". *Hydrometallurgy* 84 (2006) 81-108.

Yahya A., Johnson D., "Bioleaching of pyrite at low pH and low redox potentials by novel mesophilic Gram-positive bacteria". *Hydrometallurgy* 63 (2002) 181-188.

Yin Q., Kelsall G., Vaughan D., England K., "Atmospheric and electrochemical oxidation of the surface of chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ) "., *Geochimica et cosmochimica acta* 59 (1995) 1091-1100.

Zurmaev E., Van Ek J., Edered E., Zhou L., Callcott T., Perera C., Cherkashenko V., Shamin S., Trofimova V., Bartkowski S., Neumann N., Fujimori A., Moloshag V., "Experimental and theoretical investigation of electronic structure of transition metal sulfides:  $\text{CuS}$ ,  $\text{FeS}_2$ ,  $\text{FeCuS}_2$ ." *J. phys.: condens. Matter* 10 (1998) 1687-1697.

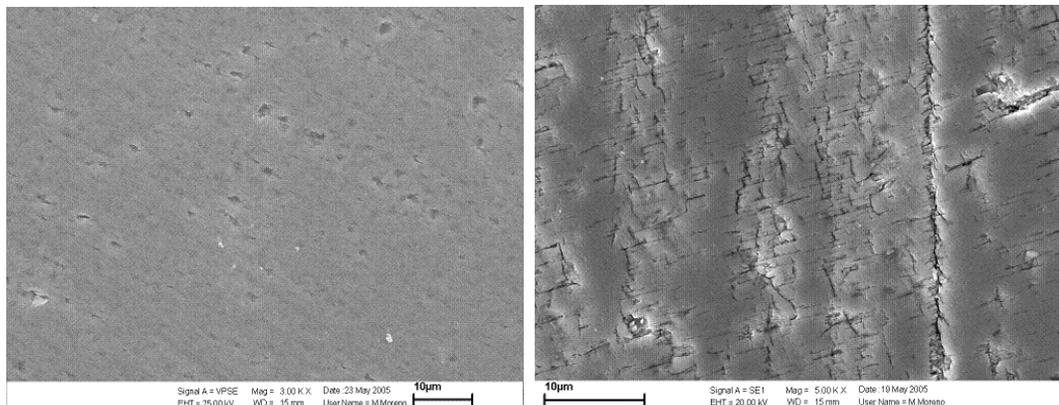
## **ANEXO A:**

### **ADHERENCIA DE *Sulfolobus metallicus* A PIRITA NATURAL:**

#### ***Pirita masiva:***

Se realizó experimentos comparativos con pirita ya que la mayor parte de la información disponible en la literatura sobre estos microorganismos es sobre este mineral y además, para observar diferencias en los patrones de adherencia de la calcopirita.

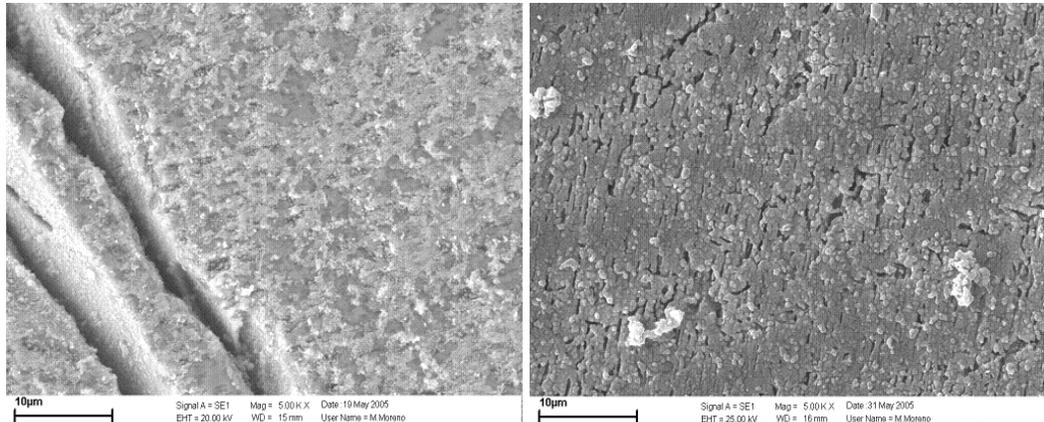
Se contactó pirita (superficie lisa) con *Sulfolobus metallicus* ( $1 \cdot 10^8$  bacterias/ml) durante 7, 14 y 21 días. Las imágenes SEM, Figuras A.1 y A.2 muestran pocas colonias microorganismos adheridas a ciertas zonas atacadas sobre la superficie. Además, se colocó otra muestra de pirita en medio Norris abiótico en donde se observa que la superficie del se vuelve más rugosa y presenta grietas de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de largo.



(a)

(b)

Figura A.1: (a) superficie pirita pulida, (b) pirita en medio Norris 14 días.



(a)

(b)

Figura A.2: pirita en contacto con *Sulfolobus metallicus*. (a) 7 días y (b) 14 días.

Los análisis EDS sobre la superficie de la pirita, figuras A.3 y A.4, en contacto con medio Norris muestran que la proporción de Fe y S sobre la superficie se mantiene, en cambio la pirita en contacto con los microorganismos se observa una disminución del azufre hasta el día 14 lo que sugiere una lixiviación preferencial del azufre.

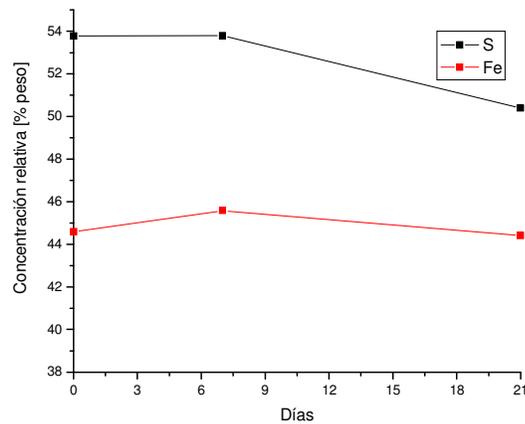


Figura A.3: variación de la concentración relativa de Fe, S en medio Norris.

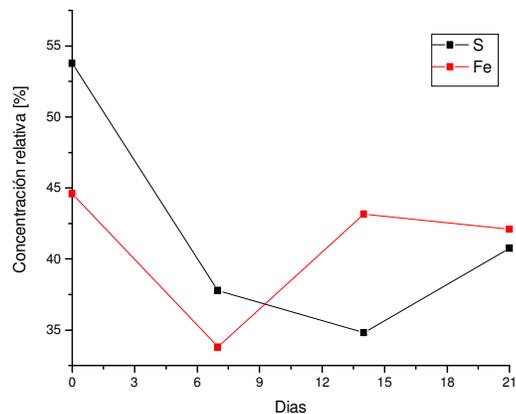


Figura A.4: variación de la concentración relativa de Fe, S en contacto con *Sulfolobus metallicus*.

**Pirita molida:**

La pirita fue inoculada con  $1 \cdot 10^8$  bacterias/ml y se tomaron muestras de pirita a los 6, 12 y 18 días. Las imágenes de SEM figura A.5 a A.7 muestran que a los 6 días se observan células adheridas sobre la superficie, a los 12 días se observan colonias de bacterias en hoyos en la superficie que ellas mismas formaron. El día 18 se observa la superficie del mineral muy atacada.

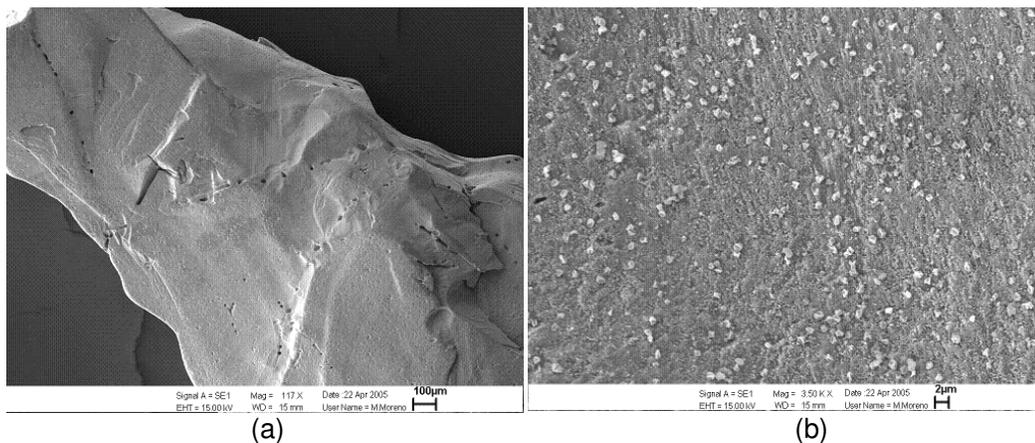


Figura A.5: Pirita molida en contacto con *Sulfolobus metallicus* durante 6 días

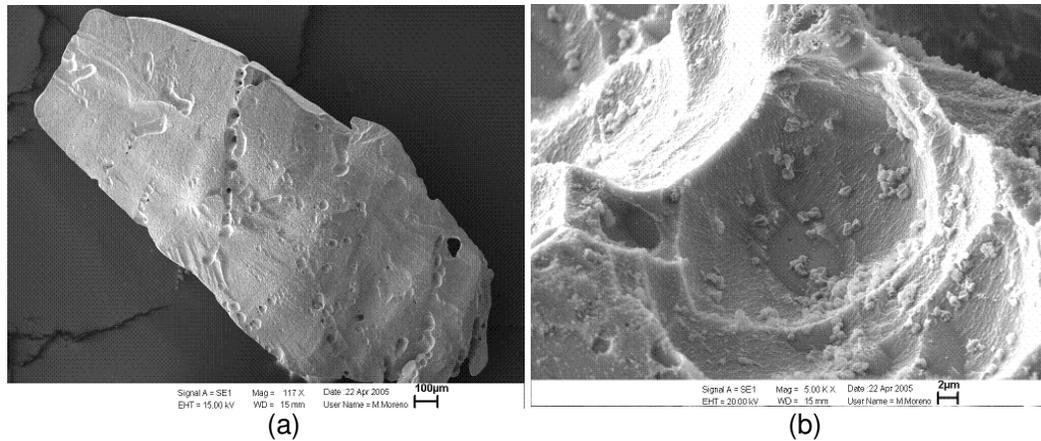


Figura A.6: Pirita molida en contacto con *Sulfolobus metallicus* durante 12 días.

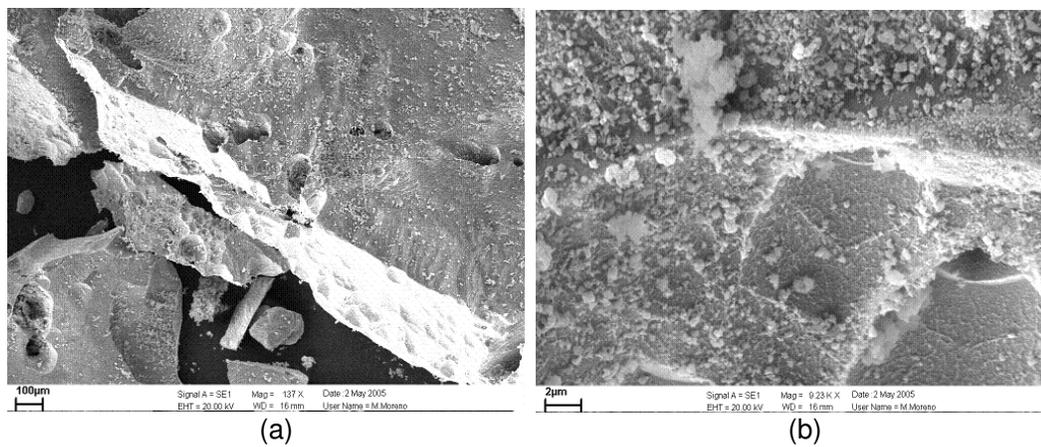


Figura A.7: Pirita molida en contacto con *Sulfolobus metallicus* durante 18 días.

Los análisis de EDS de la figura A.8 muestran que el azufre presente en la superficie del mineral disminuye hasta los 12 días y la concentración de hierro se mantiene casi constante.

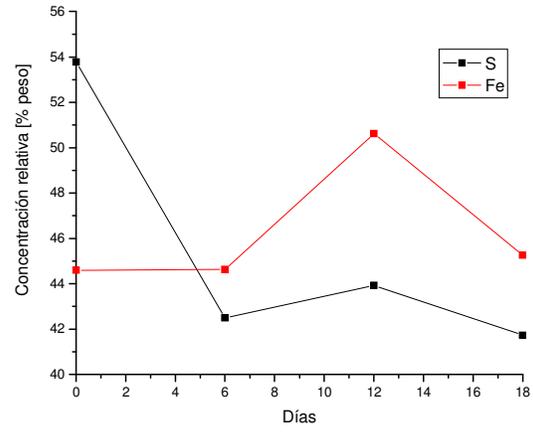


Figura A.8: variación de la concentración relativa de Fe, S sobre pirita en contacto con *Sulfolobus metallicus*.

## **ANEXO B:**

### **MECANISMO DE ACCIÓN DE *Sulfolobus metallicus*:**

Se estudió el mecanismo de acción de *sulfolobus metallicus*, indirecto y cooperativo, sobre perlas de azufre y sobre calcopirita sintética.

#### ***Mecanismo de acción sobre azufre:***

Se colocó en la celda de doble cámara separadas por un filtro, en el compartimiento A se colocó 0.5 gr de azufre en perlas en medio Norris abiótico pH 2.5 y en el compartimiento B se colocó  $2 \cdot 10^8$  cel/ml en medio Norris pH 2.5 durante 8 días. Se monitoreo el crecimiento de los microorganismos en el compartimiento B (y verificó que no hubiese células en el compartimiento A) y el pH. A través del monitoreo de las células en solución, figura B.1 se observa que el mecanismo indirecto no es el principal mecanismo de acción de estos microorganismos ya que la concentración de células rápidamente disminuyó.

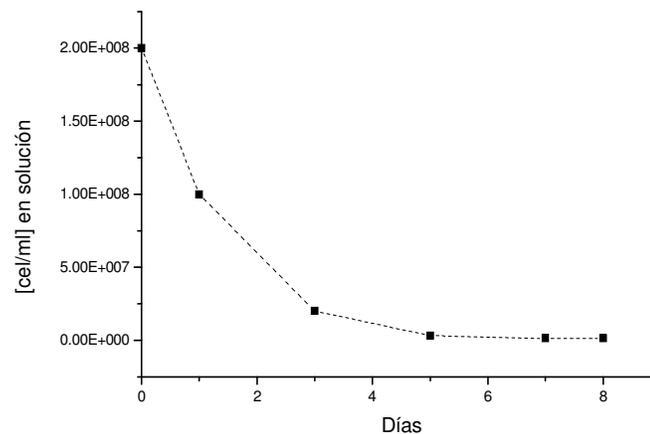


Fig. B.1: Evolución de la población de microorganismos separados de las perlas de azufre.

Un segundo experimento, figura B.2, se realizó contactando azufre en perlas con *Sulfolobus metallicus* en la celda de doble cámara separadas por un filtro, en el compartimiento A se colocó  $1 \cdot 10^8$  cel/ml en medio Norris pH 2.5 y en el compartimiento B se colocó 0.5 gr de azufre en perlas con los microorganismos adheridos a el con medio Norris durante 11 días. Se monitoreó el crecimiento de los microorganismos en ambos compartimientos y el pH durante este periodo

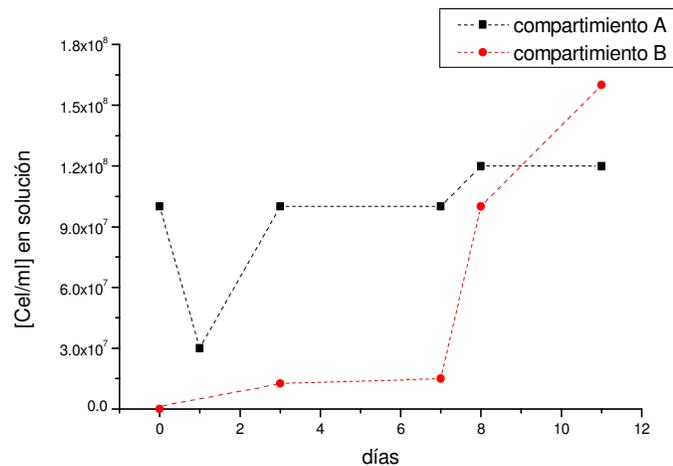


Fig. B.2: Evolución de la población de microorganismos en contacto con perlas de azufre y separada de las perlas.

En el compartimiento A se observa que durante los primeros días de la experiencia la población de microorganismos disminuyó debido a un período de ajuste y luego la población aumentó sostenidamente, en el compartimiento B se observa un rápido aumento de las células en solución. Esto parece indicar que la adherencia de los microorganismos al azufre producen algún tipo de subproducto del azufre que es soluble y es utilizado por los microorganismos en solución para crecer.

Con ambos experimentos es posible concluir que el principal mecanismo de acción de los *Sulfolobus metallicus* sobre azufre es el llamado mecanismo cooperativo.

Se monitoreo además el pH, figura B.3, en la solución del compartimiento B para ambas experiencias, en el gráfico se observa un aumento gradual de la acidez que es consistente con el aumento de la población de microorganismos en el caso del

experimento de azufre en contacto con los microorganismos y en el caso del experimento en que los microorganismos están separados del azufre se observa que la acidificación del medio es menor lo que se debe a la disminución de la concentración de las células en la solución.

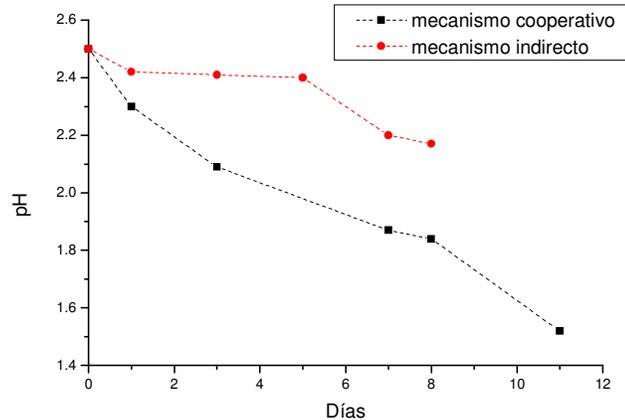


Figura B.3: pH medio Norris de *Sulfolobus metallicus* en perlas de azufre

***Mecanismo de acción sobre calcopirita sintética:***

Se colocó la celda de doble cámara, en el compartimiento A se colocó 0.5 gr de calcopirita molida sintética en medio Norris abiótico pH 1.5 y en el compartimiento B se colocó  $1.2 \cdot 10^8$  cel/ml en medio Norris pH 1.5 durante 14 días. Se monitoreo el crecimiento de los microorganismos en el compartimiento B, figura B.4 (y verificó que no hubiese células en el compartimiento A) y el pH. El monitoreo de las células en solución muestra que, al igual que sobre las perlas de azufre, este no es el principal mecanismo de acción de estos microorganismos pues la concentración de células en la solución disminuyó.

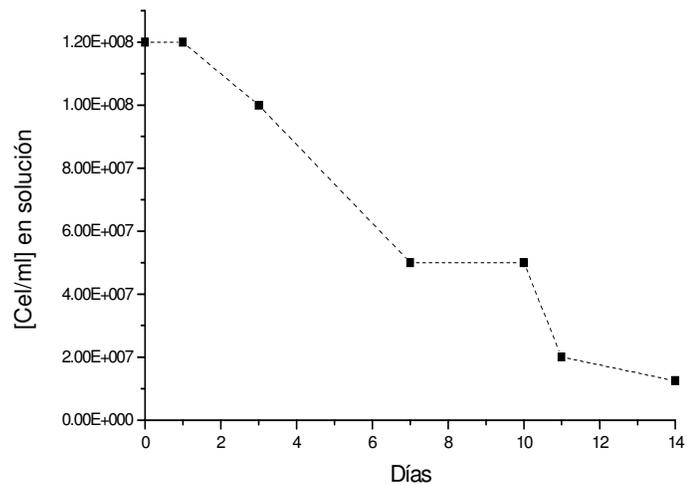


Fig. B.4: Evolución de la población de microorganismos separados de la calcopirita.

Un segundo experimento se realizó, figura B.5, contactando la calcopirita con *Sulfolobus metallicus* en la celda de doble cámara, en el compartimiento A se colocó  $1 \cdot 10^8$  cel/ml en medio Norris pH 1.5 y en el compartimiento B se colocó 0.5 gr de calcopirita natural con  $1 \cdot 10^8$  cel/ml en medio Norris durante 16 días. Se monitoreo el crecimiento de los microorganismos en ambos compartimientos y el pH durante este periodo.

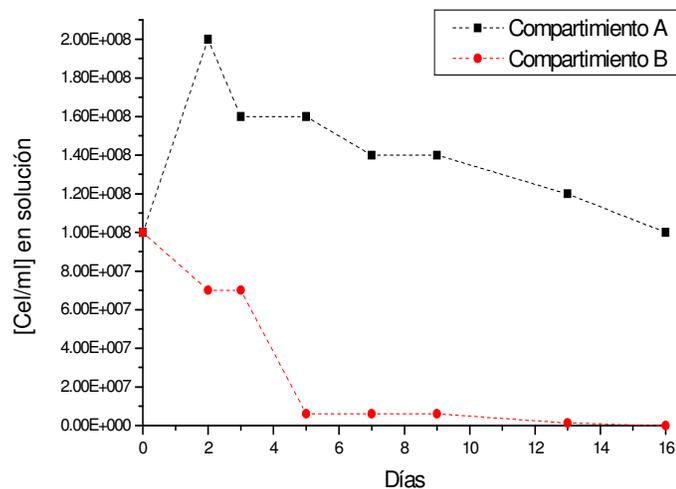


Fig. B.5: Mecanismo cooperativo de *Sulfolobus metallicus* sobre calcopirita.

En el compartimiento A se observa que la concentración de microorganismos se mantiene alta durante toda la experiencia, en cambio en el compartimiento B la

concentración de células en solución disminuyó rápidamente, esto podría deberse a que la mayor parte de los microorganismos en el compartimiento se adhirió a la superficie de la calcopirita.

Con ambos experimentos es posible concluir que el principal mecanismo de acción de los *Sulfolobus metallicus* sobre calcopirita, al igual que sobre azufre, es el llamado mecanismo cooperativo.

En la figura B.6 se presenta la evolución del pH de la solución en el compartimiento B para ambos experimentos y se observa que en el caso de los microorganismos en contacto con el mineral la solución se hace más ácida lo que indica una mayor actividad de los microorganismos en comparación al caso en que los microorganismos están separados del mineral.

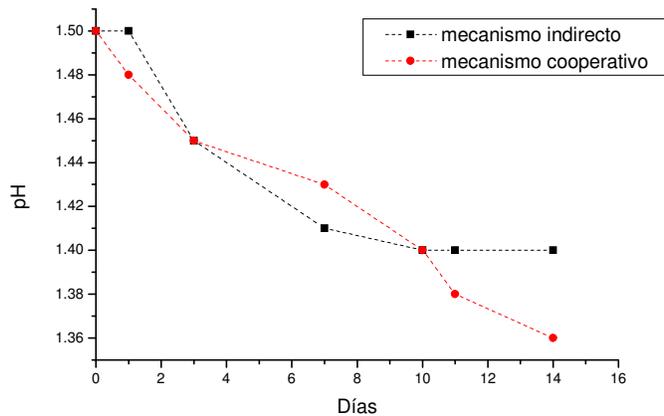


Fig. B.6: pH del medio Norris de *Sulfolobus metallicus* sobre calcopirita.

## ANEXO C:

### MODELO CINETICO DE LIXIVIACION:

Se realizaron 6 experimentos de lixiviación (E1 hasta E6, ver metodología) en matraces erlenmayer de 250 ml para determinar el modelo cinético de lixiviación.

Todos los experimentos se realizaron a 70°C y 150 rpm. Se tomaron muestras de  $\text{Cu}^{+2}$  (absorción atómica),  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $(\text{SO}_4)^{2-}$  (UV-visible), además, una vez terminado los experimentos se analizó cobre, hierro y azufre total en el sólido por ICP, para realizar un balance de masa de los elementos presentes en la lixiviación.

También se ajustó el modelo del núcleo sin reaccionar para determinar si el fenómeno es controlado por difusión, por reacción o mixto.

Cobre, Figura C.1:

se determinó que las mayores recuperaciones de cobre se observan en el caso abiótico- aeróbico en presencia de  $\text{Fe}^{+3}$  seguido de los casos biótico-aerobico en presencia de  $\text{Fe}^{+3}$  y el caso con *S. metallicus* en medio basal. Las menores recuperaciones se observaron en los casos anaeróbico-abiótico sin  $\text{Fe}^{+3}$  y anaeróbico-abiótico con  $\text{Fe}^{+3}$ .

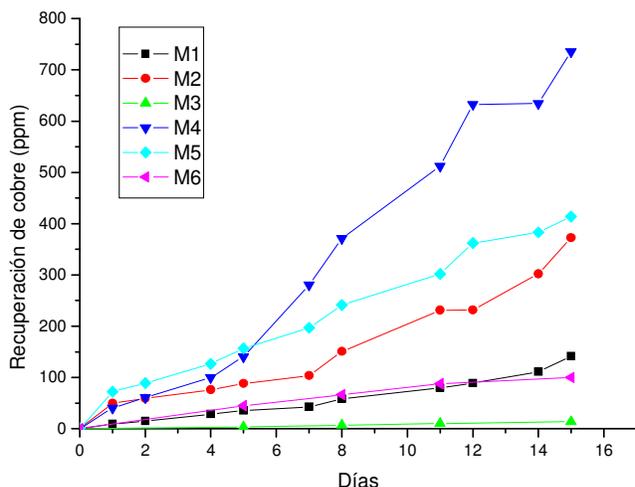


Figura C.1: recuperación de cobre en M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $\text{Fe}^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $\text{Fe}^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $\text{Fe}^{+3}$

Hierro, figuras C.2 y C.3:

Se observó que hay mayor cantidad de hierro total en solución en los casos en que se produce la lixiviación férrica, como es de esperarse. En el caso del ferroso en solución se observa que la mayor concentración de este ión se produce en los casos abióticos- anaeróbicos, ya que el Eh de la solución es baja y todo el hierro en la solución se mantiene como ferroso.

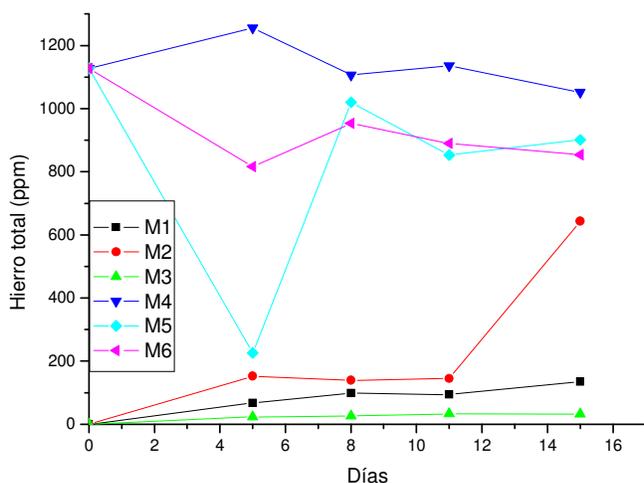


Figura C.2: Hierro total en M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $Fe^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$

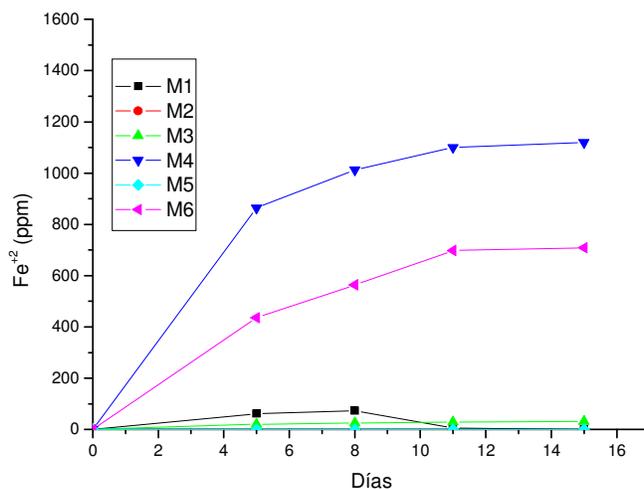


Figura C.3:  $Fe^{+2}$  en M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $Fe^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$

Sulfato total, figura C.4:

Se observa en todos los casos que el sulfato aumenta hasta el día 10 y luego disminuye probablemente por la precipitación de jarositas sobre el sólido. También se genera más sulfato en los casos en que la lixiviación se produce por medio de los microorganismos.

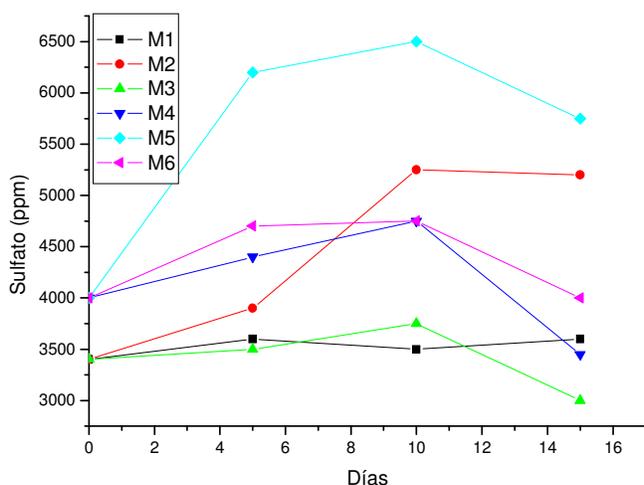


Figura C.4: Sulfato en M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $Fe^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$

Balances de Masa de cobre, hierro y azufre.

Se determinó el cobre, hierro y azufre inicial en el sólido y el cobre, hierro y azufre no lixiviado una vez terminados los experimentos a través de ICP, el cobre se determinó a través de absorción atómica, el hierro (total y ferroso) en la solución y el sulfato se determinaron a través de UV-Visible y se realizó el balance de masa. Se calculó el error asociado a las mediciones comparando las recuperaciones de los elementos por ambas metodologías. Además, el error asociado a absorción es entre 10 y 15 % y para ICP cobre-hierro 5% y azufre 15%. Por otro lado, con M3 y M6 el ajuste es deficiente por la poca cantidad de datos recolectados ya que se evitó el contacto con el aire.

Finalmente, se calculó la fracción molar entre cobre – hierro y cobre – azufre en las 6 muestras.

Balance de cobre:

Tabla C.1: balance de cobre M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $Fe^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$

Cobre			
muestra	gr_solido	gr_solución	error %
M0	0,315	0,000	0,0
M1	0,297	0,014	22,2
M2	0,275	0,037	6,4
M3	0,314	0,001	3,6
M4	0,250	0,074	-13,0
M5	0,278	0,041	-12,3
M6	0,248	0,010	85,0

Balance de Hierro:

Tabla C.2: balance de hierro M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $Fe^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$

Hierro			
muestra	gr_solido	gr_solución	error %
M0	0,315	0,000	0,0
M1	0,301	0,014	5,4
M2	0,254	0,064	-4,9
M3	0,312	0,003	3,0
M4	0,221	0,110	-17,0
M5	0,247	0,090	-32,5
M6	0,256	0,079	-33,4

Balance de azufre:

Tabla C.3: balance de azufre M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $Fe^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$

Azufre			
muestra	gr_solido	gr_solución	error %
M0	0,169	0,000	0,0
M1	0,171	0,120	16,8
M2	0,154	0,173	-7,6
M3	0,196	0,100	16,0
M4	0,187	0,115	10,2
M5	0,146	0,192	-13,7
M6	0,169	0,133	8,5

fracción molar:

Tabla C.4: fracción molar cobre/hierro y cobre/azufre M1: abiótico-aeróbico, M2: en presencia de *S. metallicus*, M3: abiótico-anaeróbico, M4: abiótico-aeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$ , M5: *S. metallicus* en presencia de  $Fe^{+3}$ , M6: abiótico-anaeróbico en presencia de  $Fe^{+3}$

muestra	cobre/hierro	cobre/azufre
M0	--	--
M1	0,91836	0,05938
M2	0,50898	0,10833
M3	0,36390	0,00680
M4	0,58756	0,32230
M5	0,40403	0,10880
M6	0,11123	0,03780

Modelo del núcleo sin reaccionar:

se ajustó el modelo del modelo del núcleo sin reaccionar a los 6 experimentos de la siguiente manera:

Difusión :

$$T = \tau(1-3(1-x)^{2/3}+2(1-x))$$

Reacción :

$$T = \tau(1-(1-x)^{1/3})$$

Mixto :

$$T = y\tau(1-3(1-x)^{2/3}+2(1-x)) + (1-y)\tau(1-(1-x)^{1/3})$$

Curva de cobre corregido, para determinar el valor corregido de  $\tau$  :

$$\text{Recuperación} = (\text{g. solución/g. extracción final solución}) * (\text{extracción final sólido})$$

M1, lixiviación abiótica-aeróbica (sin  $Fe^{+3}$ ):

Se ajustaron los tres modelos cinéticos y se determinó que el fenómeno de lixiviación de calcopirita en presencia de  $O_2$  es controlado por reacción química sobre la superficie y el  $\tau$  es 1175 días y el  $\tau$  corregido es 156 días.

Tabla C.5: variables estadísticas de modelos cinéticos para M1: abiótico-aeróbico en medio basal

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
1-(1-REC_M1)^(1/3)	1175,096	46,89908	25,05583	0
R-squared	0,95228	Mean dependent var		7,181818
Adjusted R-squared	0,95228	S.D. dependent var		5,269121
S.E. of regression	1,151033	Akaike info criterion		3,205705
Sum squared resid	13,24877	Schwarz criterion		3,241877
Log likelihood	-16,63138	Durbin-Watson stat		0,805537

M2. biolixiviación con *S. metallicus* (sin Fe<sup>+3</sup>):

Se ajustaron los tres modelos cinéticos y se determinó que el fenómeno de lixiviación de calcopirita en presencia de O<sub>2</sub> y microorganismos es controlado por reacción química sobre la superficie el  $\tau$  es 429 días y el  $\tau$  corregido es 154 días.

Tabla C.6: variables estadísticas de modelos cinéticos para M2: *S. metallicus* en medio basal

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
1-(1-REC_M2)^(1/3)	428,9318	19,81022	21,65204	0
R-squared	0,936435	Mean dependent var		7,181818
Adjusted R-squared	0,936435	S.D. dependent var		5,269121
S.E. of regression	1,328453	Akaike info criterion		3,492416
Sum squared resid	17,64788	Schwarz criterion		3,528588
Log likelihood	-18,20829	Durbin-Watson stat		0,885659

M3, lixiviación abiótica-anaeróbica (sin Fe<sup>+3</sup>):

Se ajustaron los tres modelos cinéticos y se determinó que el fenómeno de lixiviación de calcopirita en presencia de N<sub>2</sub> es controlado por reacción química sobre la superficie el  $\tau$  es 10662 días y el  $\tau$  corregido es 130 días.

Tabla C.7: variables estadísticas de modelos cinéticos para M3: abiótico-anaeróbico en medio basal

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
1-(1-REC_M3)^(1/3)	10662,01	346,8256	30,74171	0
R-squared	0,985983	Mean dependent var		7,8
Adjusted R-squared	0,985983	S.D. dependent var		5,718391
S.E. of regression	0,677017	Akaike info criterion		2,234615
Sum squared resid	1,833407	Schwarz criterion		2,156503
Log likelihood	-4,586538	Durbin-Watson stat		1,787644

M4, lixiviación abiótica-aeróbica con Fe<sup>+3</sup>:

Se ajustaron los tres modelos cinéticos y se determinó que el fenómeno de lixiviación de calcopirita en presencia de 1 g/l Fe<sup>+3</sup> y O<sub>2</sub> es controlado por reacción química sobre la superficie. El  $\tau$  es 190 días y el  $\tau$  corregido es 124 días.

Tabla C.8: variables estadísticas de modelos cinéticos para M4: abiótico-aeróbico con Fe<sup>+3</sup>.

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
1-(1-REC_M4)^(1/3)	189,5661	7,87844	24,06137	0
R-squared	0,948322	Mean dependent var		7,181818
Adjusted R-squared	0,948322	S.D. dependent var		5,269121
S.E. of regression	1,197814	Akaike info criterion		3,285381
Sum squared resid	14,34757	Schwarz criterion		3,321553
Log likelihood	-17,06959	Durbin-Watson stat		0,853023

M5, biolixiviación con *S. metallicus* agregando Fe<sup>+3</sup> al medio basal:

Se ajustaron los tres modelos cinéticos y se determinó que el fenómeno de lixiviación de calcopirita en presencia de 1 g/l Fe<sup>+3</sup>, O<sub>2</sub> y microorganismos es controlado por reacción química sobre la superficie. El  $\tau$  es 323 días y el  $\tau$  corregido es 125 días.

Tabla C.9: variables estadísticas de modelos cinéticos para M5: *S. metallicus* con Fe<sup>+3</sup>.

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
1-(1-REC_M5)^(1/3)	322,7124	7,71681	41,8194	0
R-squared	0,982696	Mean dependent var		7,181818
Adjusted R-squared	0,982696	S.D. dependent var		5,269121
S.E. of regression	0,693126	Akaike info criterion		2,191299
Sum squared resid	4,804242	Schwarz criterion		2,227471
Log likelihood	-11,05215	Durbin-Watson stat		1,498382

M6, lixiviación abiótica-anaeróbica con Fe<sup>+3</sup>:

Se ajustaron los tres modelos cinéticos y se determinó que el fenómeno de lixiviación de calcopirita en presencia de 1 g/l Fe<sup>+3</sup> y N<sub>2</sub> es controlado por difusión sobre la superficie. El  $\tau$  es 137814 días y el  $\tau$  corregido es 303 días.

Tabla C.10: variables estadísticas de modelos cinéticos para M6: abiótico-anaeróbico con Fe<sup>+3</sup>.

Variable	Coefficient	Std. Error	t-Statistic	Prob.
1-3*(1-REC_M6)^(2/3)+2*(1-REC_M6)	137814,1	20725,51	6,649491	0,0027
R-squared	0,724099	Mean dependent var		7,8
Adjusted R-squared	0,724099	S.D. dependent var		5,718391
S.E. of regression	3,003656	Akaike info criterion		5,214394
Sum squared resid	36,08781	Schwarz criterion		5,136282
Log likelihood	-12,03599	Durbin-Watson stat		1,084456

A modo de resumen se presenta el modelo ajustado y  $\tau$  corregido para todas las experiencias realizadas.

Tabla C.11: resumen modelo del núcleo sin reaccionar.

<b>Muestra</b>	<b>Modelo</b>	<b><math>\tau</math> (días)</b>
<b>M1</b>	Reacción química sobre la superficie	156
<b>M2</b>	Reacción química sobre la superficie	154
<b>M3</b>	Reacción química sobre la superficie	130
<b>M4</b>	Reacción química sobre la superficie	124
<b>M5</b>	Reacción química sobre la superficie	125
<b>M6</b>	Difusión sobre la superficie	303

Con los valores de  $\tau$  corregido se determinó el tiempo teórico necesario para recuperara el 100% del cobre. En el caso de M3 no se puede concluir ya que se tomaron pocas mediciones (5 puntos) por lo que tiene asociado un error grande, al igual que M6.

### **CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LA SUPERFICIE.**

Se realizaron voltametrías cíclicas a la superficie de la calcopirita natural y a la calcopirita lixiviada química y biológicamente. Para esto se tomó muestras de sólido de los distintos experimentos a los 5, 10 y 15 días. Estas muestras se secaron y posteriormente se fabricó un electrodo y se realizó la medición en medio basal (sin  $\text{Fe}^{+3}$ ) a temperatura ambiente.

En la figura C.5 se observa que en la calcopirita natural hay dos picos a 0.4 V vs Ag/AgCl, que corresponde a la formación de CuS sobre la superficie (Gomez et al) y 0.1 V vs Ag/AgCl, que corresponde a la disolución de los compuestos formados en la zona catódica de la voltametría cíclica. Al analizar la superficie lixiviada durante 15 días en un ambiente anaeróbico y abiótico se observa que se presentan los mismos dos picos observados anteriormente pero que la corriente registrada es mucho menor por lo que se puede concluir que la superficie se vuelve menos reactiva.

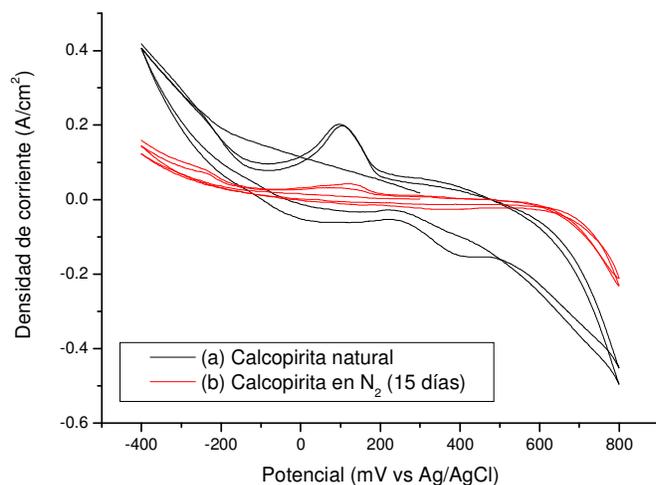


Figura C.5: voltametrías cíclicas de (a) calcopirita natural y (b) calcopirita lixiviada en condiciones anaeróbica – abiótica durante 15 días.

En la figura C.6 se observan los mismos dos picos observados anteriormente a 0.4 y 0.1 V vs Ag/AgCl, al lixiviar la calcopirita expuesta al aire nuevamente se observa que la superficie se vuelve menos reactiva con el paso del tiempo, diferencia que se observa más claramente entre el día 10 y el 15. Además, al comparar las curvas en presencia de N<sub>2</sub> y con O<sub>2</sub> al día 15 se determinó que la corriente sobre la superficie que se lixivió en presencia de aire es menor (la superficie es menos reactiva).

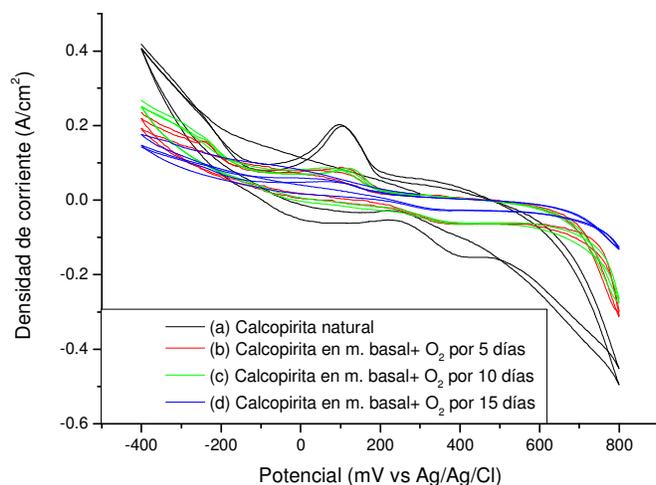


Figura C.6: voltametrías cíclicas de (a) calcopirita natural, (b) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – abiótica durante 5 días, (c) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – abiótica durante 10 días y (d) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – abiótica durante 15 días.

En la figura C.7 se observan los picos a 0.4 y 0.1 V vs Ag/AgCl. En todas las curvas pero las curvas se vuelven menos reactivas con el tiempo, esto es producto de la precipitación de jarositas sobre la superficie. Al comparar las voltametrías de las superficies una vez terminadas las tres experiencias, se observa que en orden decreciente de corrientes se tiene: tratamiento abiótica – anaeróbica, tratamiento abiótica – aeróbica y tratamiento de biolixiviación, que corresponden a las superficies menos lixiviada a mayor grado de lixiviación.

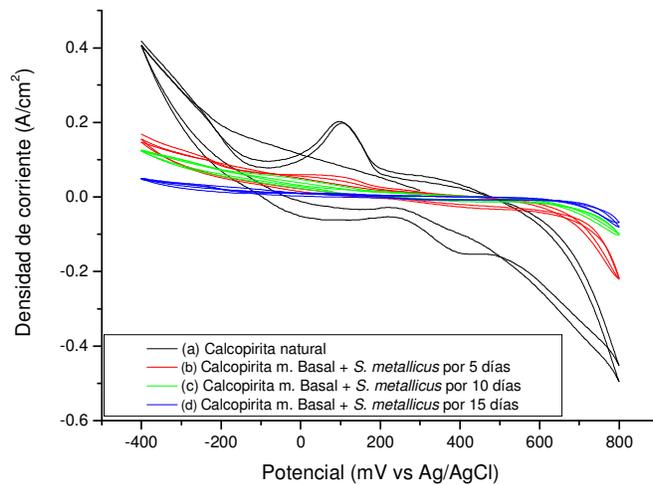


Figura C.7: voltametrías cíclicas de (a) calcopirita natural, (b) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – biótica durante 5 días, (c) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – biótica durante 10 días y (d) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – biótica durante 15 días.

En la figura C.8 se observa que al agregar ion férrico al medio basal la corriente disminuye con el paso de los días, aunque se observa el mineral más activo al día 10 y los picos a 0.1 y 0.4 V vs Ag/AgCl casi no se observan después del día 10. En el caso de la figura C.9 donde se agregaron los microorganismos a la solución que contiene férrico, la corriente también disminuyó y tampoco se observan los picos a partir del día 10. Al comparar ambas figuras se observa que en un principio hay corrientes mayores en el caso abiótico – aeróbico pero ya al día 10 la corriente es mayor en el caso biolixiviado.

En el caso de las soluciones que contienen férrico se observa que las corrientes son menores que en los casos en que las soluciones no contienen el ion, estas diferencias se hacen mayores a medida que el tiempo de lixiviación aumenta.

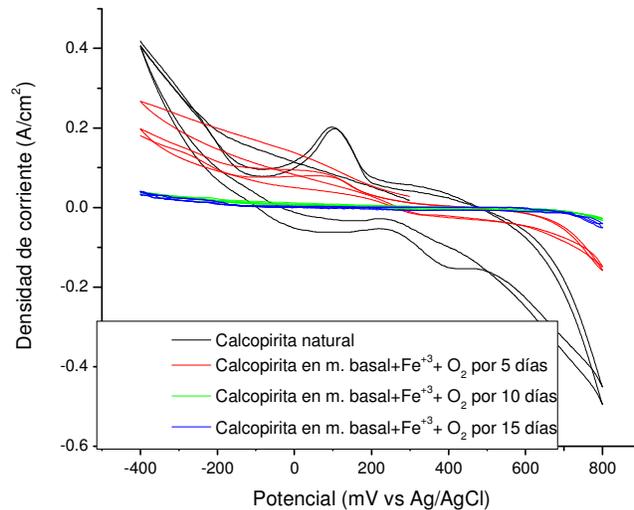


Figura C.8: voltametrías cíclicas de (a) calcopirita natural, (b) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – abiótica + Fe<sup>3+</sup> durante 5 días, (c) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – abiótica + Fe<sup>3+</sup> durante 10 días y (d) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – abiótica + Fe<sup>3+</sup> durante 15 días.

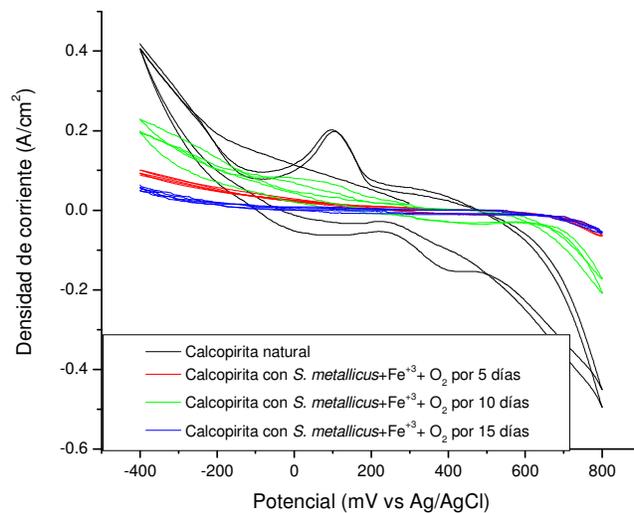


Figura C.9: voltametrías cíclicas de (a) calcopirita natural, (b) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – biótica + Fe<sup>3+</sup> durante 5 días, (c) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – biótica + Fe<sup>3+</sup> durante 10 días y (d) calcopirita lixiviada en condiciones aeróbica – biótica+ Fe<sup>3+</sup> durante 15 días.

## **CONCLUSIONES:**

1. Se determinó que el fenómeno de lixiviación química y biológica de calcopirita es controlado por reacción química sobre la superficie salvo en el caso anaeróbico-abiótico con férrico en la solución, que es controlado por difusión sobre la superficie.
2. al realizar una caracterización electroquímica de la superficie de la calcopirita lixiviada no se observaron diferencias en relación a cambios de estados de oxidación sobre la superficie, pero fue posible determinar que la reactividad de la superficie cambia al cambiar las condiciones de lixiviación del mineral.

## **ANEXO D:**

### **CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE CALCOPIRITA SINTÉTICA**

Antes de cada medición se limpio la superficie de la calcopirita electroquímicamente, se aplicaron 10 ciclos entre 1 y 0.5 V para remover todo lo que pudiera estar absorbido sobre la superficie.

1. N<sub>2</sub>, 25°C, 20 min, a: (1) 1V/EHE, (2) 0.6V/EHE, (3) 0.3V/EHE, (4) 0 V/EHE.
2. O<sub>2</sub>, 65°C, 20 min, a: (1) 1V/EHE, (2) 0.6V/EHE, (3) 0.3V/EHE, (4) 0 V/EHE.
3. N<sub>2</sub>, 65°C, 20 min, a: (1) 1V/EHE, (2) 0.6V/EHE, (3) 0.3V/EHE, (4) 0 V/EHE.
4. N<sub>2</sub>, 65°C, 1 hora (sin aplicar potencial)
5. O<sub>2</sub>, 65°C, 1 hora (sin aplicar potencial)

Una vez terminada la experiencia la muestra fue conducida a la cámara de xps para el análisis de la superficie. Se observa principalmente cobre, hierro, azufre, carbón y oxígeno (los otros picos que no aparecen identificados corresponden a compuestos provenientes de las sales del medio nutriente, que no tienen ningún efecto en la disolución de la calcopirita).

En las figuras D.1 y D.2 se presentan los espectros del carbón y del oxígeno. En el caso del carbón se observa carbón elemental y carbón unido al azufre superficial (C-S) en los casos a 25 y 60°C en que se aplicaron los distintos potenciales, en los casos en que no se aplicó el potencial, en un ambiente anaeróbico no se detecta carbón sobre la superficie, en cambio, en presencia de aire se detecta carbón elemental y carbón unido al azufre (C-S). En el caso del oxígeno se determinó la presencia de hidróxidos y fosfatos al aplicar los potenciales en las distintas condiciones experimentales. En los casos donde no se aplicó potencial sólo se detecta fosfato sobre la superficie.

Análisis de los estados de oxidación del carbón en cada una de las muestras.

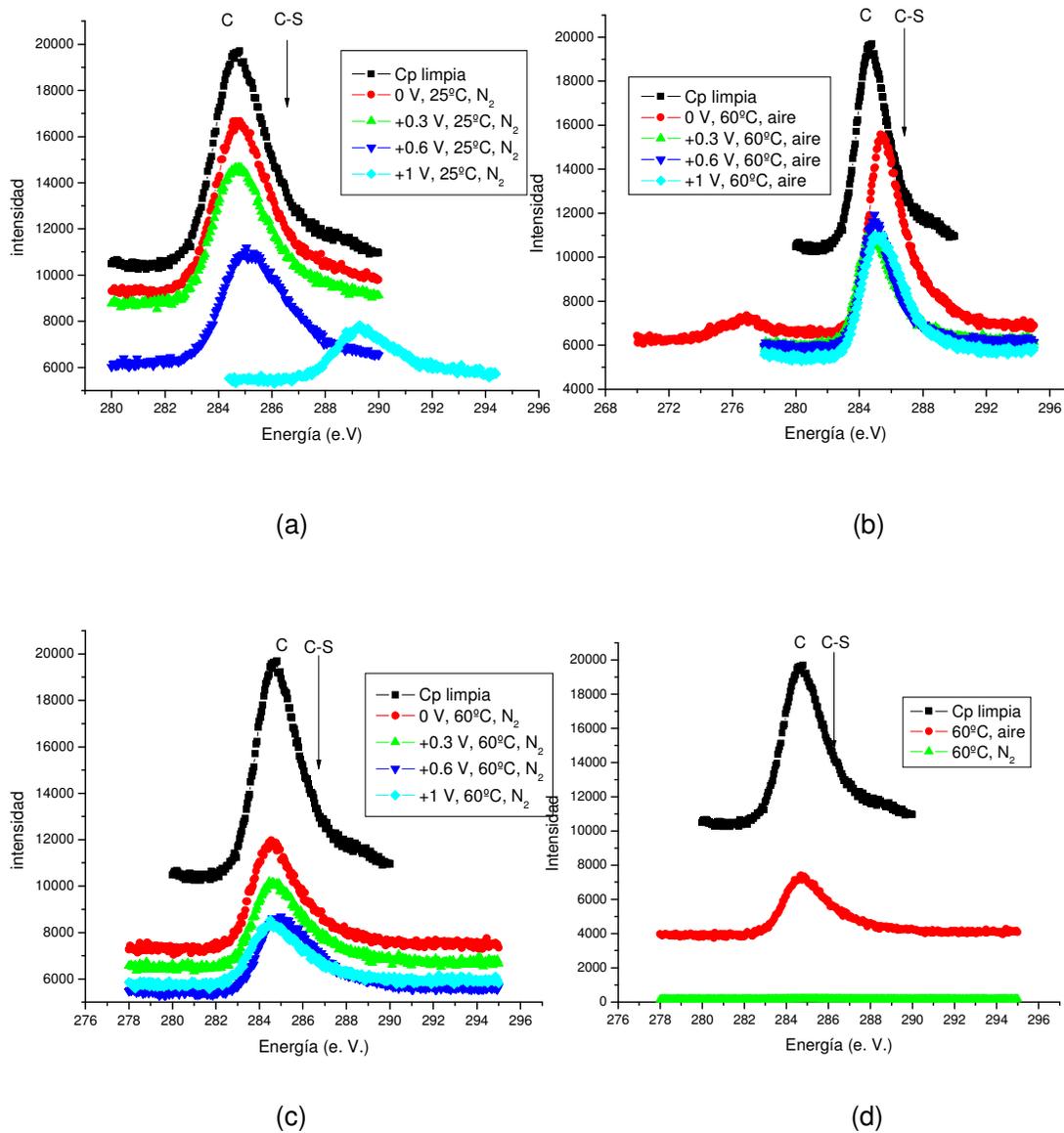


Figura D.1: espectro del carbón en las distintas condiciones experimentales: (a) 25°C y N<sub>2</sub>, (b) 60°C y O<sub>2</sub>, (c) 60°C y N<sub>2</sub>, (d) 60°C sin aplicar potencial externo.

Análisis de los estados de oxidación del carbón en cada una de las muestras.

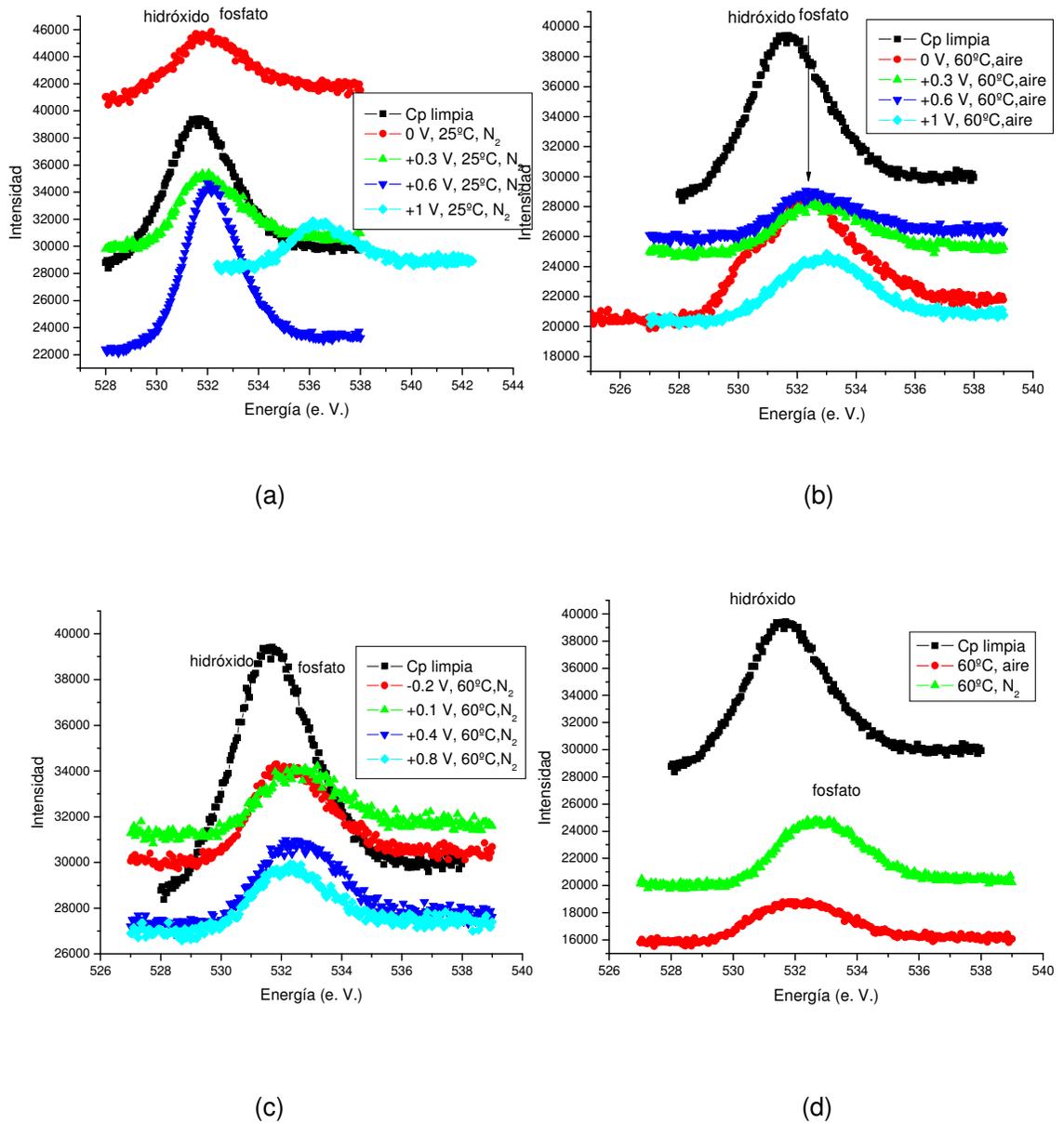


Figura D.2: espectro del oxígeno en las distintas condiciones experimentales: (a) 25°C y N<sub>2</sub>, (b) 60°C y O<sub>2</sub>, (c) 60°C y N<sub>2</sub>, (d) 60°C sin aplicar potencial externo.