



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA POR UN CULTIVO DE  
*Sulfobacillus acidophilus* A 45°C

INDIRA ADRIANA JAQUE LIBERONA

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA POR UN CULTIVO DE  
*Sulfobacillus acidophilus* A 45°C

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO  
TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

INDIRA ADRIANA JAQUE LIBERONA

PROFESOR GUÍA:  
BLANCA ESCOBAR MIGUEL

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
TOMÁS VARGAS VALERO  
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE  
MAYO 2012

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: INDIRA JAQUE LIBERONA  
FECHA: 02/05/2012  
PROF. GUÍA: SRA. BLANCA ESCOBAR MIGUEL

## **ESTUDIO DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA POR UN CULTIVO DE *Sulfobacillus acidophilus* A 45°C**

El presente trabajo de título tiene como principal objetivo caracterizar el comportamiento de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de pirita, evaluando para ello su capacidad de biolixiviación y adherencia al mineral con el objetivo de determinar el mecanismo de biolixiviación más relevante. De esta forma, se busca contribuir a una potencial mejor comprensión de dicho microorganismo en la biolixiviación de pirita.

Para lo anterior se utilizaron cultivos en matraces agitados a 45°C, con una cepa pura de *Sulfobacillus acidophilus* DSMZ 10332, en pirita pura extraída por medio de flotación de relaves de Minera Escondida, con una concentración inicial de ión ferroso de 1 g/L y extracto de levadura como fuente de carbono para su desarrollo. Se monitorearon periódicamente el pH y Eh de los cultivos, se midieron las concentraciones de ión ferroso, hierro total y sulfato en solución, junto con el hierro total y precipitado, tanto en la solución como en la superficie del mineral por medio de digestión con ácido clorhídrico. Junto con lo anterior, se realizó conteo de células planctónicas y células adheridas al mineral por medio de tinción con DAPI y observación en microscopio de Epifluorescencia.

Los resultados indicaron que el proceso de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C estuvo controlado principalmente por la reacción de lixiviación del mineral, que el mecanismo de biolixiviación fue el cooperativo y que se requerirían unos 283 días para la completa disolución del mineral. Asimismo, mostraron que esta bacteria termófila moderada posee una alta capacidad hierro-oxidante y de adherencia a la superficie de la pirita, la cual llegó al 72%.

En el proceso de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C se logró obtener una recuperación de hierro del 18,4%, mientras que en un estudio anterior con la bacteria mesófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* y a una temperatura de 30°C, se alcanzó un 23% de recuperación. De esta forma, pese al aumento de la temperatura, en el proceso de biolixiviación por *S. acidophilus* no se obtuvo una mayor disolución del mineral, debido principalmente al alto grado de formación de precipitados de hierro como hidróxidos y/o jarositas, ocasionado por la alta temperatura utilizada y los valores de pH alcanzados durante el proceso. No obstante, en la biolixiviación de pirita a 45°C se obtuvo una mayor disolución del mineral en presencia de *S. acidophilus*, que en la lixiviación química. Por lo anterior, se considera que dicha bacteria contribuye a lograr mayores tasas de disolución de pirita, y se recomienda llevar a cabo el proceso a menores valores de pH (entre 1,0 y 1,4), para disminuir la formación de precipitados del ión férrico y lograr una mayor disolución del mineral.

*A mi madre Juana Rosa Liberona González  
y hermana Gabriela Jazmín Jaque Liberona  
mis orgullos y pilares fundamentales.*

*Las Amo.*

# AGRADECIMIENTOS

Debo comenzar refiriéndome a *Mi Familia*, que si bien es pequeña se caracteriza por poseer gran convicción, unión y amor para sobreponerse y salir victoriosa en cada una de las pruebas que la vida nos impone continuamente.

Agradezco a mi madre, aquella mujer de fuerte mirada y frágil corazón, quien no sólo me dio la vida, sino también luchó con todas sus fuerzas para mantenerme en este mundo. Una madre abnegada que ha dado su vida, salud y alegría por dar a sus *dos pequeños tesoros* una mejor vida y educación. Conjuntamente doy gracias a mi bella y audaz hermana, por entregarme continuo apoyo, orgullo y alegría. Mi *niña cristal*, ha mostrando desde pequeña una sólida madurez y un complejo entendimiento del mundo y las relaciones interpersonales. Mi mundo sería completamente distinto sin su existencia, nadie más podría entender tan bien mis complicados pensamientos y sentimientos. Muchas gracias a ambas por ser parte fundamental de mi vida, por el apoyo, paciencia y soporte otorgados durante tantos años de estudios. Asimismo, les pido disculpa por aquellos momentos en que no he compartido plenamente con ustedes, así como también por los desvelos y preocupaciones que les ocasioné por aquellas largas jornadas de estudios nocturnos. Ustedes bien saben que éste es más que un proyecto personal, pues siempre ha sido en pos de que tengamos una mejor vida y estabilidad. Espero que el futuro nos permita disfrutar del conjunto esfuerzo puesto en esta empresa.

A mis mejores amigos y amigas, aquellos que siguen presentes y los que están ausentes o distantes físicamente, pero totalmente vivos y presentes en mi corazón, les doy mil gracias por todas las experiencias de vida compartidas, las charlas desarrolladas, el apoyo y el ánimo que me han dado en tantos momentos en que me he sentido agotada.

A mi profesora guía Blanca Escobar, le manifiesto mis más sinceros agradecimientos por la completa dedicación, disposición, paciencia y apoyo brindados durante todos los meses en que estuve desarrollando mi trabajo de título. Muchas gracias por su constante preocupación y sabías palabras, fueron una importante ayuda psicológica para poder llegar a buen término con éste trabajo, y no verme derrumbada en el camino por los problemas. Asimismo, le doy las gracias a los profesores Tomás Vargas y Oriana Salazar, por la ayuda y consejos otorgados para dar un buen desarrollo a este trabajo de título.

Finalmente agradezco a la Sra. Emma Fonseca, pues su excelente disposición me ayudó a desarrollar mi trabajo de mejor forma, y sus amenas charlas me hicieron más agradables las largas jornadas de trabajo en el laboratorio de Biohidrometalurgia de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

1	Introducción .....	10
1.1	Antecedentes Generales .....	10
1.2	Disulfuro de hierro, Pirita .....	11
1.3	Mecanismos Electroquímicos de Disolución de Minerales de Azufre Reducido .....	12
1.4	Biolixiviación .....	13
1.5	Microorganismos Presentes en los Procesos de Biolixiviación .....	14
1.6	Características de <i>Sulfobacillus acidophilus</i> .....	16
1.7	Mecanismos de Lixiviación Bacteriana .....	17
1.7.1	Mecanismo de Lixiviación Indirecta .....	17
1.7.2	Mecanismo de Lixiviación por Contacto .....	18
1.7.3	Mecanismo de Lixiviación Cooperativa .....	18
1.8	Importancia de la Adherencia Bacteriana en la Disolución de Minerales de Azufre Reducido .....	19
1.9	Estudios de Biolixiviación de Pirita .....	22
1.10	Precipitación del Ión Férrico .....	23
1.11	Motivación .....	26
2	Descripción del Proyecto y Justificación .....	27
3	Objetivos .....	28
3.1	Objetivos Generales .....	28
3.2	Objetivos Específicos .....	28
3.3	Alcances .....	28
4	Metodología .....	30
4.1	Materiales y Equipos .....	30
4.2	Diseño del Experimento .....	31
4.2.1	Cultivos de Bacterias en Pirita con ión Ferroso .....	31
4.2.2	Experimentos Control en Pirita con ión Ferroso .....	32
4.3	Análisis Químicos .....	33
4.3.1	Determinación del Hierro en Solución por el Método de la Ortofenantrolina .....	33
4.3.2	Determinación del Hierro Total en Solución y el Precipitado por Medio de Digestión con Ácido Clorhídrico .....	34
4.3.3	Determinación de Sulfato en Solución por Turbidimetría .....	35
4.4	Análisis Biológicos .....	36

4.4.1	Determinación de la Capacidad de Adherencia Bacteriana al Mineral .....	36
4.4.2	Recuento de Bacterias Planctónicas y Adheridas al Mineral Mediante Tinción con DAPI.....	37
5	Resultados.....	39
5.1	Capacidad de Adherencia de <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a la Pirita.....	39
5.2	Biolixiviación de Pirita con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C .....	40
5.2.1	Análisis Físicoquímicos.....	40
5.2.2	Análisis Cualitativos de los Cultivos de Lixiviación y Experimento Control .....	50
5.2.3	Análisis Biológicos.....	52
5.2.4	Mecanismo de Biolixiviación de Pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C.....	57
5.3	Comparación de la Biolixiviación de Pirita con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C y <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C .....	61
6	Discusión.....	66
6.1	Discusiones Parciales.....	66
6.1.1	Capacidad de Adherencia de <i>Sulfobacillus acidophilus</i> sobre Pirita .....	66
6.1.2	Biolixiviación de Pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C.....	67
6.1.3	Comparación de la Biolixiviación de Pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C y por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C.....	72
6.2	Discusión General .....	74
7	Conclusiones.....	78
8	Bibliografía.....	80
9	Anexos .....	83
9.1	Anexo A: Reacciones Sólido-Fluido.....	83
9.1.1	Modelo del Núcleo sin Reaccionar.....	84
9.2	Anexo B: Tratamiento y Análisis Matemáticos de los Datos Experimentales .....	86
9.2.1	Ajuste de Parámetros Bioquímicos en el Proceso de Biolixiviación .....	86
9.2.2	Determinación de la Adherencia Bacteriana al Mineral.....	87
9.2.3	Cuantificación de Bacterias Planctónicas y Adheridas.....	88

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características físicas promedio de una partícula de pirita.....	54
Tabla 2: Densidad de la pirita, junto con su masa y área total disponible para la adherencia bacteriana.....	55
Tabla 3: Ecuaciones de conversión-tiempo de acuerdo al Modelo del Núcleo sin Reaccionar..	58
Tabla 4: Parámetros del Modelo del Núcleo sin Reaccionar para la Biolixiviación de pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C y por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C.....	65

# ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Recuento de bacterias planctónicas totales y porcentaje de adherencia de <i>Sulfobacillus acidophilus</i> sobre pirita a 45°C durante los primeros 120 minutos. ....	39
Gráfico 2: Variación del pH durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> y en el experimento control. ....	41
Gráfico 3: Variación del Eh durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> y en el experimento control. ....	42
Gráfico 4: Variación de la concentración de ión ferroso en solución durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> y en el experimento control. ....	43
Gráfico 5: Variación de la concentración de hierro total en solución como iones ferroso y férrico, durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> y en el experimento control. ....	44
Gráfico 6: Evolución de la concentración de hierro total en solución (Fe Total) , hierro total determinado por digestión con ácido clorhídrico (Fe Total HCl), hierro disuelto desde el mineral (Fe Disuelto), hierro precipitado (Fe Precipitado) e hierro como iones ferroso (Fe II) y férrico (Fe III), durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> .....	46
Gráfico 7: Evolución de la concentración de hierro precipitado como hidróxidos o jarositas en la solución y sobre el mineral, en el proceso de biolixiviación de pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C. ....	47
Gráfico 8: Evolución de la concentración de hierro total en solución (Fe Total), hierro como ión ferroso (Fe II) y como ión férrico (Fe III), durante el proceso de lixiviación química de pirita a 45°C en el experimento control.....	48
Gráfico 9: Variación de la concentración de sulfato en solución medida en el experimento control, la determinada durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> y la concentración esperada teóricamente en este cultivo de biolixiviación a partir del hierro disuelto. ....	49
Gráfico 10: Evolución en el tiempo del número total de bacterias <i>Sulfobacillus acidophilus</i> libres en la solución lixiviante. En número de bacterias planctónicas fue cuantificado en cinco zonas del filtro en que fueron fijadas, siendo el promedio de éstas el número de bacterias considerado para la determinación de bacterias totales. La desviación estándar de dichas cuantificaciones estuvo entre 1 y 17,2. ....	53
Gráfico 11: Determinación de la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de <i>Sulfobacillus acidophilus</i> en el cultivo de biolixiviación de pirita a 45°C, mediante el análisis con regresión lineal. ....	54

Gráfico 12: Evolución en el tiempo del número total de bacterias <i>Sulfobacillus acidophilus</i> adheridas a la superficie del mineral. La determinación del número de bacterias totales adheridas al mineral se realizó con el promedio de la cuantificación de bacterias adheridas a cinco partículas de cada muestra. La desviación estándar de dichas cuantificaciones estuvo entre 6,3 y 25,7.....	55
Gráfico 13: Evolución de la conversión de la reacción de biolixiviación de pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C.....	58
Gráfico 14: Modelo del Núcleo sin Reaccionar para los resultados de conversión de la reacción de biolixiviación de pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C, considerando que el proceso está controlado por la difusión de los reactantes en la ceniza. ....	59
Gráfico 15: Modelo del Núcleo sin Reaccionar para los resultados de conversión de la reacción de biolixiviación de pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C, considerando que el proceso está controlado por la reacción de biolixiviación. ....	59
Gráfico 16: Comparación de la variación del pH durante los procesos de biolixiviación de pirita con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C y con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C.....	62
Gráfico 17: Comparación de la variación del potencial electroquímico durante los procesos de biolixiviación de pirita por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C y por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C. ....	63
Gráfico 18: Evolución de la recuperación porcentual de hierro desde la pirita durante los procesos de biolixiviación de pirita con <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C y por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C, junto a la recuperación obtenida en un experimento control a 30°C el que no fue inoculado con microorganismos.....	64

# ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1: Estructura cristalina del disulfuro de hierro, pirita (Sand <i>et al.</i> 2001).....	12
Figura 2: Micrografía electrónica de bacterias <i>Sulfobacillus acidophilus</i> donde se observan endosporas (Norris <i>et al.</i> 1996).....	17
Figura 3: Esquema de los Mecanismos de Lixiviación Indirecta, por Contacto y Cooperativa (Tributsch 2001).....	19
Figura 4: Imágenes fotográficas de los experimentos control al inicio del estudio (a) y de dos de los cultivos de biolixiviación de pirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C una vez transcurridas 17 horas (b). ....	50
Figura 5: Imágenes fotográficas comparativas entre un experimento control y un cultivo de biolixiviación de pirita con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C una vez transcurridas 259 horas (a) y al final del estudio (b).....	51
Figura 6: Imagen fotográfica de dos de los cultivos de biolixiviación de pirita con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C al final del estudio (427 horas), en donde es posible apreciar la presencia de precipitados de hierro depositados sobre el mineral y las paredes de los matraces. ....	51
Figura 7: Fotografía de una sección de filtro con bacterias planctónicas de un cultivo de biolixiviación de pirita con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C, las que fueron teñidas con DAPI y observadas en el microscopio de Epifluorescencia. En ella es posible ver las bacterias con forma de bastones en una tonalidad brillante.....	52
Figura 8: Fotografías al microscopio de Epifluorescencia de partículas de pirita del cultivo de biolixiviación con <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C, a las 185 horas (a) y 259 horas (b), en las que es posible ver bacterias adheridas a la superficie del mineral con una tonalidad azul brillante dada por la tinción con DAPI, así como también zonas oscuras indicando la presencia de precipitados de hierro. ....	56
Figura 9: Esquema de proceso de lixiviación en el tiempo según modelo de núcleo sin reaccionar (Levenspiel 1987).....	84

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANTECEDENTES GENERALES

Durante el transcurso del desarrollo de la civilización se ha requerido el uso de materiales metálicos con el fin de mejorar el bienestar social. Con el tiempo se han desarrollado variadas técnicas innovadoras para mejorar la producción de éstos. En el caso del cobre, su explotación a gran escala en Chile se produce en el siglo XIX, estimulada por la apertura de la economía nacional y dados los avances logrados tras la Revolución Industrial (Rodríguez *et al.* 2001).

El cobre se puede encontrar principalmente en minerales oxidados y sulfurados. Los primeros son solubles por lo que pueden ser tratados por medio de lixiviación ácida; por su parte los minerales sulfurados tales como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), calcosina ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) y covelina ( $\text{CuS}$ ) son insolubles incluso en ácidos concentrados (Ballester 2005).

En un principio la explotación de cobre sólo se limitaba a los minerales de una alta ley de cobre, mientras que los de baja ley eran depositados cerca de los yacimientos, junto con los residuos provenientes de la flotación y relaves. Sin embargo, a partir de la década del setenta, la metalurgia extractiva se ha visto enfrentada a una fuerte crisis causada por el incremento de los costos de energía y mano de obra, junto con ello, las menas naturales presentan menores leyes de cobre, comenzándose a ver entonces el agotamiento de las reservas de dicho mineral. Es por lo anterior que comienza a ser necesaria la utilización de nuevas materias primas tales como los sulfuros metálicos, y dada la gran acumulación de dichos recursos de baja ley se hace necesaria la búsqueda de nuevas técnicas rentables y eficientes para la recuperación de cobre desde estos (COCHILCO 2009, Rodríguez *et al.* 2001).

Mediante métodos pirometalúrgicos es posible la extracción de cobre desde minerales sulfurados; no obstante, los procesos necesarios para ello son altamente contaminantes debido a la emisión de  $\text{SO}_2$ , contribuyendo así al problema de la lluvia ácida. Dada la política medioambiental existente y la necesidad de reducir los elevados costos de inversión y de operación que conllevan los procesos convencionales, surgen los procesos hidrometalúrgicos como una alternativa novedosa; sin embargo, estos requieren elevados consumos de reactivos lixiviantes, altas presiones y temperaturas de operación, junto con elevados costos de operación de la molienda final. Es entonces necesario el desarrollo de nuevas técnicas que sean tan eficientes como rentables y limpias (Rodríguez *et al.* 2001). Dada esta búsqueda, fueron encontradas en los minerales ciertas bacterias catalizadoras de la lixiviación de los minerales sulfurados, haciendo rentable su procesamiento y por tanto convirtiéndolos en reservas minerales económicamente explotable (COCHILCO 2009).

La demanda de cobre refinado a fines del año 2010 alcanzó los 19,18 millones de toneladas métricas, mientras que la producción chilena de mina habría totalizado los 5,4 millones de TM. En cuanto a su precio en la Bolsa de Metales de Londres, este alcanzó un promedio de US\$3,42 la libra (COCHILCO 2010).

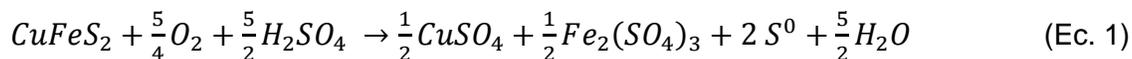
Lo anterior refleja la gran importancia económica del cobre, pues si bien la participación en el Producto Interno Bruto nacional de la minería del cobre bordea aproximadamente el 6% desde el año 2003, el aporte de CODELCO y ENAMI representan aproximadamente el 15% del total de ingresos fiscales. De esta forma, es relevante mantener las metas de producción, lo cual se ve dificultado por el agotamiento de los recursos de mayores leyes de cobre, siendo necesario el aporte de nuevas tecnologías como es la lixiviación biológica. Actualmente, se estima que por medio de esta alternativa de procesamiento, se recuperan anualmente unos 555 mil toneladas de cobre fino, equivalentes al 10,4% de la producción total de cobre (COCHILCO 2009).

## 1.2 DISULFURO DE HIERRO, PIRITA

El disulfuro de hierro, de fórmula molecular  $FeS_2$ , es el mineral de azufre reducido más abundante y es posible encontrarlo en yacimientos minerales, depósitos hidrotermales, rocas ígneas y lechos sedimentarios. Si bien tiene poco valor económico, se encuentra asociado frecuentemente a minerales valiosos tales como calcopirita, esfalerita y galena, desde los que se busca la extracción del cobre (Chandra y Gerson 2010).

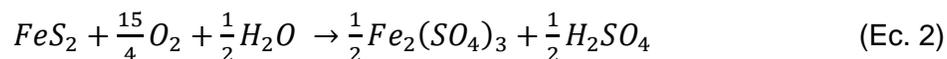
Las reacciones de lixiviación tanto de la calcopirita como de la pirita son exotérmicas, permitiendo dicha energía liberada incrementar la temperatura al interior de las pilas, y de esta forma favorecer la disolución de la calcopirita. Sin embargo, el calor de reacción es considerablemente mayor en la lixiviación de la pirita, como es posible ver en las Ecuaciones 1 y 2 a continuación (Petersen y Dixon 2002).

El calor liberado por la reacción de disolución de calcopirita está dado por:



$$\Delta H = -508 \left[ \frac{kJ}{mol} \right]$$

Mientras que la reacción de lixiviación de la pirita está dada por:



$$\Delta H = -1.505 \left[ \frac{kJ}{mol} \right]$$

Es posible encontrar el disulfuro de hierro en dos formas polimorfas, como pirita o marcasita, la primera tiene forma cúbica mientras la segunda ortorrómbica, siendo esta última menos estable y frecuente (Chandra y Gerson 2010).

La pirita tiene un arreglo cristalográfico centrado en la cara. Su estructura cristalina es mostrada en la Figura 1. Se compone de dos enlaces, el Fe-S y S-S, donde cada átomo de hierro está coordinado con seis de azufre en una disposición octaédrica distorsionada, mientras que cada azufre está coordinado a tres átomos de hierro y uno de azufre en un arreglo tetraédrico distorsionado. Cada  $S_2^{2-}$  está orientado diagonalmente y alternado en orientación a la capa cristalográfica. Este arreglo lleva a una disminución de simetría de su estructura cúbica. Está formada por un 46,5% másico de hierro y un 53,5% de azufre, posee un color amarillo metálico y su densidad es de aproximadamente  $5,02 \text{ [g/cm}^3\text{]}$  (Chandra y Gerson 2010).

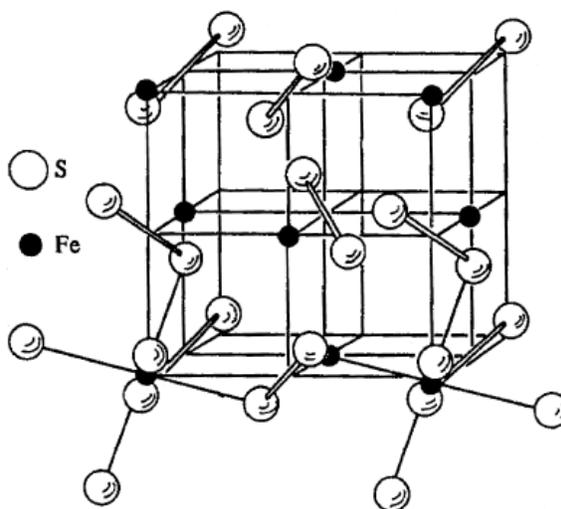


Figura 1: Estructura cristalina del disulfuro de hierro, pirita (Sand *et al.* 2001).

### 1.3 MECANISMOS ELECTROQUÍMICOS DE DISOLUCIÓN DE MINERALES DE AZUFRE REDUCIDO

La mayoría de los sulfuros son semiconductores o semimetales. Sin embargo, entre ellos puede ser muy diferente su comportamiento electroquímico, así como también las características de los productos de la disolución. En algunos casos, tales como para el ZnS, CdS, PbS y CuS, el rendimiento del azufre molecular como un producto de la oxidación difiere bastante con respecto a los de  $FeS_2$ ,  $MoS_2$  y  $WS_2$ . Hoy en día, se tienen conocimiento de que de dichos sulfuros reaccionan de forma diferente dependiendo de la naturaleza electrónica de la banda de valencia con que el electrolito puede intercambiar electrones durante la reacción de disolución del mineral (Tributsch 2001).

Hay varios mecanismos mediante los cuales se puede llevar a cabo la disolución de los sulfuros metálicos, llevándolos desde un estado cristalino a productos soluble o amorfos. Los protones pueden reaccionar con el sulfuro liberando iones  $\text{SH}^+$ , donde la reactividad está dada por la solubilidad del producto. Cuando los electrones extraídos por  $\text{Fe}^{3+}$  son de un mineral sulfurado con banda de valencia  $\text{S}^{2-}$ , se rompen los enlaces químicos y son liberados los iones metálicos tales como el hierro. Los enlaces metálicos rotos pueden estar presentes en el sulfuro con banda de valencia tipo p y su presencia en el sulfuro lleva a mayores tasas de disolución interfacial. También, se puede llegar a la disolución del mineral, formando complejos metálicos o de polisulfuro que interactúen con él, así la energía liberada durante la formación del complejo puede ser suficiente para la disolución del compuesto cristalino (Tributsch 2001).

Junto con lo anterior, otro mecanismo que puede llevar a la disolución del mineral de azufre reducido es electroquímico. Cuando el potencial electroquímico de un sulfuro es incrementado hasta el potencial de descomposición, éste reaccionará con el electrolito. En el caso de la pirita, ésta es sujeta a un mecanismo interfacial de coordinación química, donde las especies en el agua reaccionan primero con el hierro en la superficie hacia complejos con etapas sucesivas de incremento en el estado oxidativo. Dado que el hierro no puede formar un complejo peróxido para liberar el oxígeno desde el agua, éste va a la superficie de reacción con el sulfuro que finalmente conduce a sulfato de hierro (Tributsch 2001).

Si bien el  $\text{RuS}_2$  puede oxidar agua a oxígeno sin corrosión, en el  $\text{FeS}_2$  con igual estructura tanto cristalina como electrónica, el sulfato es formado cuando el proceso oxidativo es mejorado, dado que el Fe no puede alcanzar mayores estados de oxidación. Lo anterior muestra que la formación del sulfato mediante la vía de intermediarios del thiosulfato, es consecuencia de una reacción secundaria de hidratación y oxidación del hierro superficial en la pirita y no directamente como consecuencia de la reacción entre el agua y dicho mineral sulfurado (Tributsch 2001).

Las reacciones interfaciales de la pirita y otros minerales de azufre reducido están determinadas por la coordinación química del metal, es por ello que la extracción de electrones no conduce directamente a la disolución del mineral, como es el caso de la pirita, un mineral estable y por tanto difícil de disolver por mecanismos electroquímicos. Así, toma importancia el efecto de la acción bacteriana en la disolución de este tipo de minerales, debido a que los microorganismos autótrofos que se desarrollan en ambientes con minerales sulfurados debieron generar mecanismos especializados para poder disolver estos minerales, y así obtener la energía química que requieren (Tributsch 2001).

## 1.4 BIOLIXIVIACIÓN

La biolixiviación es un proceso biohidrometalúrgico, correspondiente a una lixiviación catalizada biológicamente por microorganismos, los cuales disuelven minerales liberando compuestos solubles de cobre y otros metales de interés económico, no requiriéndose así altas energías de activación, y por tanto las reacciones pueden transcurrir a bajas presiones y temperaturas (Rodríguez *et al.* 2001).

En cuanto a algunas ventajas que presentan los procesos biohidrometalúrgicos con respecto a los piro o hidrometalúrgicos, se tiene que los primeros se dan en condiciones cercanas a las ambientales, los compuestos utilizados pertenecen a los ciclos biogeoquímicos y por tanto, los productos y subproductos que se obtienen son compatibles medioambientalmente. Asimismo, no se producen emisiones de SO<sub>2</sub> como en el caso de los procesos pirometalúrgicos. Junto con lo anterior, las bacterias logran disgregar matrices de baja porosidad que hacen poco accesible a reactivos utilizados en hidrometalurgia, permitiendo así la disolución de metales, sin la necesidad de realizar una molienda del mineral hasta que este alcance tamaños de partículas muy reducidos.

No obstante, la lixiviación bacteriana presenta ciertas desventajas que en algunos casos han limitado su comercialización a escala industrial, entre las que se pueden mencionar las bajas velocidades de reacción, la obtención de soluciones demasiado diluidas como para obtener el metal de interés directamente de ellas, el que las aguas ácidas que se generan de estos procesos deben ser tratadas antes de su vertido (aunque por lo general se trabaja en ciclos cerrados y se recirculan al proceso), y el que se trata de una tecnología en desarrollo donde se hace necesario un mayor conocimiento, como por ejemplo sobre el comportamiento y/o las características de los microorganismos y por tanto de sus rendimientos en la disolución de los minerales, dadas distintas condiciones de operación (Rodríguez *et al.* 2001).

En Chile, la biolixiviación comenzó a experimentarse en Chuquicamata, División Norte de Codelco a comienzo de los años setenta en pilas de ripio con mineral de ley marginal. Mediante este estudio se lograron aislar y hacer cultivos de las bacterias presentes, para posteriormente esparcirlas en solución sobre la pila de mineral, potenciando así el proceso de biolixiviación que se daba por las bacterias naturalmente presentes en la pila. Más tarde, en 1986, se inició la aplicación comercial a minerales sulfurados remanentes de la lixiviación primaria de minerales oxidados y mixtos de cobre, en la mina Lo Aguirre de la Sociedad Minera Pudahuel Ltda. (COCHILCO 2009).

## **1.5 MICROORGANISMOS PRESENTES EN LOS PROCESOS DE BIOLIXIVIACIÓN**

Los microorganismos involucrados en los procesos de biolixiviación corresponden a arqueas o bacterias, las que se caracterizan por desarrollarse en condiciones extremas tales como pH ácidos, altas temperaturas y concentraciones de elementos metálicos, y cuya principal fuente de energía está dada por la oxidación del ión ferroso a férrico y la de compuestos reducidos de azufre. Se aíslan generalmente de lugares donde ocurre la oxidación natural de minerales, tales como minas, aguas de manantiales ricas en azufre y depósitos de carbón. Es posible clasificarlos de acuerdo al intervalo de temperatura en que es posible su desarrollo, distinguiéndose tres grupos: el de los mesófilos, termófilos moderados y termófilos extremos (Rodríguez *et al.* 2001).

Las bacterias mesófilas tienen un rango de temperatura entre los 15°C y 40°C. Entre ellas se encuentran las autótrofas, que utilizan como fuente de carbono compuestos inorgánicos tales como el anhídrido carbónico; las heterótrofas, que utilizan fuentes orgánicas y las mixotróficas, que utilizan como fuente de carbono tanto compuestos orgánicos como inorgánicos. Algunas de las bacterias mesófilas autótrofas obligadas más comúnmente aisladas de ambientes mineros son la *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, las que coexisten en ambientes naturales cooperando en la biolixiviación de minerales. Su mayor diferencia reside en la capacidad que tienen de utilizar el ión ferroso y/o los compuestos reducidos de azufre como fuente de energía, donde la *T. ferrooxidans* es capaz de utilizar ambas fuentes de energía, mientras que *At. thiooxidans* sólo puede usar el azufre reducido y la *L. ferrooxidans* el ión ferroso. No obstante, todos estos tipos de bacteria ocupan el oxígeno como aceptor terminal de electrones (Rodríguez *et al.* 2001).

Las bacterias termófilas moderadas se caracterizan por desarrollarse en ambientes ácidos y a temperaturas entre los 45°C a 55°C. Entre ellas se pueden nombrar a *Thiobacillus caldus*, *Leptospirillum thermoferrooxidans*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* y *Sulfobacillus acidophilus*. La bacteria *At. calduses* es autótrofa azufreoxidante e incapaz de oxidar el ferroso, es por ello utilizada junto con bacterias ferrooxidantes tales como la *L. ferrooxidans* en la oxidación de concentrados de calcopirita. Por su parte, *L. thermoferrooxidans* es quimioautótrofa estricta, ferrooxidante y no azufreoxidante; si bien posee similitudes con *L. ferrooxidans*, presenta diferencias fisiológicas y morfológicas tales como su temperatura óptima de crecimiento, su buena resistencia a altas concentraciones de ión ferroso y su mayor tamaño. En cuanto a las bacterias del género *Sulfobacillus*, se ha observado que aquella que es más activa en relación a la oxidación de  $Fe^{+2}$  y de sulfuros minerales es la *S. thermosulfidooxidans*, mientras que *S. acidophilus* es más eficiente en la oxidación de azufre; sin embargo, se considera que ambas son nutricionalmente versátiles debido a que son capaces de crecer tanto en forma autotrófica, heterótrofa, como mixotrófica, al utilizar  $CO_2$  y glucosa como fuentes de carbono (Rodríguez *et al.* 2001).

Los microorganismos termófilos extremos se presentan en ambientes con temperaturas entre los 55°C y 90°C, pueden crecer de forma autótrofa y heterótrofa. Bajo condiciones autótrofas catalizan la oxidación de azufre elemental,  $Fe^{+2}$  y minerales de azufre reducido. Presentan velocidades de biolixiviación de sulfuros metálicos considerablemente altas, sobre todo cuando la concentración de sólidos o la densidad de pulpa son bajas; en caso contrario su acción se ve altamente restringida. En general, los termófilos extremos presentan como principal problema la gran sensibilidad de su membrana frente a fenómenos de atrición, lo que obliga a utilizarlas en los procesos de biolixiviación dinámica, tales como reactores, con densidades de pulpa menores que las utilizadas con microorganismos termófilos moderados. Es debido a lo anterior, que se ha implementado el uso de bacterias termófilas moderadas, las que son resistentes a altas densidades de pulpa y a elevadas concentraciones de  $Fe^{+2}$  (Rodríguez *et al.* 2001).

Con el tiempo va tomando mayor fuerza la idea de la utilización de estas bacterias termófilas moderadas en la biolixiviación de concentrados minerales, debido a que se pueden alcanzar mayores grados de disolución y velocidades de lixiviación, comparativamente con las bacterias mesófilas. De esta forma, la alta eficiencia en la extracción de cobre desde calcopirita,

junto con la oxidación de pirita y arsenopirita que se logra con estos microorganismos, es una de las aplicaciones más importantes de la biolixiviación a altas temperaturas.

## 1.6 CARACTERÍSTICAS DE *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS*

La bacteria *Sulfobacillus acidophilus* posee forma de bastón, sus dimensiones son de 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  de ancho y 3,0-5,0  $\mu\text{m}$  de largo, es Gram-positiva y formadora de endosporas esféricas. Corresponde a un microorganismo termófilo moderado, pues crece en condiciones de temperatura entre 40°C y 60°C, siendo su óptimo crecimiento entre los 45°C y 50°C. Junto con ello es acidófilo, desarrollándose en ambientes ácidos, con pH óptimo de crecimiento de 2,0 (Norris *et al.* 1996). No obstante, estudios de biolixiviación de pirita a bajos pH muestran que ésta fue efectiva sólo cuando el pH de los cultivos se encontraba entre 1,2 y 1,5 e incluso a pH 1,0. Esto debido a que era posible el desarrollo de la bacteria termófila moderada a estos bajos valores de pH, continuando así la lixiviación del mineral. Asimismo, se pudo observar que a pH mayores se formaban precipitados de  $\text{Fe}^{+3}$  en forma de jarositas, los que generaban barreras difusionales, viéndose afectada la tasa de disolución del mineral (Yahya y Johnson 2002).

El *Sulfobacillus acidophilus* posee las características de ser un microorganismo autótrofo siendo capaz de oxidar ión ferroso, azufre elemental y minerales sulfurados, por lo que es aeróbico debido a que requiere de la presencia de oxígeno para la oxidación de los minerales (Norris *et al.* 1996), no obstante en condiciones anóxicas puede ser anaeróbico facultativo. En cuanto a su metabolismo, usa los iones como fuente de energía y extracto de levadura como fuente de carbono, por lo cual es considerado un microorganismo quimilitoheterótrofo (Bridget y Johnson 1998).

Estudios sobre la influencia del potencial redox en la cinética de oxidación de esta bacteria muestran que si este es menor a los 650 [mV vs SHE] la velocidad oxidativa depende sólo de la concentración del ión ferroso; para mayores potenciales la actividad oxidativa bacteriana es inhibida al aumentar la concentración del ión férrico. A valores mayores de 800 [mV vs SHE] la cinética de oxidación disminuye considerablemente con el potencial, llegando a anularse al alcanzar el máximo potencial redox para que haya actividad bacteriana, el cual es de 826 [mV vs SHE] (Collari 2011).

En la Figura 2 a continuación, se muestra una bacteria *Sulfobacillus acidophilus* con endosporas en su interior.

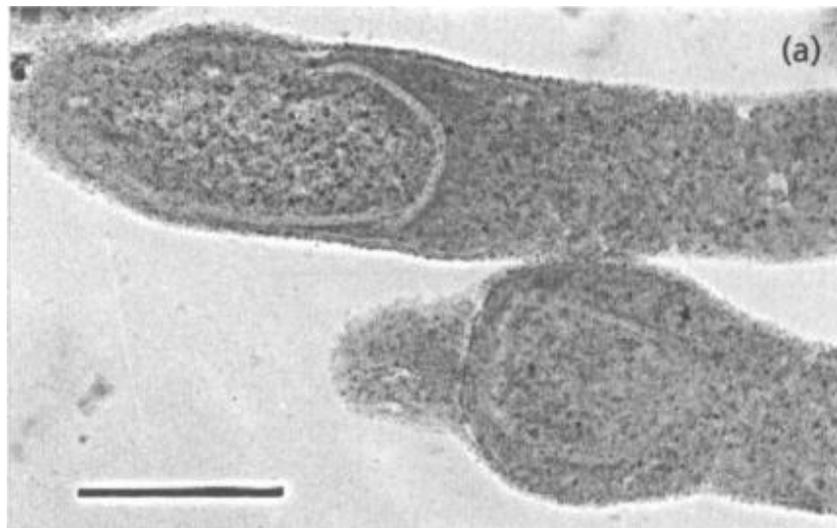


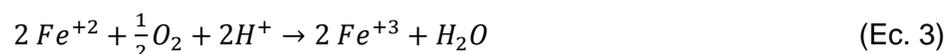
Figura 2: Micrografía electrónica de bacterias *Sulfobacillus acidophilus* donde se observan endosporas (Norris *et al.* 1996).

## 1.7 MECANISMOS DE LIXIVIACIÓN BACTERIANA

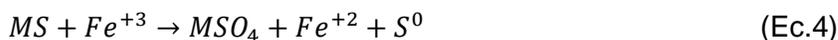
Helmut Tributsh propone la existencia de los siguientes tres mecanismos para la biolixiviación: indirecto, por contacto y el cooperativo. Asimismo indica que es necesario que las bacterias se contacten con el sulfuro a través de una capa de polímeros extracelulares (EPL), los que actúan como medio para la reacción de disolución del mineral (Tributsch 2001).

### 1.7.1 MECANISMO DE LIXIVIACIÓN INDIRECTA

El mecanismo indirecto considera la acción de iones férricos sobre minerales sulfurados mediante una disolución electroquímica, así por medio de esta reacción se producen ión ferroso y azufre elemental. Posteriormente, éstos son oxidados biológicamente a ión férrico e ión sulfato respectivamente. Tanto los microorganismos que se encuentran en solución como los adheridos al mineral pueden oxidar el ión ferroso a férrico en presencia de oxígeno y protones, por medio de la siguiente reacción (Ballester 2005):



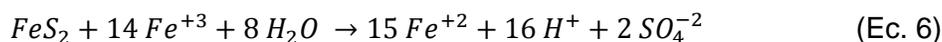
El  $Fe^{+3}$  oxida la los minerales sulfurados de acuerdo a la siguiente reacción:



Expresada formalmente como:



En el caso específico de la pirita, se tiene:



De esta forma, los microorganismos permiten la regeneración de ión férrico, por medio de la oxidación de ión ferroso, de tal manera que el primero esté disponible para la lixiviación de los minerales sulfurados. Sin embargo, como esta reacción consume protones, se puede producir un aumento del pH y consecuentemente la precipitación de ión férrico, formando barreras difusionales que impiden el contacto directo entre este y el sólido, de esta forma afecta negativamente la disolución biológica del mineral (Ballester 2005).

## 1.7.2 MECANISMO DE LIXIVIACIÓN POR CONTACTO

Anteriormente este mecanismo era denominado directo, el cual se refiere a un contacto directo entre la membrana del microorganismo y el sulfuro utilizando para la lixiviación mecanismos enzimáticos. Sin embargo, Tributsch propuso que se sustituyese dicho término por el de *mecanismo por contacto* debido a que el microorganismo crea una zona de reacción controlada con una capa de exopolímeros (EPL) entre la membrana bacteriana y el sulfuro. De esta forma, la bacteria mantiene un estrecho contacto con la interfaz de sulfuro con el fin de condicionar el entorno del mineral para facilitar la disolución electroquímica por el ataque de ión férrico, disolución que de otra forma no tendría lugar (Tributsch 2001).

## 1.7.3 MECANISMO DE LIXIVIACIÓN COOPERATIVA.

Tributsch introduce el concepto de mecanismo cooperativo, en el que los microorganismos adheridos al mineral y los libres en solución cooperan entre sí. Las bacterias adheridas al sulfuro liberan especies metálicas oxidables como el ión ferroso, éste es oxidado por las bacterias en solución regenerando así el agente oxidante  $Fe^{+3}$ , el que ataca al mineral dando lugar a la lixiviación directa (Tributsch 2001, Rodríguez *et al.* 2003a).

En la Figura 3 son esquematizados los tres mecanismos de lixiviación antes mencionados.

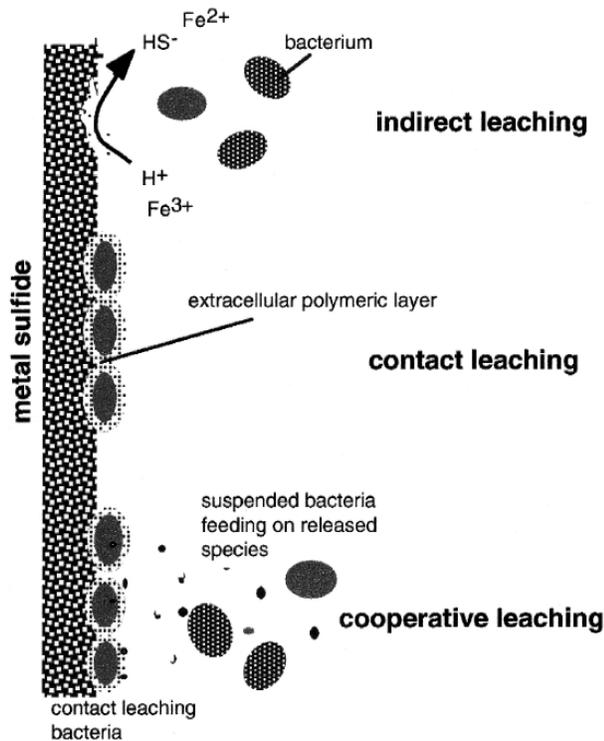


Figura 3: Esquema de los Mecanismos de Lixiviación Indirecta, por Contacto y Cooperativa (Tributsch 2001).

## 1.8 IMPORTANCIA DE LA ADHERENCIA BACTERIANA EN LA DISOLUCIÓN DE MINERALES DE AZUFRE REDUCIDO

Diferentes estudios sobre las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) han indicado que la formación de éstas es un prerequisite importante para la adherencia bacteriana y la consecuente disolución del mineral. El hierro contenido en esta capa de exopolímeros confiere una carga neta positiva a las células bacterianas, causando la atracción electrostática con la superficie de la pirita cargada negativamente, además de iniciar la etapa de disolución del mineral sulfurado. De esta forma, las sustancias extracelulares son consideradas una extensión del radio de acción de los microorganismos, debido a que es un compartimiento especial para condicionar las reacciones de disolución del mineral (Rodríguez *et al.* 2003a).

La composición de las sustancias exopoliméricas no es del todo conocida, sin embargo, algunos investigadores han encontrado que ésta depende del nutriente en que se desarrolle el microorganismo. Si éste es hecho crecer en sulfato ferroso hay una baja producción de EPS, mientras que al desarrollarse en un medio con pirita se produciría una cantidad trece veces mayor de dichas sustancias, siendo su composición en ambas condiciones diferentes. Así, cuando *Acidithiobacillus ferrooxidans* fue crecida en pirita, la composición másica de las sustancias extracelulares fue de un 48,5% de azúcares, un 39,4% de lípidos, un 5,8% de ácidos grasos libres, un 0,5% de nitrógeno y 0,8% de fósforo (Gehrke *et al.* 1998).

Algunos minerales de azufre reducido pueden ser disueltos en soluciones ácidas o por extracción de electrones con  $\text{Fe}^{+3}$ , siendo estas situaciones favorables para la lixiviación indirecta durante las cuales no es indispensable la adherencia bacteriana a la superficie del sulfuro. Sin embargo, las reacciones interfaciales de la pirita y otros sulfuros son determinadas por la coordinación química del metal, de forma que la extracción del metal no conduce de forma directa a la disolución del mineral de azufre reducido. Lo anterior explica el que la pirita sea muy estable, no siendo fácilmente disuelta por el mecanismo directo. De esta forma, las bacterias deben generar mecanismos especializados para disgregar el mineral con el fin de obtener la energía química que requieren. Así, la lixiviación por contacto se ha desarrollado para romper la estructura cristalina, ya sea por la extracción de azufre en el caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans* o por disolución electroquímica en el de *Leptospirillum ferrooxidans* (Tributsch 2001).

Debido a las necesidades energéticas de los microorganismos y el que en ocasiones no puedan contar con las especies químicas tal como están disponibles en el ambiente natural en que se desarrollan, deben producir un portador energético de naturaleza química para disponer de ellas o incrementar artificialmente la concentración de un agente extractor de electrones ( $\text{Fe}^{+3}$ ) en la superficie del mineral. Para ello, crean una zona de reacción controlada, esto es, una capa de polímeros extracelulares entre la membrana celular y el mineral sulfurado (Tributsch 2001).

Un estudio de biolixiviación de pirita con la bacteria *L. ferrooxidans*, mostró que su capacidad de lixiviación va más allá de la oxidación del ión ferroso a férrico. Las células bacterianas se adhieren al mineral liberando sustancias poliméricas extracelulares, junto con capturar y almacenar en la capa de estos exopolímeros nanopartículas de alta densidad electrónica, es decir, generan una concentración de los iones férrico, los que son almacenados para llevar los electrones hasta un potencial lo suficientemente positivo para inducir la formación electroquímica de tiosulfato y sulfato. Los análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM), de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y las mediciones de energía dispersiva de las mediciones de rayos X y difracción de electrones, establecieron que los agregados de nanopartículas de alta densidad de electrones comprendían pirita con una estequiometría bien definida. Al agregar sólo ión férrico no se produce ningún tipo de corrosión local de la pirita, lo que indica que las reacciones que tienen lugar entre las bacterias adheridas y la superficie de este mineral son responsables de los patrones de lixiviación observados (Rojas-Chapana y Tributsch 2004).

Al estudiar la lixiviación de pirita con *At. ferrooxidans*, se encontró que el mineral sulfurado cristalizado se transformaba en un azufre coloidal. Un transportador de azufre, basado en la cisteína era utilizado para transportarlo a través de éste y así extraer el azufre desde la pirita para formar un polisulfuro, dejando libre azufre elemental en forma coloidal, el que actúa como un reservorio temporal de energía y queda en una cápsula orgánica alrededor de las bacterias (Rojas-Chapana y Tributsch 1995).

Dado que se encontraron orificios en la superficie de los minerales sulfurados, Tributsch concluyó que éstas fueron causadas por la presencia de un reactivo químico producido por las bacterias. Mediante un estudio de la lixiviación de pirita con *Acidithiobacillus ferrooxidans* con la adición de pequeñas cantidades del aminoácido cisteína, encontró que la fase de latencia en el

crecimiento de la bacteria disminuía al mínimo y la tasa de lixiviación del mineral aumentó tres veces en comparación con el proceso normal sin este aditivo. Asimismo, observó que en ausencia del microorganismo y presencia de cisteína, la velocidad de lixiviación es comparable con la alcanzada con bacterias en condiciones normales de lixiviación. Lo anterior se explicaría por el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el que participa en un enlace con la pirita. Los grupos libres -SH de la superficie en la pirita serían la contraparte para la formación del disulfuro correspondiente. Esta reacción tiol-disulfuro implica que la cisteína es consumida por la superficie de la pirita con la consiguiente liberación de especies de hierro y azufre. Las bacterias utilizarían este proceso para producir una corrosión bioquímica del mineral mediante la captación y oxidación de las especies liberadas (Rojas-Chapana y Tributsch 2001).

Se ha demostrado la disolución localizada por acción bacteriana de *At. ferrooxidans* en minerales de azufre reducido, donde por medio de imágenes de microscopía de transmisión óptica se vieron orificios de disolución en el mineral, en lugares donde las bacterias se habían adherido encontrándose ya sea disociados, en pares, en grupos o formando cadenas. Esto mostraba que la bacteria mantiene un estrecho contacto a través de la capa de exopolímeros con la superficie del mineral con el fin de disolverlo. Junto con esto, se observó que la distribución de las bacterias dependía de que la superficie tuviese una estructura cristalina, pues esta presenta enlaces químicos más débiles, así como también de la presencia de líneas de fractura o dislocaciones en el mineral, donde hay una mayor superficie para la interacción química. De esta forma a las bacterias les es más favorable obtener la energía (Bennett y Tributsch 1978).

Con el fin de entender la importancia del mecanismo por contacto en la biolixiviación, se estudió la tasa de disolución de pirita con y sin *Acidithiobacillus ferrooxidans*, encontrándose que bajo las mismas condiciones existían diferencias en dicha velocidad, siendo esta mayor en presencia de las bacterias. Además, la morfología de los patrones de corrosión de la lixiviación microbiana era distinta a la de la lixiviación abiótica (Ndlovu y Monhemius 2005).

Al estudiar la biolixiviación en tres tipos de minerales, calcopirita, pirita y esfalerita, se observó que durante la biolixiviación de estos se desarrollaban tres etapas. Una fase inicial relacionada con una alta adherencia de las bacterias al mineral, lo que es necesario para lograr altas tasas de disolución dada la liberación inicial del ión ferroso por la lixiviación por contacto. Una segunda etapa, donde el número de células libres en la solución aumenta en el tiempo debido a la saturación de bacterias en la superficie del mineral y la presencia del ferroso en la solución. Esto favorece el aumento de bacterias hierro-oxidantes en solución produciendo así un alza en la concentración de ión férrico, el agente oxidante, y por tanto de la velocidad de disolución del mineral. Finalmente, en una tercera etapa se llega a un equilibrio entre las células adheridas y planctónicas, dando lugar al mecanismo cooperativo (Rodríguez *et al.* 2003a).

Junto con lo anterior, se observó que existe una relación entre la adherencia al mineral y la tasa de disolución de éste. Las mayores velocidades de disolución se debían probablemente a una mayor adherencia inicial de las bacterias a los minerales. De esta forma, la adhesión bacteriana a la superficie de la pirita es de gran importancia en la biolixiviación, debido a varios efectos positivos, tales como, la liberación del ión ferroso por lixiviación por contacto y la oxidación de éste y de azufre elemental, los que pueden ser acumulados en la superficie del mineral (Rodríguez *et al.* 2003b).

## 1.9 ESTUDIOS DE BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA

Si bien en las pilas de lixiviación es de interés la calcopirita, debido a que se busca generar la disolución de cobre desde este mineral de baja ley, junto a él se encuentra pirita cuya lixiviación libera energía que permite incrementar la temperatura al interior de las pilas y de esta forma favorecer la disolución de dichos minerales. Asimismo se dan las condiciones propicias para el desarrollo de microorganismos mesófilos y termófilos moderados, todo lo anterior lleva a lograr una mayor tasa de disolución de la calcopirita.

Estudios de biolixiviación a las temperaturas de 30°C, 50°C y 68°C, utilizando tres consorcios de bacterias adaptadas a dichas temperaturas, muestran que la pirita se lixivió más lentamente que otros minerales sulfurados. Sin embargo, en el caso de la calcopirita, se vio que ésta se lixiviaba sólo en presencia de microorganismos termófilos extremos, lo cual se debe a una interacción favorable entre la cinética de reacción, el potencial de la solución y el fenómeno de pasivación de este mineral (Petersen y Dixon 2002).

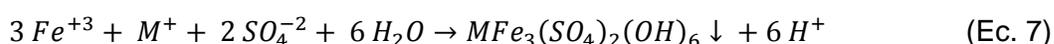
En cuanto a los mecanismos de biolixiviación de pirita, se ha estudiado la acción indirecta de las bacterias mediante la regeneración del ión férrico y el ataque directo de las bacterias adheridas a la superficie del mineral. La tasa de disolución y la extracción final obtenida, muestran que estas tienen una directa relación con la concentración del ión férrico en la solución. Dicha disolución y generación del  $\text{Fe}^{+3}$  se dio más rápida con microorganismos mesófilos que con termófilos. Sin embargo, los rendimientos de los termófilos en cuanto a la concentración de férrico y extracción final muestran que son mayores que con mesófilos, lo que es dado en parte por las mayores temperaturas usadas en el proceso. Estos resultados confirman que el mecanismo de lixiviación directo también tiene una importante contribución en la disolución del mineral. Asimismo, la oxidación de pirita ayuda a favorecer el desarrollo de microorganismos termófilos, aumentando así considerablemente la disolución de la calcopirita (Rodríguez *et al.* 2003a, Rodríguez *et al.* 2003b).

La biolixiviación de la pirita es notablemente afectada por el estado de oxidación del hierro disuelto, donde la razón ferroso/férrico controla la velocidad de las reacciones de oxidación en el proceso. Además, la disolución de la pirita es controlada por la quimisorción competitiva entre  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  en la superficie del mineral, donde la acumulación de iones ferroso produce barreras difusionales para el ataque del férrico, produciendo un aumento en la concentración de este en la solución, inhibiendo así la capacidad oxidativa microbiana para concentraciones mayores a 16 g/L. Junto con lo anterior, existe una relación entre la tasa de adhesión al mineral y la de disolución de minerales, donde se requiere una alta adherencia inicial para obtener altas tasas de disolución durante el proceso de biolixiviación, esto se explica por la liberación del ferroso a partir del mecanismo por contacto y la rápida oxidación del  $\text{Fe}^{+2}$  acumulado en la superficie por parte de los microorganismos adheridos. Los resultados obtenidos indican que la estrategia de biolixiviación de pirita estaría dada por el mecanismo cooperativo (Rodríguez *et al.* 2003b).

## 1.10 PRECIPITACIÓN DEL IÓN FÉRRICO

El ión férrico es fundamental en la lixiviación y biolixiviación al ser el agente oxidante de los minerales de azufre reducido, tales como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ). Los microorganismos presentes en los procesos de lixiviación permiten la regeneración del ión férrico por medio de la oxidación del ferroso, de tal manera que esté disponible para la lixiviación de los minerales sulfurados. Sin embargo, la oxidación del ión ferroso consume protones, lo que puede llevar a un aumento en el pH y la consecuente precipitación del ión férrico. Así, dicho ión se convierte en un agente perjudicial debido a que su precipitación descontrolada forma barreras difusionales que impiden el contacto directo entre este agente lixivante y el sólido afectando negativamente la disolución biológica del mineral (Ballester 2005).

En equipos de lixiviación industriales se ha reportado la precipitación de ión férrico como hidróxido ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), óxido ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), goetita ( $\text{FeOOH}$ ) y jarositas ( $\text{MFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ), estas últimas formadas mediante la siguiente reacción general (Paipa 2004):



Donde  $\text{M}^+$  puede corresponder a uno de los siguientes cationes:



dando origen a las jarositas de hidronio, de potasio, natrojarosita, amoniojarosita, argentojarosita o plumbojarosita, respectivamente.

Las jarositas formadas a partir del ión férrico precipitan cubriendo la superficie de los minerales, lo cual genera barreras difusionales que retardan o impiden la disolución de los minerales y con ello la recuperación de los metales de interés, tales como el cobre. Junto con lo anterior, la formación de dichos precipitados de jarosita en los sistemas de biolixiviación causa la disminución del pH debido a la liberación de protones, a la vez que atrapa nutrientes desde la solución de lixiviación tales como el  $\text{K}^+$  o  $\text{NH}_4^+$ , los que son indispensables para el crecimiento de los microorganismos, reduciendo así la actividad bacteriana en el proceso (Paipa 2004, Jian-nan *et al.* 2007).

En cuanto a los mecanismos de precipitación de las jarositas, se tiene que el primer paso sería la formación de productos de hidrólisis de bajo peso molecular, tales como  $\text{FeOH}^{+2}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$  y  $\text{Fe}_2(\text{OH})_4^{+2}$ . Le seguiría la formación de iones complejos hidroxilos con una razón  $\text{OH}^-/\text{Fe}^{+3}$  creciente con el envejecimiento del polímero, proceso que es más rápido con el incremento de la temperatura. En los sistemas de biolixiviación, la precipitación de hierro es el resultado de la acción conjunta de la bio-oxidación del sulfato ferroso y del consumo de protones por parte de las bacterias, lo que favorece las reacciones de hidrólisis, así como también la formación de hidróxido férrico, el que se ha postulado como un intermediario en la formación de jarositas. Sin embargo, éstas se pueden formar en un rango de pH entre 1 y 3, por lo que los precursores no serían necesariamente especies hidroxiladas de hierro, pues éstas son predominantes a valores de pH mayores que 3 (Paipa 2004).

Al estudiar la formación de schwertmanita ( $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6(\text{SO}_4)$ ), un oxihidróxisulfato de hierro subproducto de la oxidación de minerales sulfurados como la pirita, en el sistema ácido sulfúrico con sulfato férrico a  $70^\circ\text{C}$ , se obtuvo que a pH inicial entre 1,6 y 1,8, el único precipitado obtenido era jarosita de hidronio; mientras que a pH entre 1,8 y 1,9 se formó una mezcla de jarosita de hidronio y goetita, y a pH sobre 1,9 el precipitado obtenido durante las primeras diez horas fue schwertmanita, la que se transformó a goetita luego de las veinte y cinco horas. De esta forma la schwertmanita sería un precipitado férrico intermediario, meta-estable, que eventualmente se transformaría a goetita a temperatura ambiente, o a jarosita, hematita y/o hidroxisulfato férrico en condiciones de temperatura y ambiente particulares. En presencia del ión potasio la schwertmanita se transforma en jarosita de potasio, y a pH menores a 1,8 se favorece la formación de jarosita de potasio y su precipitación frente a la de schwertmanita, mientras que en presencia de iones potasio, amonio y sodio, el orden de precipitación sería:  $\text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+$  (Paipa 2004).

La precipitación del hierro está controlada por factores cinéticos y termodinámicos que influyen tanto en la distribución y concentración de las especies presentes en la solución, como en los compuestos sólidos que se forman. En sistemas de lixiviación de calcopirita con sulfato férrico se han obtenido modelos de equilibrio parcial para caracterizar la precipitación de ión férrico, encontrando las variables principales que influyen en el proceso y lograron ajustarlas para minimizar los problemas de precipitación. Sin embargo, se hace difícil evitar la precipitación de jarositas, debido a que desde muy bajas concentraciones de  $\text{Pb}^{2+}$  o cationes monovalentes como el  $\text{K}^+$  se generan los precipitados de jarosita, los que gradualmente causan la reducción de la permeabilidad del botadero o pila de lixiviación, junto con cambiar los tiempos de residencia y parámetros del flujo de líquido lixivante. Dicho problema se hace aún mayor si son altas las concentraciones de sulfato férrico o ferroso en solución (Liddel y Bautista 1983, Paipa 2004).

Investigaciones sobre las condiciones de formación de la jarosita de potasio indican que ésta se forma en un medio con bajo pH y altas concentraciones de sulfato férrico en un rango de temperatura estudiado entre los  $25^\circ\text{C}$  y  $200^\circ\text{C}$  y de pH entre 1 y 3. Mientras que a un mayor pH, concentraciones bajas de férrico y altas temperaturas se genera hematita, y a pH mayor pero temperaturas más bajas, goetita (Babcan 1971).

Mediante el uso de espectroscopia Raman, se estableció que durante la oxidación de pirita con una alta concentración de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se forma predominantemente amoniojarosita, mientras que en controles estériles se formó principalmente potasiojarosita, aunque en menores cantidades. Lo anterior se debe probablemente a las grandes cantidades de precursores de jarosita formados por la oxidación bacteriana del ión ferroso, lo que agota el potasio disponible para luego comenzar la formación de amoniojarosita (Sasaki 1997).

Junto con lo anterior, un estudio realizado sobre la caracterización de argentojarosita formada por iones  $\text{Fe}^{+3}$  oxidados biológicamente, indica que existieron diferencias morfológicas entre los productos precipitados mediante procesos químicos y biológicos, sin encontrar diferencias significativas en las composiciones químicas o patrones de difracción de rayos X, lo cual indicaba que probablemente las sustancias extracelulares (EPL) secretadas por las bacterias tienen un rol importante en la nucleación y crecimiento de los cristales de la jarosita

formada. Lo anterior fue ratificado al observar que tanto la adherencia celular, como la de partículas de jarosita en la superficie del mineral aumentan en presencia de polisacáridos (Sasaki *et al.* 1995, Sadowski 1999, Sasaki y Konno 2000).

En cuanto a los factores que afectan la precipitación de jarositas de potasio en medios con sulfato, se vio que ésta aumenta rápidamente con la temperatura entre los 60°C y 100°C aproximadamente, para luego mantenerse relativamente constante. Asimismo, se ve un alza en la velocidad de precipitación con la concentración de ión férrico y la presencia de semillas de jarosita de potasio, llegando en pocas horas a cantidades cercanas a las máximas. Si bien en los casos anteriores hay cambios en las cantidades de precipitado, sus características se mantienen similares, mientras que al incrementar la concentración de  $K_2SO_4$ , varían tanto la cantidad como la composición de los precipitados, y en exceso de iones férrico precipita casi la totalidad del potasio. Junto con lo anterior, se encontró que con el incremento de la concentración de ácido y de esta forma una disminución del pH del medio, se disminuye la precipitación (Dutrizac 2008).

Estudios sobre el efecto de semillas que actuarían como centros de cristalización, indican que la presencia de núcleos de jarositas aumenta la tasa inicial de precipitación de las jarositas de amonio y potasio, de forma lineal a la cantidad de dichas semillas y se extendería el rango de precipitación a menores valores de pH y temperatura que en ausencia de estos núcleos de precipitación, junto con eliminarse el período de inducción. Además, la presencia de semillas de sodiojarosita llevaría a que su velocidad de precipitación sea prácticamente independiente de la concentración de ión férrico (Dutrizac 1996).

Asimismo, al estudiar el efecto de la presencia de perlas de vidrio en un cultivo con *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, se encontraron diferencias considerables en la tasa de oxidación de ferroso, la formación de jarositas y la población bacteriana en dos grupos de cultivo, con y sin perlas. El grupo con estos centros de cristalización tuvo una velocidad de oxidación de ión ferroso seis horas más rápida y una precipitación 78% mayor, así como también, una menor densidad poblacional que el grupo sin dichas semillas. Los análisis de difracción de rayos X (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectro por energía dispersiva (EDS) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), indicaron que los precipitados originados por los dos grupos son una mezcla de jarositas de potasio y amoniojarositas, con características morfológicas similares. Junto con lo anterior, se encontró que una gran parte de los precipitados de jarosita se depositaron en la superficie de las perlas de vidrio, consumiendo gran cantidad de  $NH_4^+$  o  $K^+$  y registrándose una fuerte caída del pH. Por otro lado, algunas bacterias planctónicas fueron absorbidas o atrapadas en las partículas de precipitado, lo que explicaba la menor densidad poblacional registrada en los grupos con semillas que en los que no las tenían (Jian-nan *et al.* 2007).

## 1.11 MOTIVACIÓN

Dada la importancia económica de la producción de cobre en Chile es necesario mantener los niveles de producción de este metal. No obstante, esto se ve dificultado por el agotamiento de los minerales de más alta ley. Lo anterior ha motivado el desarrollo de la lixiviación de minerales de baja ley, como lo es la calcopirita, por medio de la catálisis biológica (Rodríguez *et al.* 2001).

En los yacimientos es posible encontrar de forma natural pirita asociada a calcopirita, donde la primera genera calor al interior de las pilas de lixiviación debido a que su oxidación es exotérmica, lo que impulsa el desarrollo de microorganismos termófilos que contribuyen a aumentar las tasas de lixiviación de la calcopirita, evitando de esta forma el uso de otras alternativas para el aumento de la temperatura, que conllevarían a mayores costos en el proceso (Petersen y Dixon 2002).

Dentro de los microorganismos lixiviantes de pirita se encuentra la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus*, la cual es acidófila y presenta una temperatura óptima de crecimiento entre 45°C y 50°C. Si bien, se han llevado a cabo estudios sobre las características de dicha bacteria, las publicaciones hacen referencia a su morfología y condiciones de desarrollo, tales como nutrientes, temperatura, potencial electroquímico y pH de la solución de lixiviación propicios para su actividad (Bridget y Johnson 1998, Collari 2011, Norris *et al.* 1996, Yahya y Johnson 2002). Sin embargo, en la actualidad existe escaso conocimiento sobre su comportamiento en el proceso de biolixiviación de pirita, referente a su capacidad hierro-oxidante y de adherencia a dicho mineral, su mecanismo de biolixiviación y su aporte catalítico en la disolución de la pirita.

Por tanto, se hace necesario llevar a cabo una mayor investigación sobre este microorganismo, caracterizando su comportamiento en el proceso de biolixiviación de pirita, para de esta forma aportar en el conocimiento de la tecnología de biolixiviación.

## 2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de título consiste en realizar un estudio del comportamiento de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de pirita.

Debido a que un alto porcentaje de los ingresos económicos de Chile dependen de la actividad cuprífera, todo desarrollo o conocimiento relacionado con dicha área son de gran relevancia, y aún más aquellas implicadas con la lixiviación biológica dado sus menores costos. No obstante, es fundamental hacer de dicha técnica un proceso más eficiente, tanto en la recuperación de cobre como en los costos implicados en su uso.

Diversos antecedentes bibliográficos señalan el positivo efecto del aumento de la temperatura en la tasa de lixiviación tanto química como biológica de minerales, donde la primera se debe a un aumento en las constantes de cinética de reacción dada por la ecuación de Arrhenius (Elberling 2005) y la segunda, a un incremento de la disolución de minerales de azufre reducidos difíciles de lixiviar químicamente, los que son disueltos por mecanismos desarrollados por microorganismos autótrofos extremófilos, y que se desarrollan en ambientes con estos minerales (Rodríguez *et al.* 2003b). Sin embargo, el aumento de la temperatura en las pilas de lixiviación conlleva a mayores costos en el proceso, es ahí donde el estudio de la lixiviación de pirita toma importancia debido a que su oxidación es exotérmica y se encuentra en yacimientos naturales asociados a calcopirita, contribuyendo de esta forma a mejorar la lixiviación de este mineral, y por tanto aumentando la recuperación de cobre (Pradhan 2008).

Bajo este contexto, se busca generar un mayor conocimiento sobre la biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C. Para lo anterior, se realizan estudios de la disolución de dicho mineral con un cultivo puro de la bacteria en matraces agitados, donde es monitoreado el potencial redox, el pH (el que en caso de subir debe ser ajustado a 1,6 de forma de evitar la formación de precipitados de hierro, los que pueden perjudicar la disolución del mineral), las concentraciones de ión ferroso, hierro total y sulfato, junto con realizar recuento de las células planctónicas y las adheridas a pirita, para de esta forma evaluar el mecanismo de biolixiviación más relevante.

# 3 OBJETIVOS

## 3.1 OBJETIVOS GENERALES

El principal objetivo del presente trabajo de título es caracterizar el comportamiento de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de pirita, para lo cual se tienen como objetivos específicos los indicados a continuación.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del presente trabajo de título son:

- Caracterizar el comportamiento de un cultivo puro de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C en pirita.
- Determinar la adherencia de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* a la pirita.
- Obtener a partir de los datos anteriores el mecanismo de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus*.
- Comparar el comportamiento de *Sulfobacillus acidophilus* con el de la bacteria mesófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* en pirita a 30°C, determinada en estudios anteriores.

## 3.3 ALCANCES

Mediante el presente trabajo de título se busca generar un mayor conocimiento sobre el comportamiento de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de pirita y el mecanismo utilizado para ello, usando cultivos puros de ésta y pirita como mineral.

Para lo anterior, será medida la cantidad de hierro total disuelto, el cual depende de la presencia de los iones ferroso y férrico. Sin embargo, se debe considerar que a altas temperaturas y valores de pH sobre 1,0 se pueden formar precipitados de ión férrico como hidróxidos o jarositas. Así, junto con verse disminuida la concentración de este ión, se produce su precipitación. Lo anterior, genera barreras para el ataque del férrico al mineral y de esta forma se ve perjudicada la capacidad lixivante de los microorganismos (Rodríguez *et al.* 2003b, Pradhan 2008).

Como se mencionó en los antecedentes, un estudio de biolixiviación de pirita a 45°C con la bacteria *Sulfobacillus acidophilus*, muestran que para valores de potencial redox menores a

0,65 (V v/s SHE) la velocidad de oxidación bacteriana depende sólo de la concentración del ion ferroso y que a potenciales mayores a 0,65 (V v/s SHE) dicha actividad oxidativa es fuertemente inhibida al aumentar la concentración de ion férrico y disminuir la del ferroso. Es por lo anterior, que la concentración del ión ferroso inicial y durante el proceso de biolixiviación puede ser determinante en la oxidación bacteriana de la muestra.

Cabe destacar que para estudiar la adherencia de las bacterias sobre la superficie de la pirita, se requerirán diversos cultivos en las mismas condiciones, uno para cada medición y su duplicado, es por ello que se asumirá que todos los cultivos se comportan de forma similar para poder analizar los resultados obtenidos, como si se tratase de un único cultivo y su duplicado.

Finalmente se debe considerar que el estudio se realiza a escala de laboratorio con un cultivo puro de *Sulfobacillus acidophilus* y no representa de forma exacta lo que puede ocurrir en una pila de lixiviación, donde existe una gran diversidad de microorganismos.

## 4 METODOLOGÍA

Para el estudio de la biolixiviación de pirita se realizaron cultivos puros con la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* y experimentos controles sin microorganismos, ambos en matraces agitados a 100 rpm y una temperatura de 45°C, siendo monitoreados periódicamente el pH y Eh. Asimismo, se midieron las concentraciones de ión ferroso y hierro total en solución, se determinó la concentración del ión férrico precipitado como hidróxidos o jarositas y se estimó el azufre disuelto por medio de la medición de sulfato en la solución de lixiviación. Junto con lo anterior, se evaluó la adherencia del microorganismo a la pirita y se realizó recuento de las células adheridas al mineral y en solución durante el proceso. A continuación se detallan las metodologías utilizadas.

### 4.1 MATERIALES Y EQUIPOS

La muestra de pirita utilizada en todos los experimentos realizados proviene de relaves de Minera Escondida, operada por BHP Billiton en la II Región de Antofagasta, Chile. Esta fue purificada mediante flotación llegando a una muestra con un contenido de hierro del 43,8% p/p. Por medio de un estudio de granulometría realizado en mallas Tyler, se identificó que aproximadamente el 90% de la muestra de pirita se encontraba entre -140/+450 mallas, de esta forma el diámetro de partícula se encuentra entre 0,105 y 0,032 mm.

Los cultivos fueron inoculados con una cepa pura de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* DSMZ 10332, la que es mantenida en el laboratorio de Biohidrometalurgia de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile. A continuación se indican los equipos requeridos para las mediciones realizadas.

- Incubación de los cultivos y experimentos control: Shaker con una agitación de 100 rpm y una temperatura de 45°C.
- Medición de pH: Equipo marca Corning, modelo 340 con electrodo de Ag/AgCl.
- Medición del potencial electroquímico: Equipo marca Hanna Instruments, modelo 211 con electrodo de Ag/AgCl.
- Determinación de las concentraciones de hierro y sulfato: Equipo de espectrofotometría UV-visible, marca Agilen, modelo 8453, equipado con una lámpara de Tungsteno.
- Recuento de bacterias, para determinación de adherencia de la bacteria al mineral: Microscopio, marca Nikon, modelo Labophot, equipado con filtro de contraste de fase y aumento ocular de 10X y objetivo de 40X. Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,02 mm de profundidad.
- Recuento de bacterias planctónicas y adheridas: Microscopio de Epifluorecencia, marca Zeiss, equipado con los filtros de 365 y 546 nm. Cámara fotográfica, marca Nikon, modelo Coolpix 4500 de 4 megapixeles.

## 4.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Los experimentos control y los de biolixiviación de pirita con *Sulfobacillus acidophilus* se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizados, los que una vez que se les agregó la muestra de pirita, el medio de cultivo basal, el inóculo de la bacteria (en el caso de los cultivos) y los nutrientes que ésta requiere, fueron colocados en un agitador orbital a 100 rpm y una temperatura de 45°C. Los componentes tanto de los cultivos como de los experimentos control, fueron previamente esterilizados y manejados bajo condiciones estériles para garantizar que no se contaminaran con otros microorganismos.

Se prepararon doce frascos de cultivos con las bacterias, esto debido a que serían monitoreados dos veces por semana, durante tres semanas, y era necesario retirar un cultivo y su duplicado para las mediciones de bacterias planctónicas, bacterias adheridas y hierro total incluido el precipitado. Los experimentos control, también se realizaron en duplicado usando sólo dos matraces para ello, ya que no era necesario retirarlos para realizar las mediciones pertinentes.

Una vez iniciados los experimentos, se midió dentro de las primeras 17 horas el pH de los cultivos y ajustó a 1,6 con  $H_2SO_4$ , para de esta forma evitar o disminuir la precipitación del ión férrico como hidróxidos o jarositas.

Ambos experimentos fueron monitoreados periódicamente. En el caso de los cultivos con el microorganismo, se midió para cada uno de los frascos el pH, Eh, concentración de ión ferroso y hierro total en solución, para lo cual se tomaron 2 ml de muestra de la solución. En los experimentos control fueron sacados 4 ml de muestra, esto para hacer las mediciones antes mencionadas junto con la determinación de la concentración de sulfato. Adicionalmente, dos veces por semana eran retirados un matraz y su duplicado para realizar las mediciones de sulfato de ambas muestras, uno de estos era usado para la medición de hierro total en solución y el precipitado en el mineral, mientras que del segundo se obtenía la muestra para determinar las bacterias en solución y las que se encontraban adheridas al mineral.

### 4.2.1 CULTIVOS DE BACTERIAS EN PIRITA CON IÓN FERROSO

#### **Materiales y Equipos:**

- 12 Matraces de 250 ml, esterilizados por calor.
- 60 ml de Inóculo puro de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* DSMZ 10332, previamente ambientada a la pirita utilizada en el estudio.
- 6 g de Mineral de Pirita.
- 1,2 L de Medio de Cultivo Basal (0,4 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,4 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0,056 g/L de  $KH_2PO_4$ ) a pH 1,6, esterilizado por calor.
- 18 ml de Solución de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  al 33% p/v, esterilizada por filtración.

- 24 ml de Solución de Extracto de Levadura al 1% p/v, esterilizada por filtración.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 45°C.

Los doce cultivos son realizados en presencia de ion ferroso inicial a una concentración de 1g/L y poseen la siguiente composición:

- 91,5 ml de medio de cultivo basal (MC) con un pH 1,6 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 0,5 g del mineral pirita, equivalente a una concentración de 0,5% p/v.
- 1,5 ml de solución de FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O al 33% p/v, equivalente a 1 g/L de ión ferroso en el cultivo.
- 2 ml de solución de extracto de levadura al 1% p/v.
- 5 ml de inóculo de bacteria, de concentración aproximada 5,6\*10<sup>7</sup> bacterias/ml.

## 4.2.2 EXPERIMENTOS CONTROL EN PIRITA CON IÓN FERROSO

### **Materiales y Equipos:**

- 2 Matraces de 250 ml, esterilizados por calor.
- 1 g de Mineral de Pirita.
- 183 ml de Medio de Cultivo Basal (0,4 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 g/L de MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O y 0,056 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 1,6, esterilizado por calor.
- 10 ml de timol en metanol al 2% p/v.
- 3 ml de Solución de FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O al 33% p/v, esterilizada por filtración.
- 4 ml de Solución de Extracto de Levadura al 1% p/v, esterilizada por filtración.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 45°C.

Los dos cultivos control son realizados de igual forma que los cultivos de biolixiviación, pero sin agregarles inóculo de la bacteria y poseen la siguiente composición:

- 91,5 ml de medio de cultivo basal (MC) a pH 1,6 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 0,5 g del mineral pirita, equivalente a una concentración de 0,5% p/v.
- 1,5 ml de solución de FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O al 33% p/v, equivalente a 1 g/L de ión ferroso.
- 2 ml de solución de extracto de levadura al 1% p/v.
- 5 ml de timol en metanol al 2% p/v, para evitar el posible desarrollo de microorganismos que se encuentren naturalmente en el mineral.

## 4.3 ANÁLISIS QUÍMICOS

### 4.3.1 DETERMINACIÓN DEL HIERRO EN SOLUCIÓN POR EL MÉTODO DE LA ORTOFENANTROLINA

#### **Materiales y Equipos:**

- Fluoruro de sodio (NaF) concentración 0,5 M.
- Hidroxilamina al 10%.
- O-fenantrolina con una concentración de 10 g/L.
- Medio de cultivo basal (MC) a pH 1,6.
- Agua destilada.
- Espectrofotómetro UV-visible, marca Agilen, modelo 8453.

Para determinar el hierro disuelto en solución se utilizó el método de la ortofenantrolina detallado a continuación (Muir y Anderson 1997).

#### **4.3.1.1 Determinación de la Concentración de Hierro Total.**

- Diluir la muestra hasta llegar a una concentración menor a 100 ppm.
- Tomar 100  $\mu$ l de la muestra diluida.
- Agregar 100  $\mu$ l de hidroxilamina. Agitar.
- Agregar 400  $\mu$ l de orto-fenantrolina. Agitar.
- Agregar 1,9 ml de agua destilada. Agitar.
- Medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 510 nm contra blanco.

#### **4.3.1.2 Determinación de la Concentración de ión Ferroso.**

- Diluir la muestra hasta llegar a una concentración menor a 100 ppm.
- Tomar 100  $\mu$ l de la muestra diluida.
- Agregar 400  $\mu$ l de orto-fenantrolina. Agitar.
- Agregar 2 ml de agua destilada. Agitar.
- Medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 510 nm contra blanco.

#### **4.3.1.3 Determinación de la Concentración de ión Ferroso en Presencia de Alta Concentración de ión Férrico.**

- Tomar 100  $\mu$ l de la muestra directa (sin diluir).
- Agregar 1 ml de solución de NaF 0,5 M. Agitar.

- Agregar 400 µl de solución de orto-fenantrolina. Agitar.
- Agregar 1 ml de agua destilada. Agitar.
- Medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 510 nm contra blanco.
- Aplicar factor de dilución 25 para obtener el valor de la concentración de hierro total.

### 4.3.2 DETERMINACIÓN DEL HIERRO TOTAL EN SOLUCIÓN Y EL PRECIPITADO POR MEDIO DE DIGESTIÓN CON ÁCIDO CLORHÍDRICO.

#### **Materiales y Equipos:**

- Ácido clorhídrico (HCl) concentración 5 N.
- Fluoruro de sodio (NaF) concentración 0,5 M.
- Hidroxilamina al 10%.
- O-fenantrolina con una concentración de 10 g/L.
- Medio de cultivo basal (MC) a pH 1,6.
- Agua destilada.
- Papel filtro con tamaño de poro de 20 µm.
- Espectrofotómetro UV-visible, marca Agilen, modelo 8453.

Para medir el hierro total disuelto desde la pirita, esto es, el que se encuentra como ión ferroso, férrico y el precipitado, es necesario disolver los precipitados de hierro como hidróxidos o jarositas, para ello se realizan los tratamientos a la solución y al mineral indicados a continuación (Lindström *et al.* 1992).

#### 4.3.2.1 Tratamiento de la Solución

- Tomar 2 ml de muestra de la solución dentro del matraz.
- Llevar a 20 ml de volumen final con HCl 5 N.
- Incubar a 60°C por 30 minutos con agitación. Enfriar.
- Medir hierro total por medio del método de la orto-fenantrolina indicado en la sección 4.3.1.1.

#### 4.3.2.2 Tratamiento de la Pirita

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

- Medir hierro total según el método de la orto-fenantrolina indicado en la sección 4.3.1.1.

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

$$Fe_{tot} = \frac{Fe_{solución} * V + Fe_{pirita} * 100 \text{ ml}}{V} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde V corresponde al volumen en ml del matraz en el cual se realizó el ensayo, correspondiente a 100 ml.

### 4.3.3 DETERMINACIÓN DE SULFATO EN SOLUCIÓN POR TURBIDIMETRÍA

#### **Materiales y Equipos:**

- BaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Cloruro de sodio (NaCl) 240 g/L en solución de HCl al 0,3%.
- Hidróxido de potasio KOH al 10% p/v.
- Glicerina 1:1 con agua desionizada.
- Agua desionizada.
- Papel filtro de tamaño de poro de 20 µm.
- Espectrofotómetro UV-visible, marca Agilen, modelo 8453.

#### 4.3.3.1 Eliminación del Hierro en Solución

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

#### 4.3.3.2 Medición del Sulfato

- En un matraz aforado de 50 ml agregar 2 ml de muestra tratada anteriormente.
- Agregar 5 ml de glicerina 1:1. Agitar.
- Agregar 2,5 ml de NaCl 240 g/L. Agitar.
- Aforar a 50 ml con agua desionizada. Agitar.
- Agregar 0,15 g de BaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Agitar durante 1 min y dejar reposar por 1 min.
- Medir concentración en espectrofotómetro UV-visible a 500 nm contra blanco.

## 4.4 ANÁLISIS BIOLÓGICOS

### 4.4.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA BACTERIANA AL MINERAL

#### **Materiales y Equipos:**

- 2 Matraces de 50 ml.
- 6 ml de Inóculo puro de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* DSMZ 10332, previamente ambientada a la pirita utilizada en el estudio.
- 0,5 g de Pirita.
- 34 ml de Medio de cultivo basal (0,4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,4 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,056 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 1,6.
- Shaker a una agitación de 100 rpm y calefaccionado a 45°C.
- Microscopio de contraste de fases, marca Nikon, modelo Labophot.
- Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,2 mm de profundidad.

Con el fin de determinar la capacidad de adherencia de las bacterias *Sulfobacillus acidophilus* a la pirita, se realizó un experimento en duplicado utilizando para ello dos matraces de 50 ml, a cada uno de estos se les agregó 0,25 g de pirita, 17 ml de medio de cultivo basal a pH 1,6 y 3 ml de un concentrado de bacterias. Una vez agregado el inóculo de bacterias se agitaron los matraces y se extrajeron 20  $\mu\text{l}$  de cada uno para determinar la concentración inicial de bacterias en solución. Inmediatamente después de sacadas dichas muestras, se llevaron los matraces al shaker a 45°C, donde se mantuvieron hasta el final de la experiencia.

Se sacaron 20  $\mu\text{l}$  de cada uno de los matraces inmediatamente posterior a la inoculación, es decir en el tiempo cero, y cada 15 minutos hasta completar una hora, luego cada 30 minutos hasta completar las dos horas. Dichas muestras fueron utilizadas para realizar recuento directo de las bacterias en solución y de esta forma determinar el porcentaje de bacterias que se adhirió al mineral dentro de las primeras dos horas, correspondiente a la diferencia de concentración de bacterias planctónicas iniciales y la de un determinado tiempo.

#### 4.4.1.1 Recuento Directo de Bacterias

- Tomar 8  $\mu\text{l}$  de la muestra.
- Colocar la muestra sobre una cámara Petroff-Hausser de 0,02 mm de profundidad.
- Ubicar la cámara de recuento para ser observada en microscopio con aumento ocular de 10x y objetivo 40x.

- Contar las células presentes en cada cuadro de la cámara, en al menos cinco cuadros, si hay baja densidad celular se cuenta en los cuadrados grandes y si hay alta densidad celular en los pequeños.
- Se promedia el número de células por el número de cuadros en que se realizó el conteo y se multiplica este valor por  $1,25 \times 10^6$  o  $2,00 \times 10^7$ , según se haya realizado el conteo en cuadros grandes o pequeños respectivamente.
- El valor obtenido corresponde a la concentración aproximada en células/ml en la muestra.

#### 4.4.2 RECuento DE BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ADHERIDAS AL MINERAL MEDIANTE TINCIÓN CON DAPI

##### **Materiales y Equipos:**

- Cultivos de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus*.
- Formaldehído al 37%.
- Reactivo DAPI de concentración 1 µg/ml.
- Reactivo Mountaint (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes de PBS 1x y DAPI a una concentración final de 1 µg/ml).
- Aceite de cedro.
- Filtro de policarbonato con tamaño de poro de 0,22 µm.
- Papel filtro.
- Placas Petri.
- Portaobjeto.
- Cubreobjeto.
- Microscopio de Epifluorescencia, marca Zeiss, equipado con filtros de 365 y 546 nm.
- Cámara fotográfica, marca Nikon, modelo Coopix 4500 de 4 megapíxeles.

##### 4.4.2.1 Traspaso de las Células desde la Suspensión a un Soporte

El traspaso de las células suspendidas en la solución a un soporte se realizó utilizando una muestra directa y una muestra con dilución 10x. El procedimiento realizado se indica a continuación (Pernthaler *et al.* 2002).

- Para la muestra directa fijar las células de 5 ml de la suspensión del cultivo de biolixiviación con formaldehído al 4% por 1 hora en hielo.
- Para la muestra diluida tomar 0,5 ml de la solución del cultivo de biolixiviación, agregar 4,5 ml de MC y agitar.
- Fijar la muestra diluida de la suspensión con formaldehído al 4% por 1 hora en hielo.
- Descongelar las muestras fijadas.
- Filtrar las muestras en membranas de policarbonato.

- Guardar las muestras en placas Petri en un congelador, hasta ser analizadas por tinción DAPI.

#### **4.4.2.2 Traspaso de las Células desde el Mineral a un Soporte**

El traspaso de las células adheridas al mineral a un soporte se realizó siguiendo el siguiente procedimiento (Pernthaler *et al.* 2002).

- Recuperar el mineral del matraz a analizar, usando para ello el papel filtro.
- Lavar el mineral 5 veces con el medio de cultivo basal.
- Incubar el mineral en 5 ml de PBS 1x con formaldehído al 4% por 1 hora en hielo.
- Descongelar la muestra del mineral.
- Recuperar el mineral y guardar en una placa Petri en el congelador, hasta ser analizadas por tinción con DAPI.

#### **4.4.2.3 Recuento Celular por Tinción con DAPI**

Para realizar el recuento celular por medio de tinción con DAPI se utilizó el siguiente procedimiento (Pernthaler *et al.* 2002).

- Cortar las membranas de policarbonato en que fueron traspasadas las células, tres cuadros de 1x1 cm aproximadamente, y ubicarlos dentro de una nueva placa Petri.
- Sacar parte del mineral donde fueron fijadas las bacterias adheridas de cada muestra y colocar en una nueva placa Petri.
- Teñir las muestras con el reactivo DAPI de concentración 1 µg/ml.
- Colocar la muestra de la membrana de policarbonato o de mineral, al que fue agregado el reactivo DAPI, sobre el portaobjeto.
- Cubrir la sección de filtro o mineral con reactivo Mountaint.
- Colocar un cubreobjeto sobre el filtro o mineral, y agregar sobre este una gota de aceite de cedro.
- Evaluar la sección de filtro o de mineral, utilizando un microscopio de Epifluorescencia con un aumento de 1000x (objetivo 100x y ocular de 10x) y filtro de luz UV con una longitud de onda de 365 nm.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS* A LA PIRITA

La capacidad de adherencia de *Sulfobacillus acidophilus* sobre pirita a 45°C es evaluada por medio del número de dichas bacterias que permanece libre en solución durante las primeras dos horas. Así las bacterias adheridas a la superficie del mineral, corresponden a la diferencia de las totales en la solución entre el tiempo cero y las contabilizadas en un determinado instante.

Como se muestra en el Gráfico 1, el número inicial de bacterias planctónicas totales fue de  $1,7 \times 10^9$ , el cual durante los primeros 45 minutos decayó considerablemente hasta  $8,3 \times 10^8$ , alcanzando así una adherencia del 51%. Posteriormente, es posible notar una disminución en la tasa de adherencia bacteriana, llegando a contabilizarse a las dos horas  $4,7 \times 10^8$  bacterias totales libres en solución, lográndose por consiguiente una adherencia del 72%.

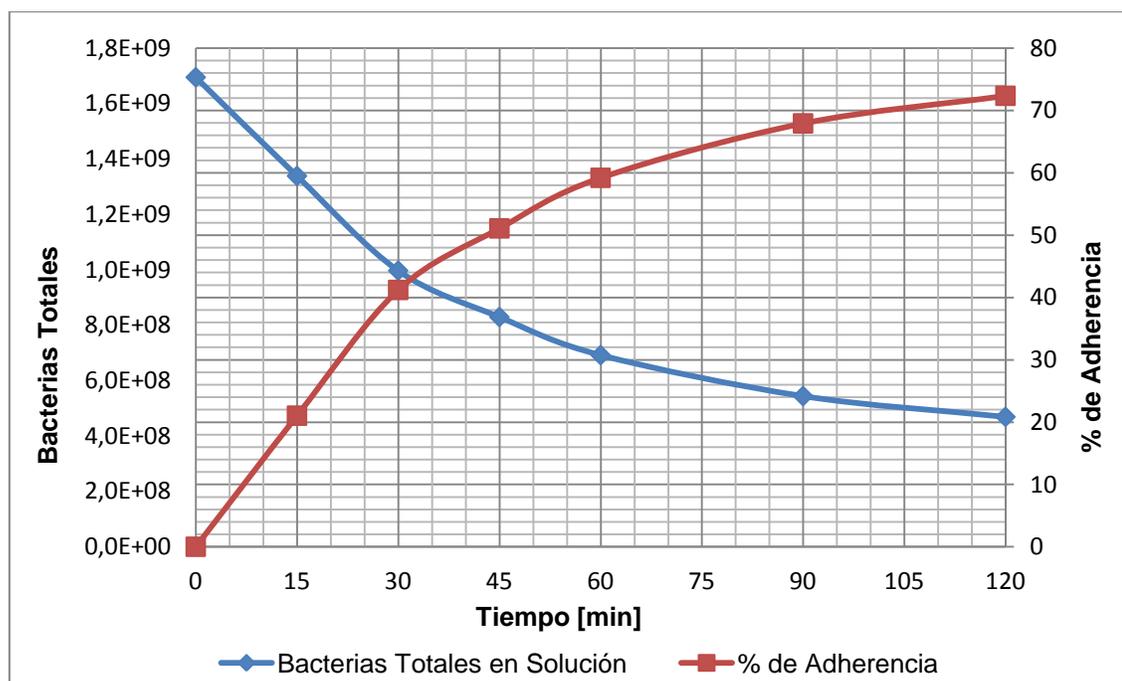


Gráfico 1: Recuento de bacterias planctónicas totales y porcentaje de adherencia de *Sulfobacillus acidophilus* sobre pirita a 45°C durante los primeros 120 minutos.

## 5.2 BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA CON *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS* A 45°C

Con el fin de caracterizar el comportamiento de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de pirita a 45°C, se realizaron cultivos con ella y el mineral en estudio, junto con experimentos controles estériles que no fueron inoculados con el microorganismo. Esto con el fin de comparar tanto en la lixiviación biológica como química, los parámetros estudiados.

Durante las tres semanas que duró la experiencia para ambos casos, se monitorearon periódicamente parámetros fisicoquímicos tales como el pH y Eh de las soluciones con electrodos de Ag/AgCl, las concentraciones del ión ferroso y la de hierro total por medio del método de orto-fenantrolina, además del hierro total en solución y el precipitado en el mineral por medio de digestión con ácido clorhídrico, y la concentración de sulfato por turbidimetría. Asimismo, en los cultivos de biolixiviación se realizaron los recuentos de bacterias planctónicas y las adheridas al mineral durante el proceso, utilizando para esto tinción con DAPI y observación en el microscopio de Epifluorescencia.

A continuación se muestran los resultados obtenidos del estudio.

### 5.2.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

#### 5.2.1.1 Evolución del pH y Eh

En el Gráfico 2, se muestra la variación del pH en el tiempo para el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por acción de *Sulfobacillus acidophilus*, medido en el cultivo de lixiviación, y por disolución química evaluado en el experimento control.

Como es posible apreciar, en el cultivo con el microorganismo se registró una considerable alza del pH desde 1,7 a 1,96 en las primeras 17 horas, momento en que fue ajustado el pH a 1,6 con ácido sulfúrico, para de esta forma evitar o disminuir la generación de precipitados del ión férrico. Dicho incremento, se puede deber a la oxidación biológica del ión ferroso a férrico por parte de las bacterias, lo que requiere el consumo de protones presentes en la solución, subiendo de esta forma el pH.

Posteriormente, se registró un descenso del pH hasta 1,51 a las 42 horas, subiendo luego para mantenerse constante en torno a 1,6. A partir de las 233 horas comenzó a disminuir nuevamente el pH hasta 1,55 a las 259 horas, llegando hacia el final de la experiencia a 1,51. Lo anterior muestra que la tasa de generación de protones fue mayor a la de consumo, lo que se puede deber a una menor tasa de disolución del mineral comparativamente con la velocidad

de generación de precipitados de hierro, reacción en que está involucrada la liberación de protones a la solución, descendiendo así el pH.

Con respecto al experimento control, es posible apreciar una leve alza del pH desde 1,77 a 1,81 durante las primeras 19 horas, el que fue ajustado a 1,6 con ácido sulfúrico. Posteriormente dicho valor se mantuvo relativamente constante en torno a 1,55 hasta las 353 horas donde subió a 1,61 para luego disminuir hasta 1,5 al final del estudio. De esta forma, en el experimento control la tasa de consumo de protones por oxidación química del ión ferroso, y la de generación de estos por disolución del mineral o formación de precipitados, se mantuvo en un relativo equilibrio durante el proceso.

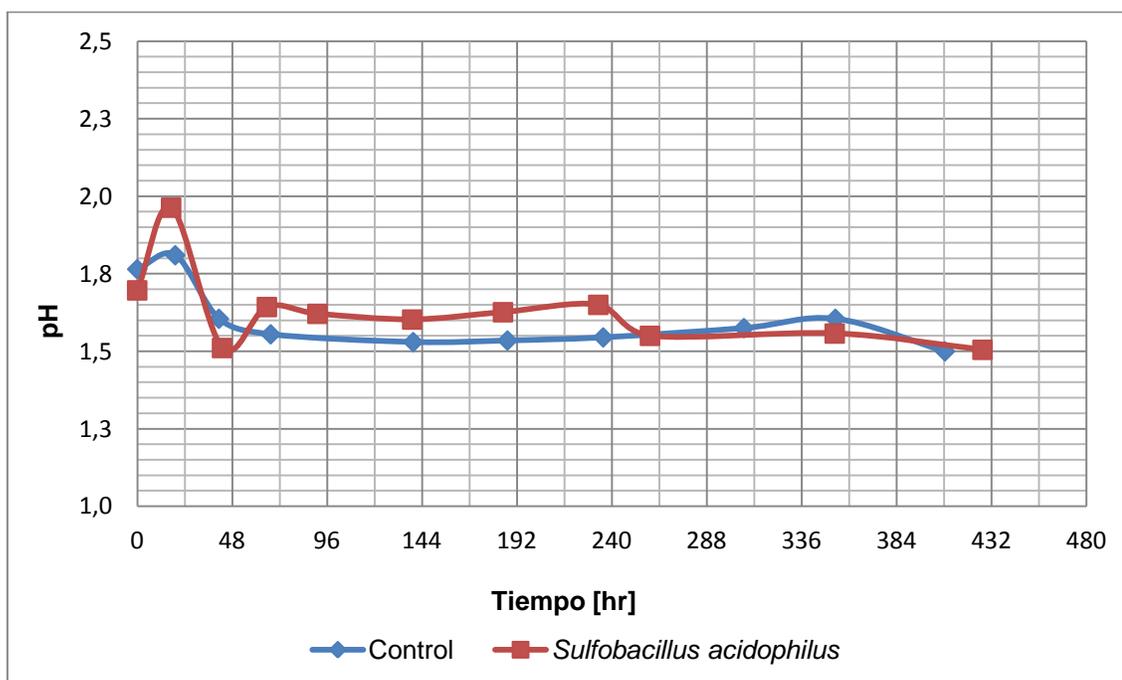


Gráfico 2: Variación del pH durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus* y en el experimento control.

La variación del potencial electroquímico en el tiempo para el proceso de lixiviación de pirita a 45°C por acción de *Sulfobacillus acidophilus* y por disolución química, es mostrada en el Gráfico 3. En él es posible observar que en el cultivo de biolixiviación se presentó un considerable aumento del Eh desde 353 a 622 [mV v/s Ag/AgCl] durante las primeras 17 horas, llegando a ser de 666 [mV v/s Ag/AgCl] a las 42 horas de iniciado el experimento, lo que muestra una rápida oxidación del ión ferroso a férrico. Posteriormente, dicho potencial comenzó con un leve descenso llegando finalmente a ser de 629 [mV v/s Ag/AgCl], indicando de esta forma una disminución de la razón férrico/ferroso.

En cuanto al Eh del experimento control, si bien este comenzó al mismo potencial que el cultivo de biolixiviación, su potencial electroquímico se mantuvo bajo, en torno a los 400 [mV v/s Ag/AgCl] alcanzando un valor final de 428 [mV v/s Ag/AgCl], lo que da cuenta que el hierro se encontraba en la solución principalmente como ión ferroso, a diferencia del cultivo con *Sulfobacillus acidophilus* donde fue predominante el ión férrico.

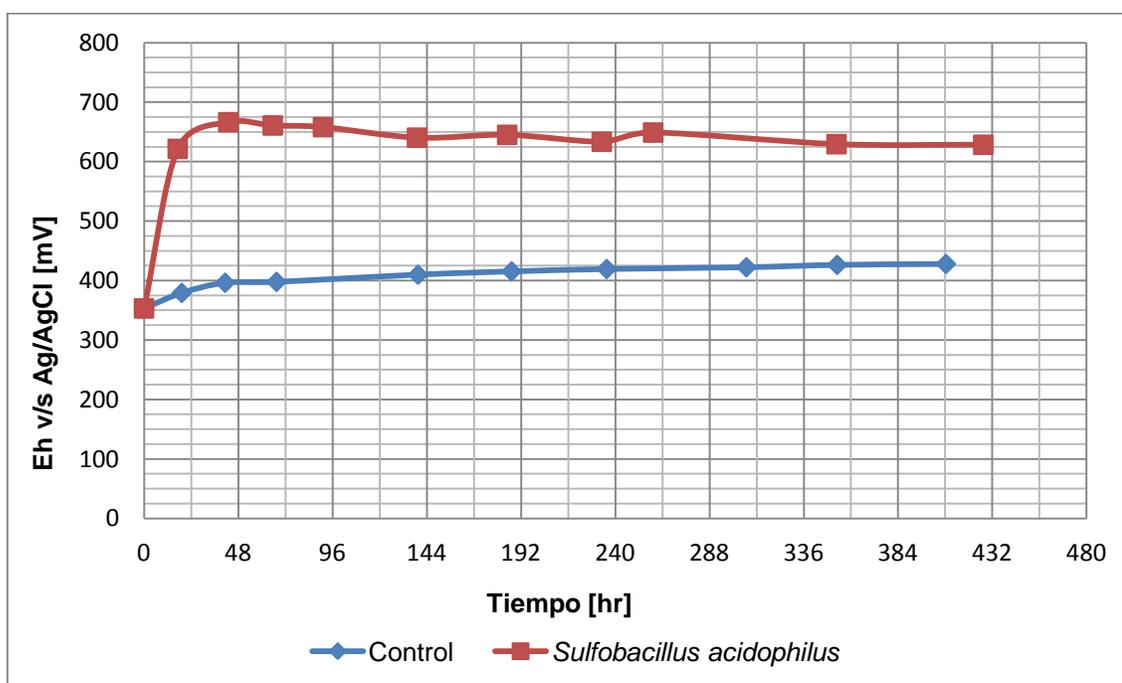


Gráfico 3: Variación del Eh durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus* y en el experimento control.

### 5.2.1.2 Evolución de la Concentración de Hierro

En el Gráfico 4 se muestra la evolución de la concentración del ión ferroso durante el proceso de lixiviación de pirita a 45°C, tanto para el proceso en presencia de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* como el abiótico.

Como se puede ver el ión ferroso en la solución del cultivo de biolixiviación disminuyó drásticamente durante las primeras 17 horas, desde una concentración inicial de 1020 ppm hasta las 41 ppm, para luego mantenerse en una concentración menor a 17 ppm dentro de las 91 horas y no superar las 54 ppm hasta el final del proceso. Lo anterior es concordante con las mediciones del potencial electroquímico registradas, en que el alza del Eh da cuenta de la disminución inicial del ión ferroso por oxidación biológica, al igual que sus posteriores valores los que fueron relativamente constantes al igual que la concentración de dicho ión.

En el experimento control las mediciones de concentraciones del ión ferroso muestran una constante disminución de ésta, sin embargo en comparación a las registradas en el cultivo con el microorganismo, dicho descenso fue considerablemente menor, además de paulatino, reduciéndose desde 1060 ppm hasta 622 ppm en 408 horas, lo que se vió reflejado en el bajo potencial electroquímico que mantuvo este control.

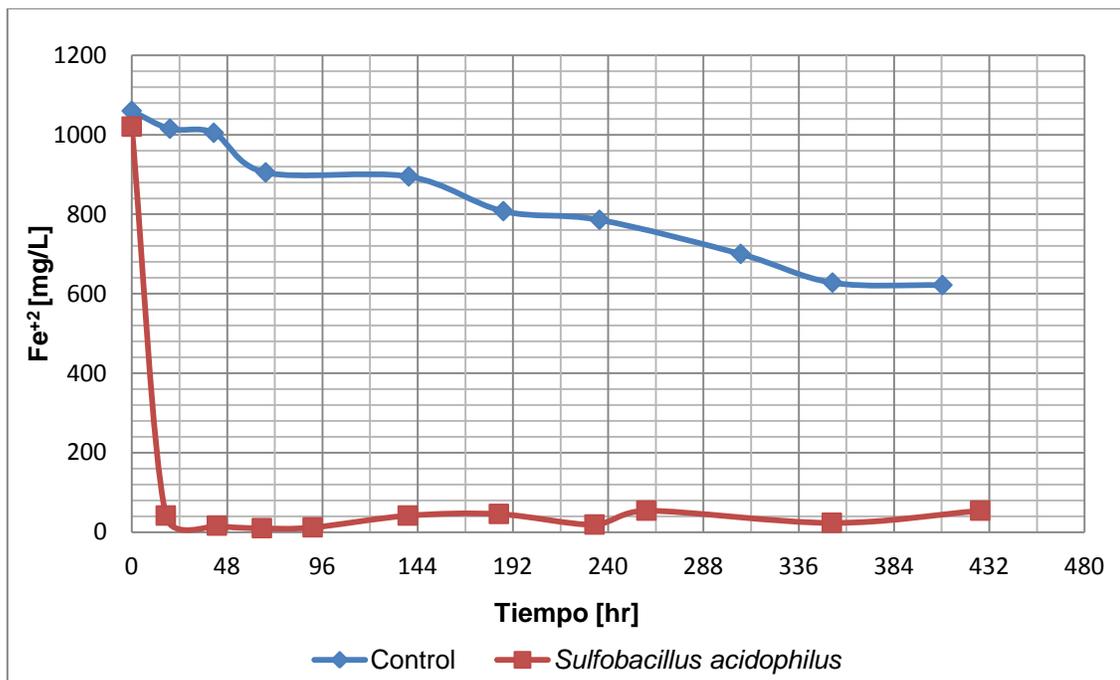


Gráfico 4: Variación de la concentración de ión ferroso en solución durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus* y en el experimento control.

En el Gráfico 5 se muestra la evolución de la concentración del hierro total en solución presente como ferroso y férrico, durante el proceso de lixiviación de pirita a 45°C, tanto para el proceso en presencia de *Sulfobacillus acidophilus* como en el experimento control. Es posible observar que en el caso del cultivo de biolixiviación de pirita, la concentración inicial de hierro total es de 1012 ppm, aumentando en 17 horas hasta 1106 ppm y una vez que han transcurrido 65 horas desde el inicio del estudio de biolixiviación se alcanzó una concentración máxima de 1126 ppm, la cual comenzó a disminuir levemente llegando a 1043 ppm a las 139 horas. Posteriormente, el hierro total en solución mantuvo una concentración relativamente constante, para luego presentar un apreciable descenso desde las 233 horas, llegando a ser ésta de unas 904 ppm al final de la experiencia. Este descenso en la concentración de hierro total indica que la tasa de disolución del mineral es más baja que la tasa de formación de precipitados del ión férrico, lo cual explica la disminución del pH registrada.

En cuanto al experimento control, si bien en las primeras 19 horas el hierro total en solución aumentó desde 1025 ppm hasta las 1060 ppm, esta última concentración corresponde a la máxima lograda durante todo el proceso, siendo unos 59 [mg/L] menor que la del cultivo con *Sulfobacillus acidophilus* al mismo tiempo y 79 [mg/L] más baja que la máxima concentración registrada en dicho cultivo de biolixiviación. Una vez alcanzada la concentración máxima a las 19 horas, ésta comenzó a disminuir continuamente llegando finalmente a ser de 789 ppm. Lo anterior refleja que pese a que el pH de la solución fue ajustado a 1,6 para evitar o disminuir la precipitación del ión férrico como jarositas o hidróxidos, ésta se produjo al igual que en el cultivo de biolixiviación.

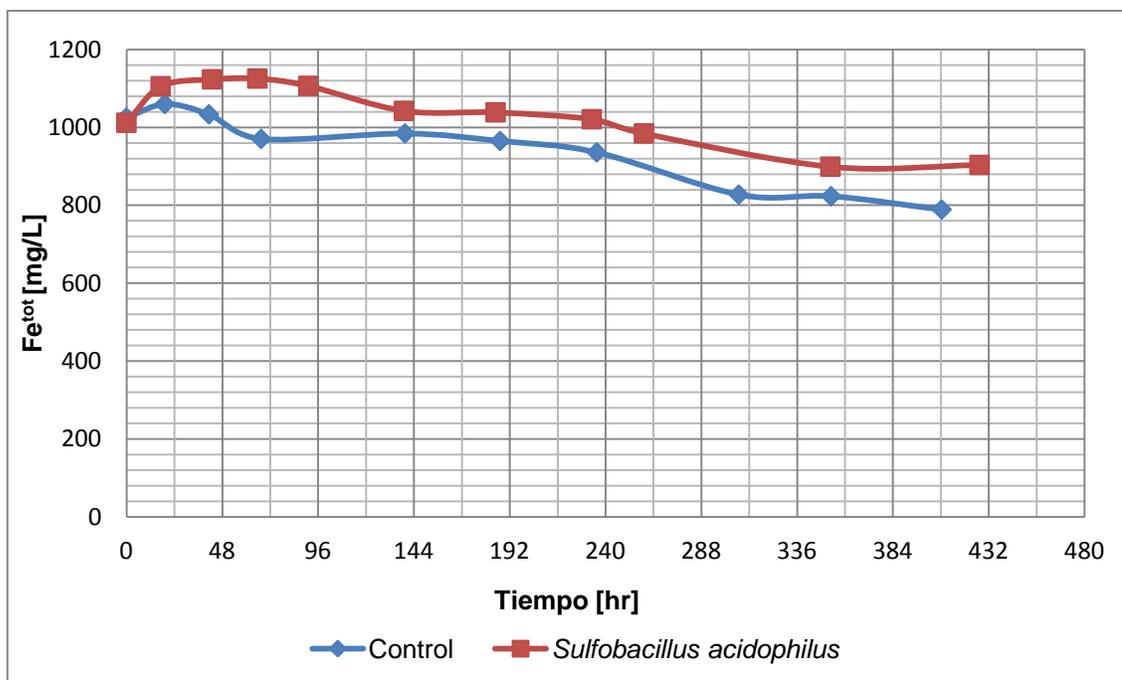


Gráfico 5: Variación de la concentración de hierro total en solución como iones ferroso y férrico, durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus* y en el experimento control.

En el Gráfico 6 se muestra la evolución en el tiempo de la concentración de hierro durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus*. En este gráfico se presenta además de las concentraciones de ión ferroso y hierro total en solución mostradas anteriormente, la concentración de ión férrico correspondiente a la diferencia entre el hierro total en solución y el ión ferroso.

Es posible apreciar que de forma simultánea al descenso de la concentración de ión ferroso, se presenta un alza del ión férrico llegando éste a una concentración de 1064 ppm en 17 horas, esto debido a una alta tasa de oxidación por la presencia de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* en el cultivo de biolixiviación. Al igual que el hierro total en solución, el ión férrico continuó aumentando hasta las 65 horas donde su concentración máxima llega a ser de unas 1116 ppm. Posterior a esto, se presentó una disminución en su concentración, llegando a unas 850 ppm al final de la experiencia.

Por medio del método de digestión con ácido clorhídrico se determinó el hierro que se encontraba en solución junto al precipitado como hidróxidos o jarositas, estimándose de esta forma el total del hierro presente en el cultivo de biolixiviación, tanto como iones ferroso y férrico como el férrico precipitado. En el Gráfico 6 se aprecia un sostenido aumento de dicha concentración desde 1020 ppm hasta 1415 ppm aproximadamente. No obstante, durante las primeras 91 horas se estimó una menor concentración de hierro total por medio de digestión con ácido clorhídrico que la concentración de hierro en solución, esto puede deberse a errores de medición y/o a que parte del hierro precipitado se depositó en las paredes de los matraces en que fueron realizados los cultivos y por tanto no pudo ser medido.

La disolución de la pirita durante el proceso de biolixiviación fue evaluada a partir de la diferencia entre la concentración de hierro total, determinado por digestión con ácido clorhídrico, y la concentración inicial de hierro. De esta forma, en la curva "*Fe Disuelto*" del Gráfico 6 es posible apreciar la evolución de la disolución del mineral, la que registró en las primeras 91 horas un incremento en la concentración de 145 ppm, para luego mantenerse en torno a este valor hasta las 185 horas, donde vuelve a aumentar pero en un menor grado. Si bien durante todo el proceso prosiguió la lixiviación del mineral, la recuperación de hierro llegó a ser de tan sólo 403 ppm al final del proceso, siendo dicha concentración menor que la alcanzada por el hierro precipitado. Lo anterior se puede deber al hecho que el hierro que se encontraba precipitado en las paredes de los matraces no pudo ser medido y por tanto el hierro total determinado por digestión con ácido clorhídrico fue menor al real. Un segundo factor que pudo llevar a estos resultados, guarda relación con la concentración inicial de hierro, pues a los cultivos fueron agregados unos 1000 [mg/L] de sulfato ferroso para favorecer el desarrollo inicial de los microorganismos inoculados, produciéndose así además de la precipitación del hierro que se iba liberando por la disolución del mineral, la del que se había añadido al cultivo.

La concentración de hierro precipitado fue estimada a partir de la diferencia entre el hierro total determinado por digestión con ácido clorhídrico y el hierro en solución como iones ferroso y férrico. Si bien en las primeras 42 horas, la concentración de hierro precipitado como hidróxidos o jarositas se mantuvo considerablemente baja, a partir de unas 91 horas manifestó un alza continua con una tasa de generación de aproximadamente 1,37 [ppm/h], llegando a una concentración final de hierro precipitado de unas 512 ppm.

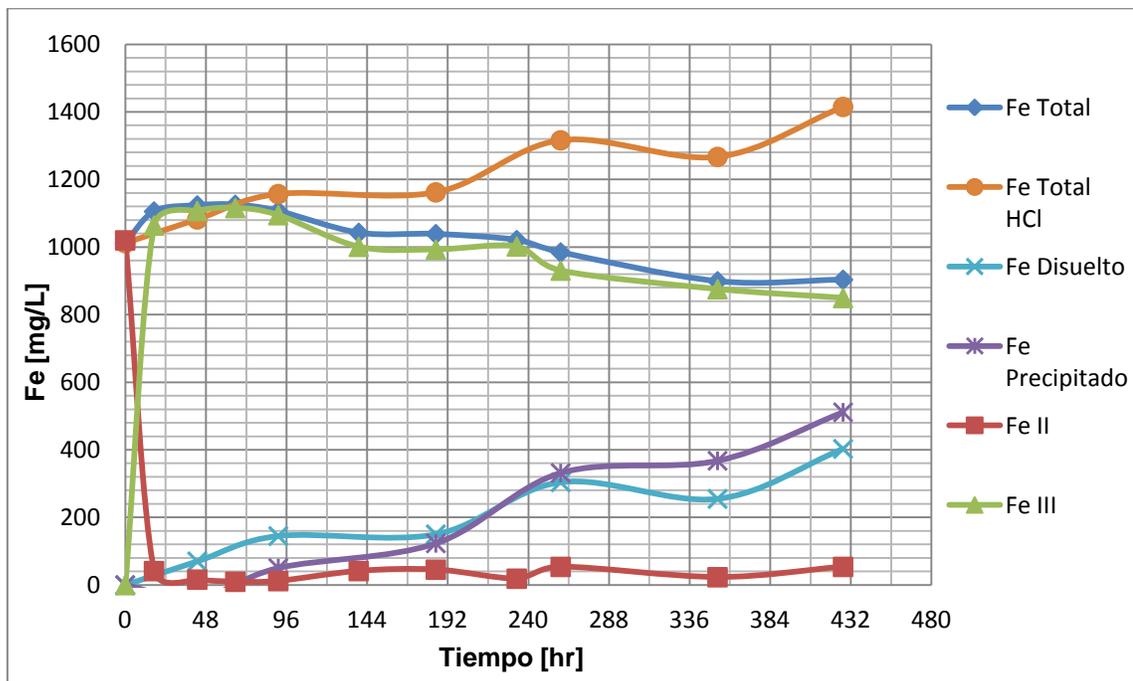


Gráfico 6: Evolución de la concentración de hierro total en solución (Fe Total), hierro total determinado por digestión con ácido clorhídrico (Fe Total HCl), hierro disuelto desde el mineral (Fe Disuelto), hierro precipitado (Fe Precipitado) e hierro como iones ferroso (Fe II) y férrico (Fe III), durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus*.

En el Gráfico 7 se presenta en mayor detalle la evolución de la concentración del hierro precipitado como hidróxido o jarosita, el que fue medido tanto en la solución como sobre el mineral. Como es posible apreciar, durante el proceso de biolixiviación dichos compuestos formados con ión férrico se fueron generando continuamente y depositando principalmente en la superficie del mineral debido a su precipitación. Así, hacia el final de la experiencia se estimó una concentración de hierro precipitado sobre la pirita de 261 ppm aproximadamente. En la solución de biolixiviación la presencia de precipitados se mantuvo en torno a cero hasta las 192 horas, tiempo en que comenzó a registrarse un incremento en su concentración llegando a 213 ppm a las 427 horas, con lo que la concentración total de hierro precipitado en el cultivo de biolixiviación fue de una 512 ppm.

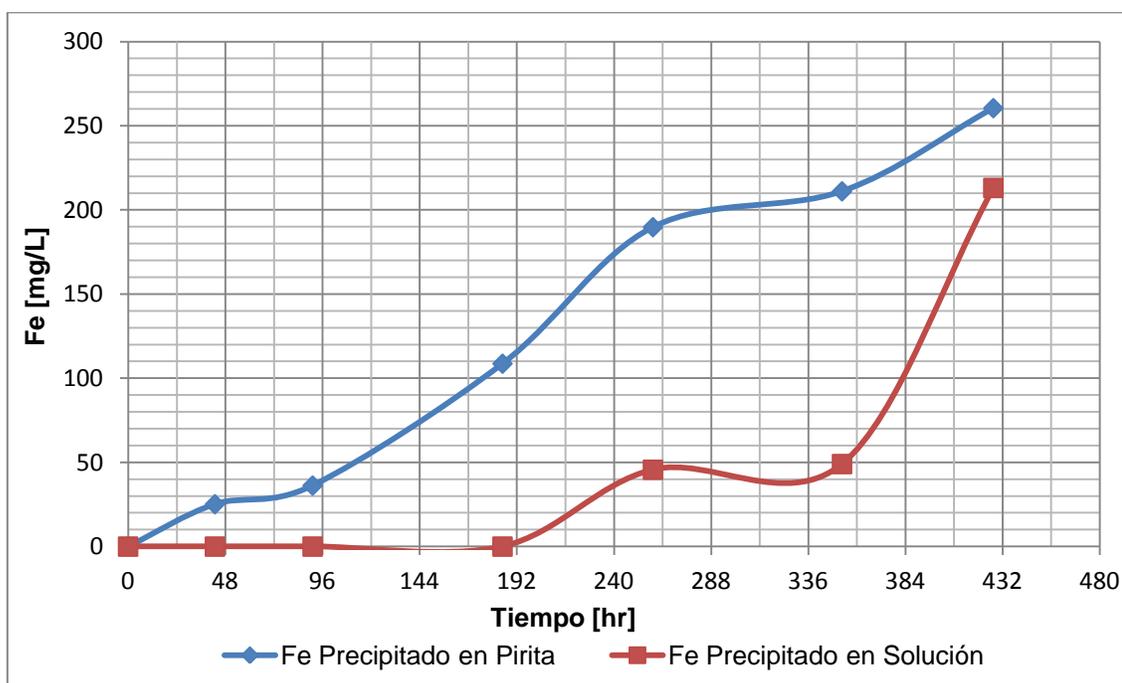


Gráfico 7: Evolución de la concentración de hierro precipitado como hidróxidos o jarositas en la solución y sobre el mineral, en el proceso de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C.

La variación de la concentración de hierro en el experimento control sin microorganismos, correspondiente al proceso de lixiviación química de pirita a 45°C se muestra en el Gráfico 8. En éste se indican además de las concentraciones de ión ferroso y hierro total en solución, la del ión férrico determinada a partir de las anteriores.

Como se puede ver en dicho gráfico, desde un principio la concentración del ión ferroso presentó una constante disminución debido a su oxidación química a ión férrico, aumentando por consiguiente este último, como se puede comprobar en la gráfica. Sin embargo, el alza en la concentración del férrico fue considerablemente menor que la registrada en el cultivo de biolixiviación, donde las bacterias *Sulfobacillus acidophilus* presentes en él contribuyeron a una mayor tasa de oxidación. Así, la concentración de férrico no superó las 196 ppm mientras que en el cultivo de lixiviación esta llegó a ser de unas 1116 ppm, lo que concuerda con el bajo potencial electroquímico registrado en el experimento control.

Junto con lo anterior, la concentración de hierro total en solución presentó una disminución en su concentración a partir de las 19 horas, de esta forma desde dicho momento, la disolución del hierro desde el mineral calculada a partir del hierro total en solución tendría valores negativos. Lo anterior soporta la idea de que también en estos experimentos precipitó el hierro disuelto desde el mineral.

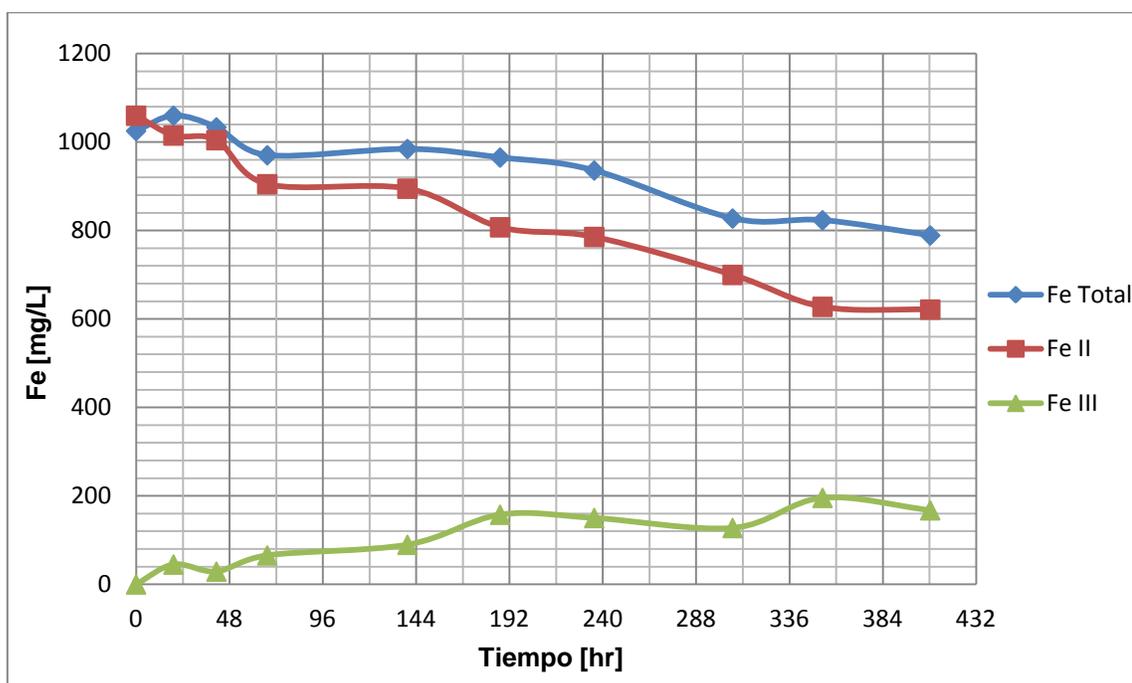


Gráfico 8: Evolución de la concentración de hierro total en solución (Fe Total), hierro como ión ferroso (Fe II) y como ión férrico (Fe III), durante el proceso de lixiviación química de pirita a 45°C en el experimento control.

### 5.2.1.3 Evolución de la Disolución de Azufre

La disolución de azufre por lixiviación del mineral se estudió por medio de la variación de la concentración de sulfato en solución mostrada en el Gráfico 9, tanto para el cultivo de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, como para el experimento control sin inóculo bacteriano.

Cabe mencionar que por medio del método de turbidimetría no es posible determinar la concentración de intermediarios de azufre como polisulfuros y azufre elemental o el que pudiese encontrarse en los precipitados de hierro generados durante el proceso de lixiviación, sino sólo la concentración de azufre disuelto como sulfato. Es por esto, que se consideró que la evolución del sulfato en el tiempo es representativa del azufre en la solución.

En el Gráfico 9 es posible observar que la concentración de sulfato en el cultivo de biolixiviación por *S. acidophilus* presentó un fuerte descenso durante las primeras 91 horas y luego se mantuvo relativamente constante. Lo anterior coincide con la disminución del hierro total en solución, de esta forma nuevamente se apoya la idea de la formación de precipitados de hierro, sugiriendo que estos serían del tipo jarositas, dado que su generación consume sulfato como se muestra en la Ecuación 7 de la sección de antecedentes 1.10 *Precipitación del Ión Férrico*.

Es debido a la reducción de la concentración de sulfato en solución en el cultivo de biolixiviación registrada, que se estimó de forma teórica el azufre como sulfato que se pudo haber disuelto desde el mineral, utilizando para esto la concentración de hierro total disuelto, así

como también considerando que por cada molécula de pirita que se disuelve se generan dos de sulfato, como se señala en la Ecuación 6 de la sección de antecedentes *Mecanismo de Lixiviación Indirecta*. Dicha concentración teórica de sulfato corresponde a la curva “*S. acidophilus* Concentración Teórica” del Gráfico 9, y en ella que es posible ver un leve aumento en la concentración durante todo el proceso correspondiente a 1387 ppm aproximadamente.

En cuanto a la concentración de sulfato del experimento control, ésta registró un incremento a las 139 horas y luego se mantuvo relativamente constante durante el resto del proceso, determinándose un aumento total de la concentración del sulfato en solución de unas 2346 ppm.

De esta forma, la concentración de azufre en solución del cultivo de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* disminuyó durante el proceso y pese a que se ajustó considerando el azufre que pudo haber precipitado como jarositas, el experimento control mostró una mayor alza en el sulfato en solución, peso a que en él se observó una menor disolución del mineral que en el cultivo con el microorganismo. Esto hecho puede deberse a que dicha concentración constituye sólo una estimación a partir del hierro disuelto, el que puede ser menor al real puesto que no fue posible recuperar todo el hierro precipitado contenido en el cultivo, debido a que parte de él se encontraba adherido a las paredes de los matracas.

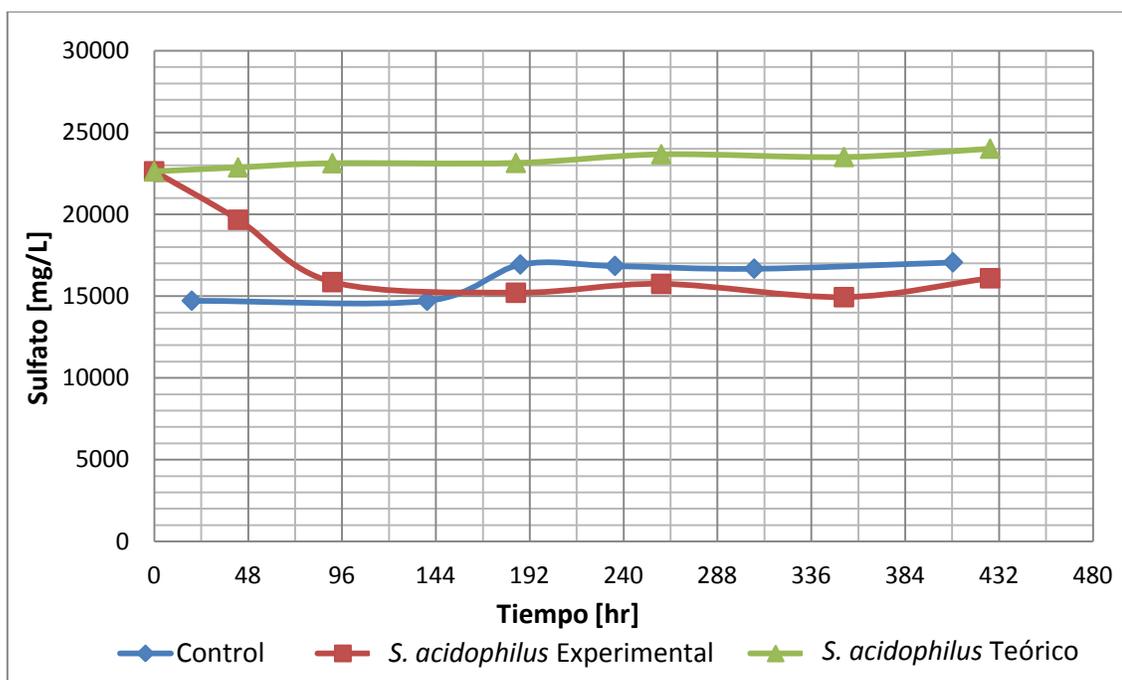


Gráfico 9: Variación de la concentración de sulfato en solución medida en el experimento control, la determinada durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus* y la concentración esperada teóricamente en este cultivo de biolixiviación a partir del hierro disuelto.

## 5.2.2 ANÁLISIS CUALITATIVOS DE LOS CULTIVOS DE LIXIVIACIÓN Y EXPERIMENTO CONTROL

En las siguientes figuras se muestran imágenes fotográficas tanto de los cultivos de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C como de los experimentos control, tomadas a distintos tiempos en que fueron realizados los monitoreos de los parámetros fisicoquímicos y biológicos durante el estudio.

Por medio de estas fotografías se busca analizar de forma cualitativa los procesos de lixiviación del mineral, observando en lo posible alguna diferencia apreciable entre las soluciones de los cultivos de biolixiviación y la de los experimentos control, o si es visible la precipitación de hierro.

En la Figura 4(a) a continuación, se muestran los matraces de los experimentos control al inicio del estudio, cuya solución era transparente al igual que la de los cultivos de biolixiviación en el tiempo cero. Mientras que en la Figura 4(b) se presenta una imagen de los cultivos con *Sulfobacillus acidophilus* a las 17 horas, donde es posible apreciar que la solución tomó una tonalidad anaranjada, lo que puede deberse a la presencia de  $Fe^{+3}$  disuelto en la solución, indicando así que el ión ferroso agregado inicialmente habría sido oxidado a férrico y posiblemente a que el mineral se habría comenzado a disolver. Cabe señalar que en este mismo tiempo, la solución de los experimentos control continuaba viéndose transparente, no mostrando así evidencia significativa de disolución de la pirita o de la oxidación del ión ferroso.

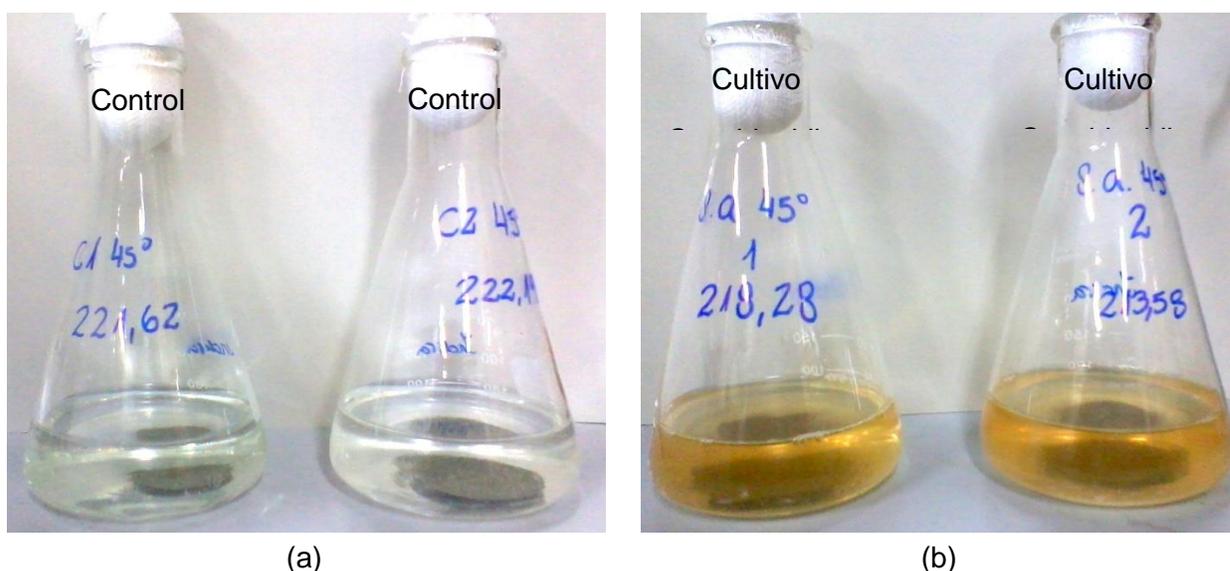


Figura 4: Imágenes fotográficas de los experimentos control al inicio del estudio (a) y de dos de los cultivos de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C una vez transcurridas 17 horas (b).

La Figura 5 muestra imágenes comparativas entre los experimentos control y los cultivos de biolixiviación de pirita a las 259 horas (a), y al final del estudio correspondiente a unas 420

horas (b). En ellas es evidente la diferencia de color de las soluciones para ambos casos, donde el cultivo de biolixiviación de pirita a 45°C por *Sulfobacillus acidophilus* presentó una solución con un tono ocre claro, mientras que el experimento sin inóculo de la bacteria siguió viéndose transparente al igual que al inicio del estudio. Asimismo, es posible apreciar la presencia de precipitados de hierro sobre el mineral y en las paredes del matraz del cultivo de biolixiviación, lo que concuerda con lo esperado de acuerdo a las mediciones de hierro total, las que indicaban una considerable precipitación de éste.

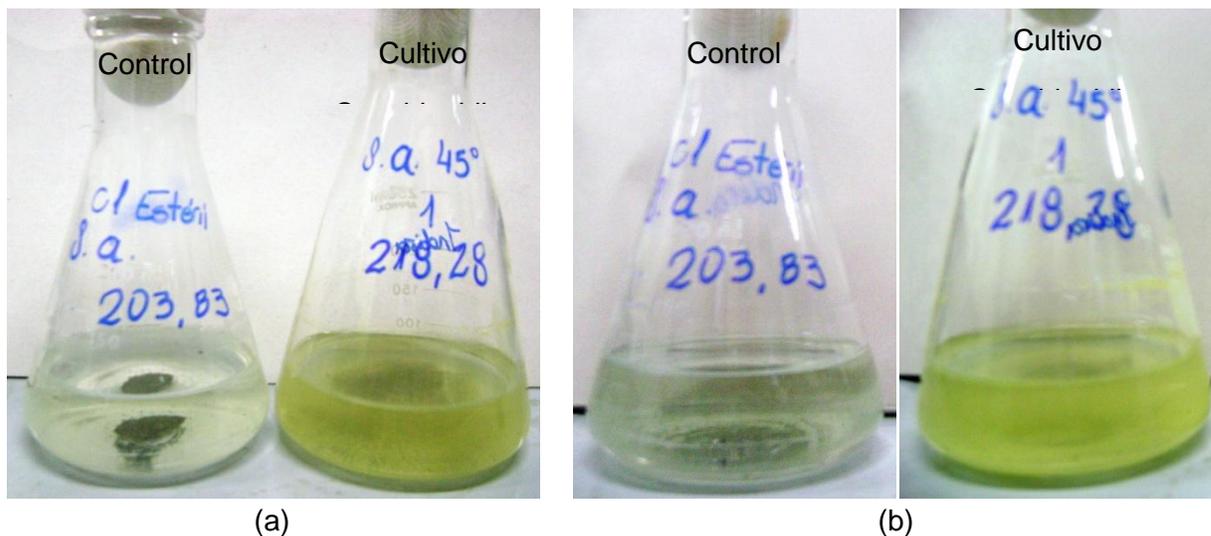


Figura 5: Imágenes fotográficas comparativas entre un experimento control y un cultivo de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C una vez transcurridas 259 horas (a) y al final del estudio (b).

A continuación, en la Figura 6 se muestra una fotografía inclinada de dos cultivos de biolixiviación al final del proceso, donde es posible observar más claramente la presencia de hierro precipitado sobre la pirita como también en las paredes de los matraces.

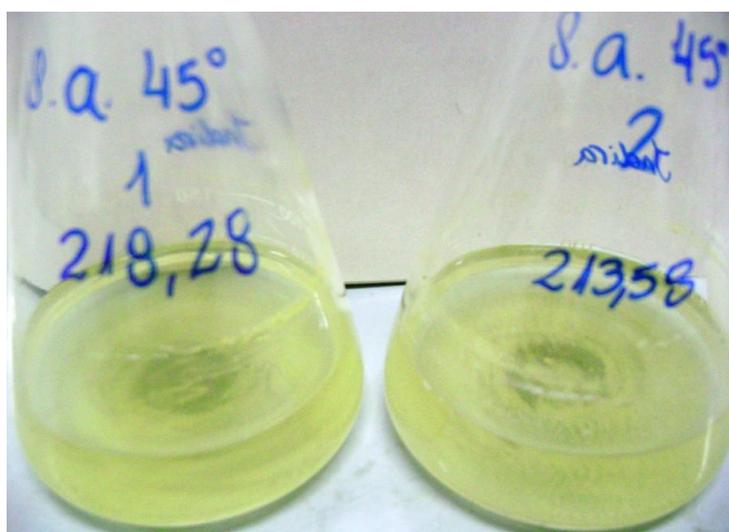


Figura 6: Imagen fotográfica de dos de los cultivos de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C al final del estudio (427 horas), en donde es posible apreciar la presencia de precipitados de hierro depositados sobre el mineral y las paredes de los matraces.

## 5.2.3 ANÁLISIS BIOLÓGICOS

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación, tanto de las bacterias planctónicas como de las adheridas a la superficie del mineral, realizadas a los cultivos de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C.

### 5.2.3.1 Cuantificación de las Bacterias Planctónicas

Para evaluar las bacterias libres en solución, en cada monitoreo se analizó dos muestras desde la solución, una directa y otra con factor de dilución de 10. Posteriormente las células presentes en la solución fueron fijadas y filtradas, para luego cuantificarlas por medio de tinción con DAPI y observación al microscopio de Epifluorescencia. En la Figura 7 a continuación se muestra la fotografía sacada a una de las muestras, en la que es posible ver las bacterias con forma de bastones en un tono azul brillante.

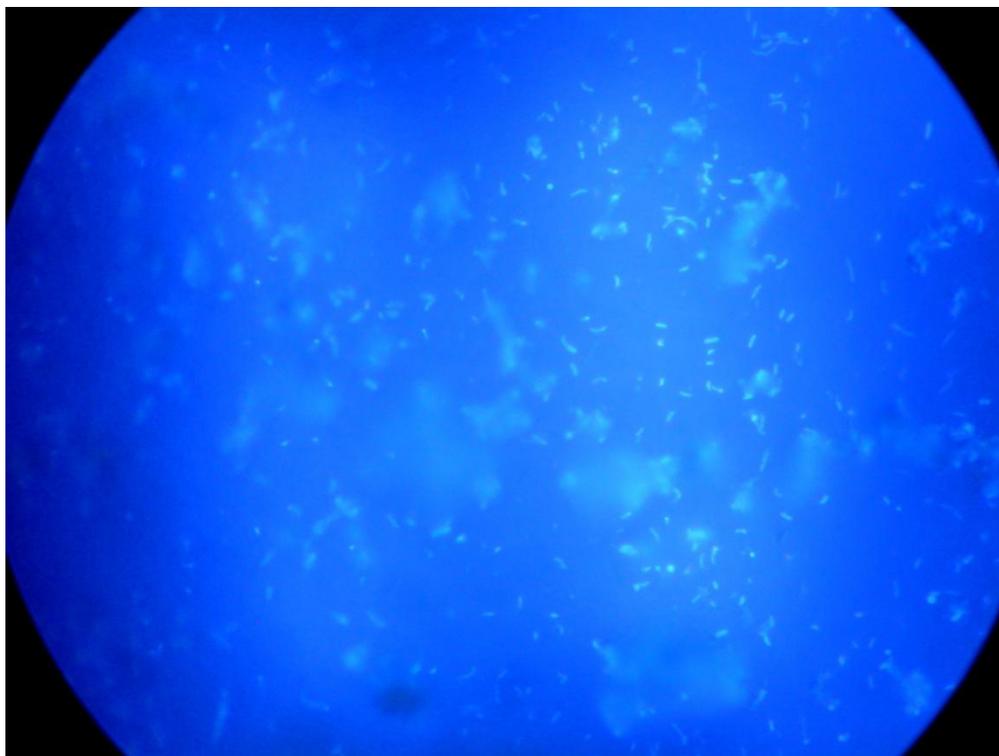


Figura 7: Fotografía de una sección de filtro con bacterias planctónicas de un cultivo de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, las que fueron teñidas con DAPI y observadas en el microscopio de Epifluorescencia. En ella es posible ver las bacterias con forma de bastones en una tonalidad brillante.

Los resultados de las bacterias planctónicas totales cuantificadas durante el estudio se muestran en el Gráfico 10. La concentración inicial de bacterias fue de  $5,6 \times 10^7$  [bacterias/mL], equivalente a  $5,6 \times 10^9$  bacterias totales, cantidad que durante las 91 primeras horas aumentó de forma exponencial con un  $R^2$  de 0,79, llegando aproximadamente a una cantidad total de  $3,4 \times 10^{10}$  bacterias planctónicas. Posteriormente, se apreció una disminución en la tasa de crecimiento celular y desde las 185 horas en que se presentan  $3,9 \times 10^{10}$  bacterias en solución, fue posible contabilizar una menor cantidad de células en las muestras, produciéndose en cada monitoreo un brusco descenso en su cuantificación, llegando así al final de la experiencia a estimarse un total de tan sólo  $5,95 \times 10^9$  bacterias planctónicas.

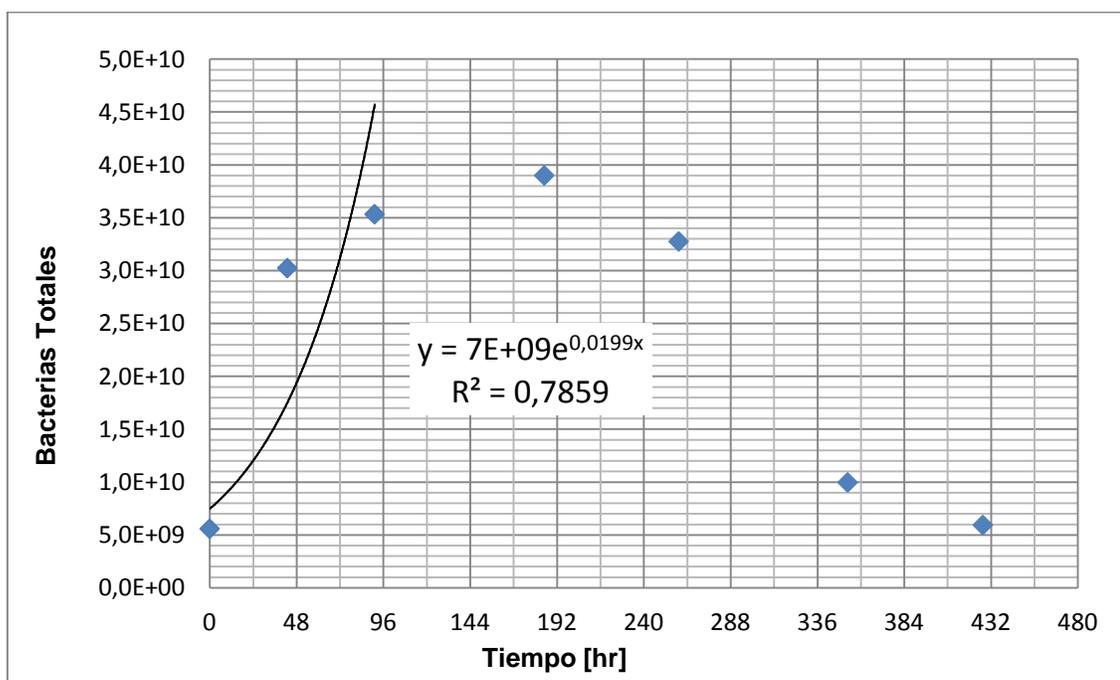


Gráfico 10: Evolución en el tiempo del número total de bacterias *Sulfobacillus acidophilus* libres en la solución lixivante. En número de bacterias planctónicas fue cuantificado en cinco zonas del filtro en que fueron fijadas, siendo el promedio de éstas el número de bacterias considerado para la determinación de bacterias totales. La desviación estándar de dichas cuantificaciones estuvo entre 1 y 17,2.

Considerando que durante las primeras 91 horas el cultivo de lixiviación presentó un crecimiento celular del tipo exponencial, se consideraron dichos datos para realizar una linealización en el tiempo del logaritmo natural de la razón entre las bacterias totales en cada monitoreo y las bacterias iniciales, la cual se muestra en el Gráfico 11. A partir de la regresión lineal realizada, con un  $R^2$  de 0,74, fue posible determinar el valor de la pendiente de la recta correspondiente a la máxima velocidad de crecimiento del cultivo de *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de pirita a  $45^\circ\text{C}$ , donde este  $\mu_{\text{max}}$  fue de  $2,37 \times 10^{-2}$  [horas $^{-1}$ ]. Éste resultado indica que se requieren aproximadamente 29,3 horas para duplicar la población bacteriana.

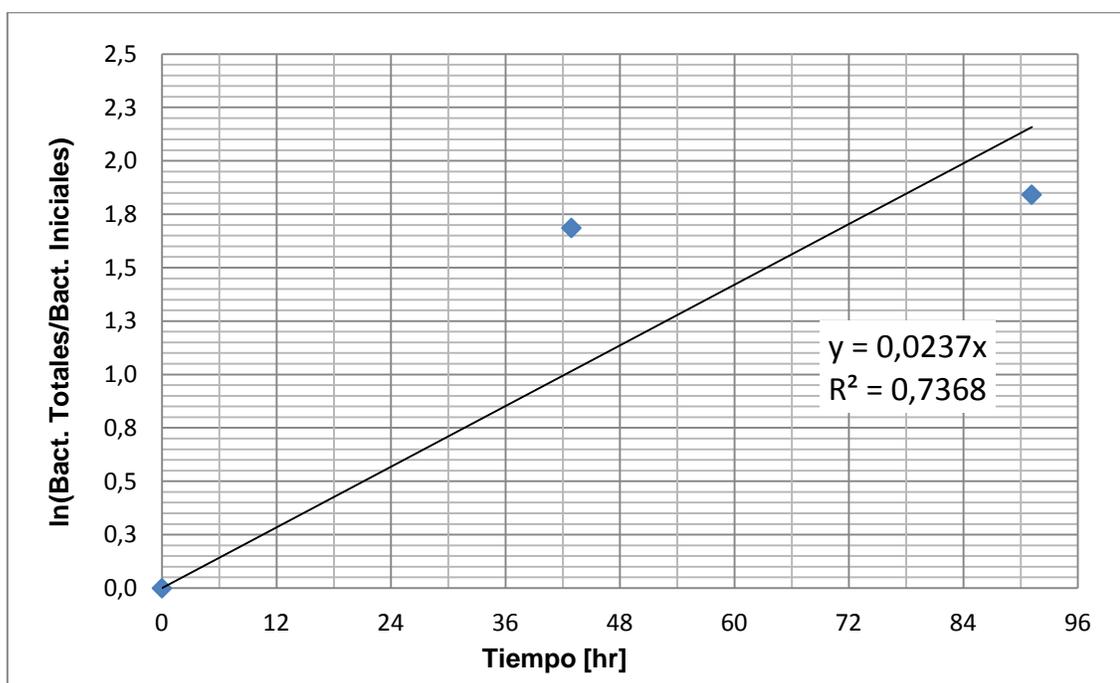


Gráfico 11: Determinación de la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) de *Sulfobacillus acidophilus* en el cultivo de biolixiviación de pirita a 45°C, mediante el análisis con regresión lineal.

### 5.2.3.2 Cuantificación de las Bacterias Adheridas a la Superficie del Mineral

Como se explica en la sección 9.2.3 *Cuantificación de Bacterias Planctónicas y Adheridas* del Anexo B, para determinar el número total de bacterias adheridas a la superficie del mineral, se determinó el área circular promedio de las partículas de pirita, para con ella estimar el radio de estas, luego su volumen y superficie esférica. Dichos resultados son indicados en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Características físicas promedio de una partícula de pirita.

Característica de la Partícula Promedio	Valor	Unidad
Área	30,87	[ $\mu\text{m}$ ]
Radio Circular	3,13	[ $\mu\text{m}$ ]
Volumen Esférico	129,00	[ $\mu\text{m}^3$ ]
Área Superficial Esférica	123,47	[ $\mu\text{m}^2$ ]

Una vez determinados el volumen y el área superficial de una partícula de pirita, con los datos de la masa del mineral en el cultivo de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C y

su densidad, se evaluó el área total disponible en la muestra para la adherencia de dicha bacteria correspondiente a  $9,5 \times 10^7 \mu\text{m}^2$  como es indicado en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Densidad de la pirita, junto con su masa y área total disponible para la adherencia bacteriana.

Parámetros de la Pirita	Valor	Unidad
Masa Total	0,5	[g]
Densidad	5,02	[g/cm <sup>3</sup> ]
Área Total	9,53E+07	[ $\mu\text{m}^2$ ]

La cantidad de bacterias totales adheridas a la superficie del mineral determinada a partir del área total de mineral disponible y el promedio de las bacterias por área de pirita que pudieron ser contabilizadas mediante tinción con DAPI y observación al microscopio de Epifluorescencia se muestra en la Gráfico 12. Es posible ver que a las 42 horas se tuvo un total de  $9 \times 10^7$  bacterias adheridas, el cual es dos órdenes de magnitud menor que la cantidad esperada, correspondiente a unas  $4 \times 10^9$  bacterias si se considera que el inóculo del microorganismo agregado al cultivo fue de unas  $5,6 \times 10^9$  bacterias totales y que la capacidad de adherencia de *Sulfobacillus acidophilus* a pirita es de un 72%.

Junto con lo anterior, es posible apreciar una posterior disminución en el número de bacterias adheridas al mineral donde a las 185 horas ésta fue de  $5,5 \times 10^7$ , para luego volver a aumentar llegando a  $9,9 \times 10^7$  bacterias totales adheridas al final de la experiencia.

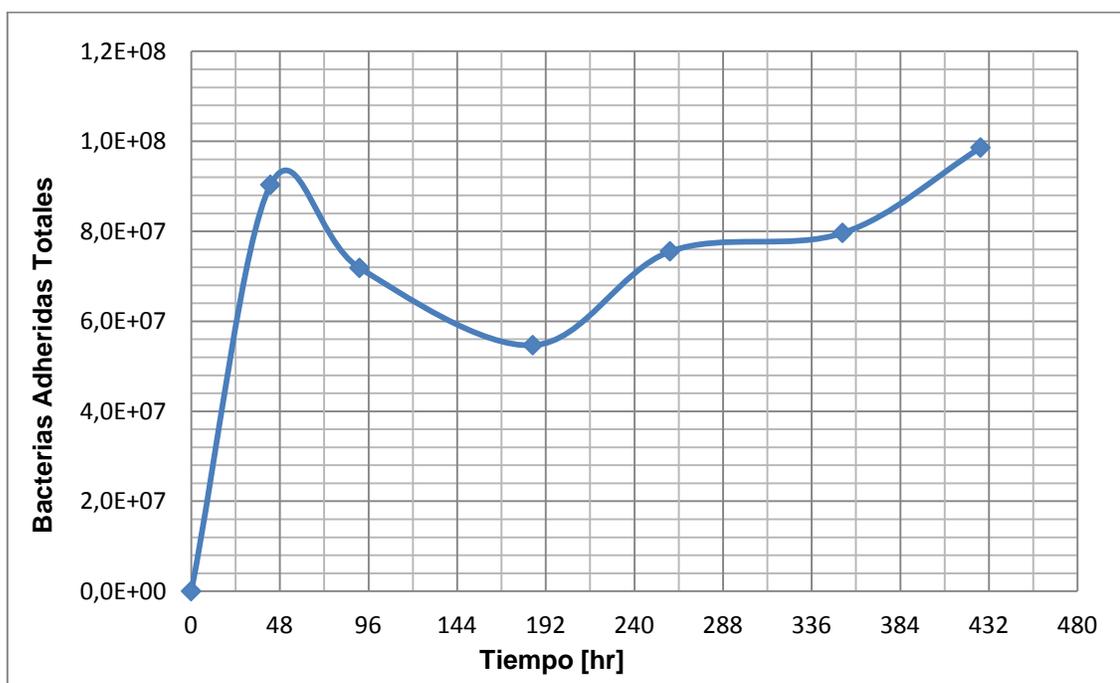


Gráfico 12: Evolución en el tiempo del número total de bacterias *Sulfobacillus acidophilus* adheridas a la superficie del mineral. La determinación del número de bacterias totales adheridas al mineral se realizó con el promedio de la cuantificación de bacterias adheridas a cinco partículas de cada muestra. La desviación estándar de dichas cuantificaciones estuvo entre 6,3 y 25,7.

Un importante factor en la disminución de la estimación de bacterias totales adheridas a la superficie de la pirita fue la dificultad para realizar el conteo de células, esto debido a la presencia de precipitados de hierro sobre el mineral, como se puede apreciar en la Figura 8.

Al ser expuesto el mineral teñido con DAPI a la luz ultravioleta éste resplandece y las bacterias adheridas a su superficie pueden ser distinguidas como manchas de un tono azul brillante con forma alargada. No obstante, en la mayoría de las partículas de pirita se observó una gran zona de color oscuro, lo que puede deberse a la presencia de precipitados de hierro sobre ésta. De esta forma, se puede suponer que bajo esta capa de precipitados se encontraban bacterias que no pudieron ser contabilizadas.

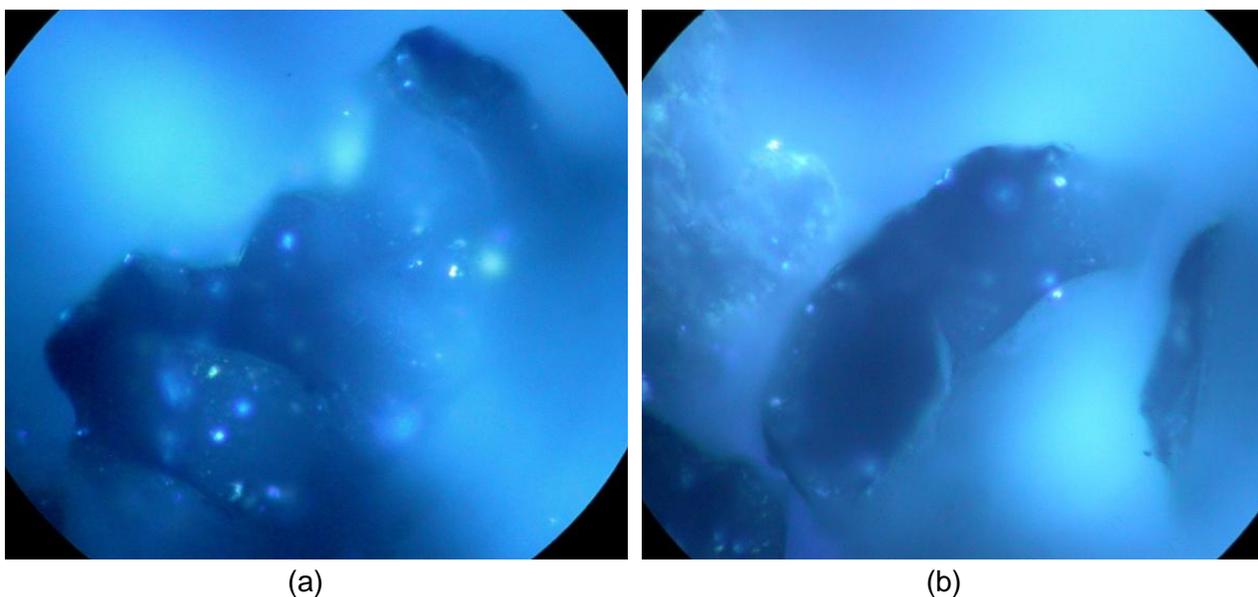


Figura 8: Fotografías al microscopio de Epifluorescencia de partículas de pirita del cultivo de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, a las 185 horas (a) y 259 horas (b), en las que es posible ver bacterias adheridas a la superficie del mineral con una tonalidad azul brillante dada por la tinción con DAPI, así como también zonas oscuras indicando la presencia de precipitados de hierro.

## 5.2.4 MECANISMO DE BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA POR *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS* A 45°C

El avance de una reacción puede ser representado por un modelo matemático de acuerdo a su ecuación cinética, procurando representar el proceso real de la forma más precisa posible. Las reacciones no catalíticas de las partículas sólidas con el fluido que las rodea, pueden ser representadas por medio de dos modelos idealizados: la conversión progresiva y el del núcleo sin reaccionar (Levenspiel 1987).

El modelo de conversión progresiva considera que el líquido reaccionante penetra y reacciona simultáneamente en toda la partícula sólida, aunque no necesariamente a igual velocidad en los distintos lugares de ésta, de forma que el reactante sólido se está convirtiendo de forma continua y progresiva en toda la partícula.

En el modelo del núcleo sin reaccionar, la reacción tiene lugar primero en la superficie exterior de la partícula sólida y luego se desplaza hacia el interior del sólido, dejando atrás el material convertido y sólido inerte llamado *ceniza*. Así, en el transcurso de la reacción existe un núcleo de la partícula sólida que no ha reaccionado y cuyo tamaño va disminuyendo conforme ocurre la reacción.

Como se explica más detalladamente en la sección 9.1.1 *Modelo del Núcleo sin Reaccionar* del Anexo A, el modelo del núcleo sin reaccionar considera que durante la reacción se presentan cinco etapas correspondientes a la difusión de los reactivos lixiviantes hasta la superficie del sólido a través de la película de fluido, luego la penetración y difusión de éstos a través de la capa de ceniza hasta la superficie del sólido que no ha reaccionado, la posterior reacción de los reactivos, la difusión de los productos solubles de la reacción a través de la capa de ceniza y finalmente a través de la capa límite hasta el seno del fluido. Dado que las resistencias de las distintas etapas suelen ser muy diferentes, debe tenerse en cuenta que aquella etapa que presente mayor resistencia constituirá la etapa controlante de la velocidad de reacción del proceso.

En la mayoría de los casos, el modelo del núcleo sin reaccionar es el que representa con mayor aproximación el comportamiento real del proceso, por lo que fue utilizado para determinar la etapa controlante en la biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, considerando para ello que la recuperación de hierro en un cierto tiempo corresponde a la conversión alcanzada por la reacción de lixiviación, y que la ecuación del modelo que la aproxima de mejor forma depende de la etapa controlante del proceso.

A continuación se indican las ecuaciones de conversión-tiempo para partículas esféricas de tamaño constante que aproximan matemáticamente la razón entre el tiempo de biolixiviación ( $t$ ) y el necesario para una conversión total del mineral ( $\tau$ ), según el modelo del núcleo sin reaccionar y la etapa controlante.

Tabla 3: Ecuaciones de conversión-tiempo de acuerdo al Modelo del Núcleo sin Reaccionar.

Conversión Alcanzada	Etapa Controlante		
	Difusión a través de la Película	Difusión a través de la Ceniza	Reacción Química
$X_B = 1 - \left(\frac{r_c}{R}\right)^3$	$\frac{t}{\tau} = X_B$	$\frac{t}{\tau} = 1 - 3 * (1 - X_B)^{2/3} + 2 * (1 - X_B)$	$\frac{t}{\tau} = 1 - (1 - X_B)^{1/3}$

La conversión en el tiempo alcanzada por la reacción de biolixiviación de pirita por *S. acidophilus*, determinada a partir del porcentaje de recuperación de hierro desde el mineral es mostrada en el Gráfico 13 a continuación.

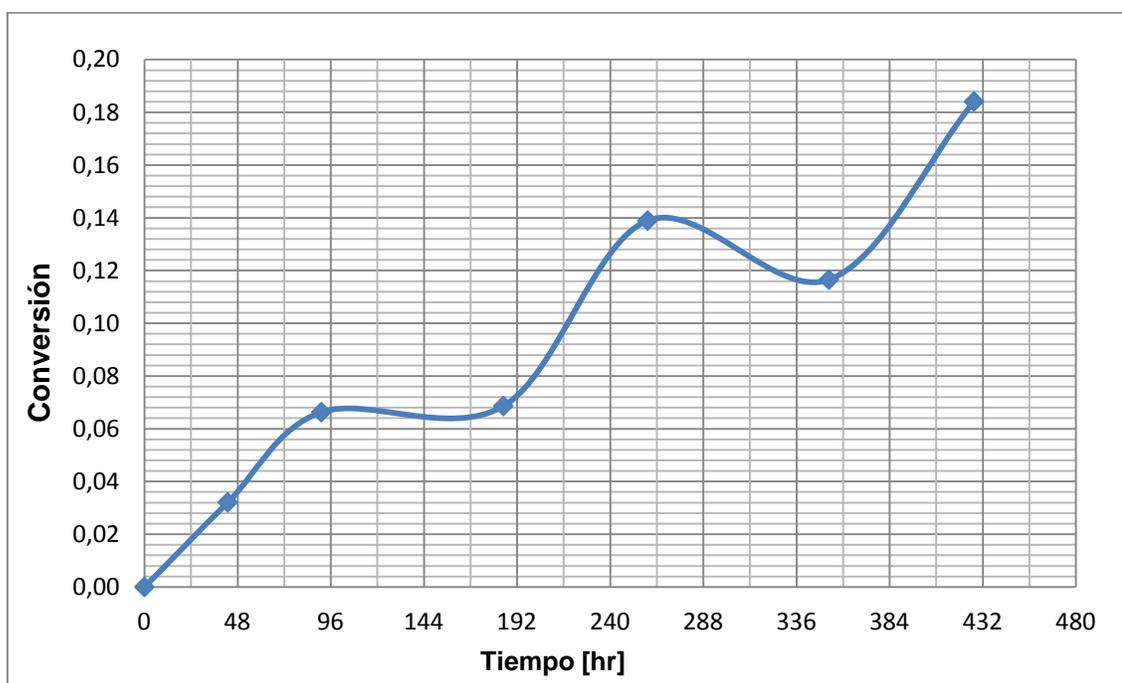


Gráfico 13: Evolución de la conversión de la reacción de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C.

Utilizando el modelo del núcleo sin reaccionar y los datos de conversión de la reacción de biolixiviación de pirita en el tiempo, se estimó matemáticamente la razón entre el tiempo de biolixiviación y el de conversión total ( $t/\tau$ ) en el tiempo. En el Gráfico 14 se muestran los resultados obtenidos al considerar que la etapa controlante del proceso es la difusión de los reactantes a través de la ceniza y en el Gráfico 15 si el control está dado por la reacción de biolixiviación.

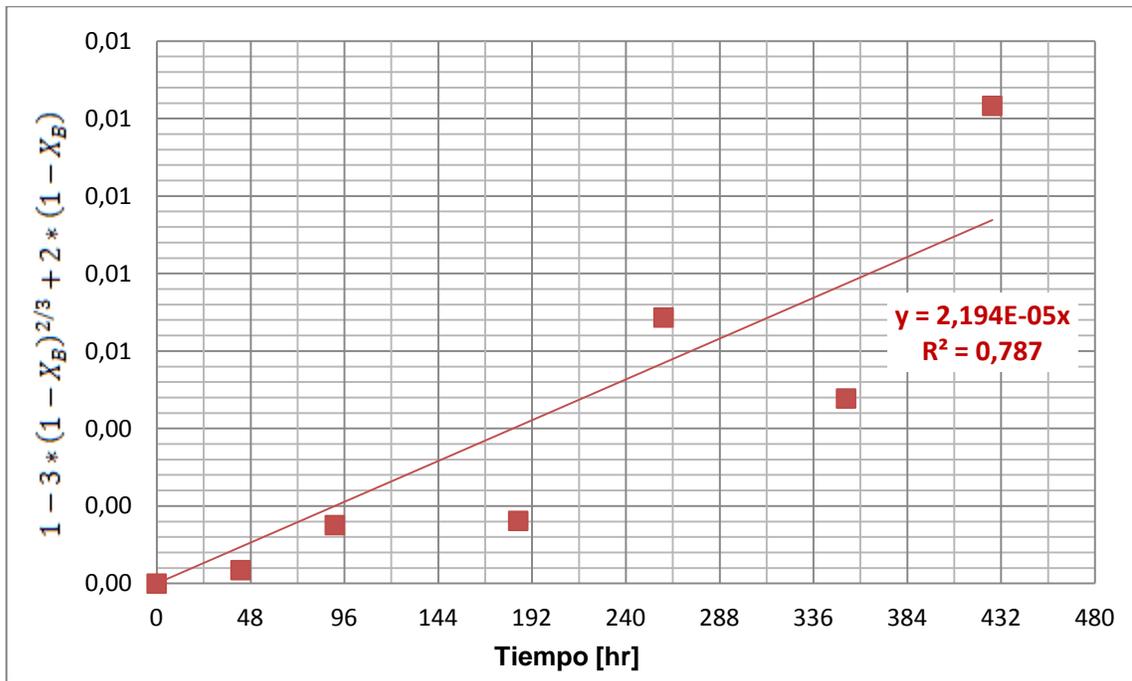


Gráfico 14: Modelo del Núcleo sin Reaccionar para los resultados de conversión de la reacción de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, considerando que el proceso está controlado por la difusión de los reactantes en la ceniza.

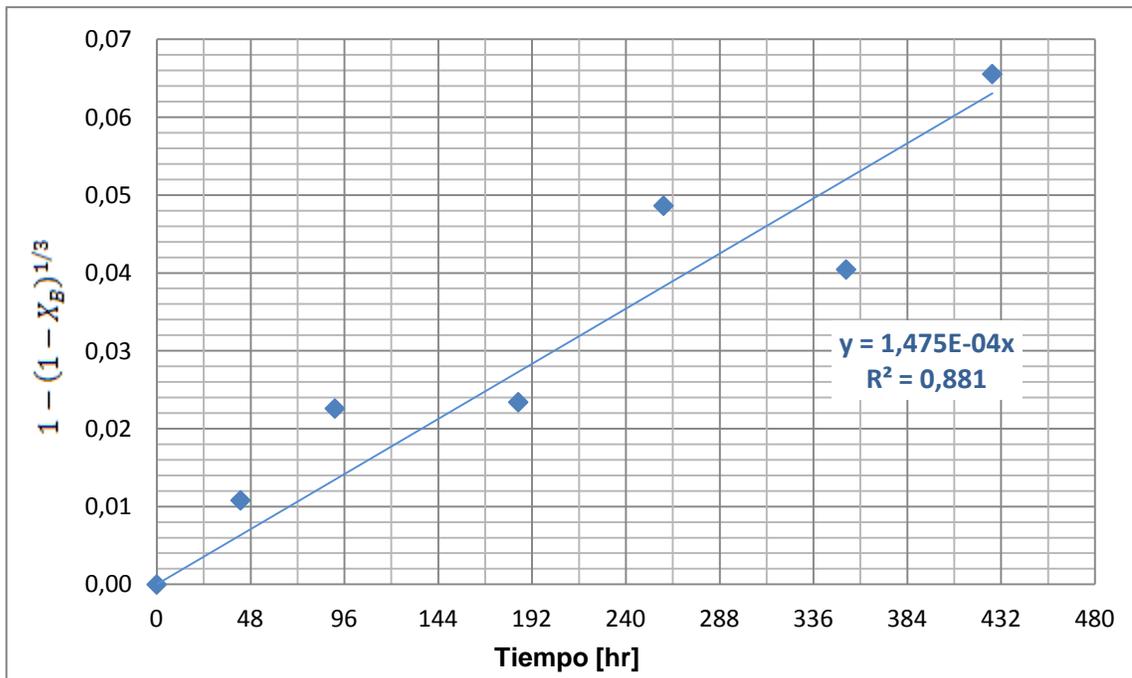


Gráfico 15: Modelo del Núcleo sin Reaccionar para los resultados de conversión de la reacción de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, considerando que el proceso está controlado por la reacción de biolixiviación.

De esta forma, se aprecia que la etapa limitante de la biolixiviación de pirita por *S. acidophilus* correspondería a la reacción de biolixiviación, puesto que la linealización de este modelo al utilizar los resultados de conversión en el tiempo, presenta el coeficiente de determinación más cercano a la unidad, con un  $R^2$  de 0,88. Por su parte, al considerar que la etapa controlante es la difusión de los reactantes a través de la ceniza, se obtuvo un  $R^2$  de sólo 0,79. Así, el modelo en que la etapa limitante es la reacción es el que mejor se ajusta a la evolución de la conversión que presentó el proceso de biolixiviación.

A partir de la pendiente entre la razón  $t/\tau$  estimada con el modelo del núcleo sin reaccionar en que hay control por la reacción y el tiempo transcurrido durante el proceso, se determinó que se tendría una disolución completa de la pirita al cabo de un  $\tau$  de 6780 horas, esto es, 283 días aproximadamente.

## 5.3 COMPARACIÓN DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA CON *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS* A 45°C Y *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* A 30°C

El comportamiento de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de pirita a 45°C se comparó con el que tuvo la bacteria mesófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* con el mismo mineral pero a una temperatura de 30°C, para lo que se utilizaron los datos del estudio realizado como trabajo de título por Maurice Andre Menadier Stavelot y que lleva por título “Biolixiviación de Piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y Cepas Nativas” (Menadier 2009).

El estudio de biolixiviación con *Acidithiobacillus ferrooxidans* se realizó con la misma muestra de pirita utilizada para la biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus*. Sin embargo, los cultivos de las bacterias mesófilas fueron mantenidos a una temperatura de 30°C, mientras que el de las termófilas moderadas a 45°C, debido a que a dichas temperaturas son las propicias para el desarrollo de dichos microorganismos. Junto con lo anterior, los cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* presentaban una concentración inicial de 2,4 [g/L] de ión férrico, mientras que los de *Sulfobacillus acidophilus* no contenían ión férrico sino ferroso en una concentración aproximada de 1 [g/L].

En el Gráfico 16 se muestra una comparación gráfica de la evolución del pH durante los procesos de biolixiviación de pirita con los dos microorganismos antes mencionados, en el que se hace evidente los diferentes valores que tuvo dicho parámetro.

En el caso de los cultivos con *Sulfobacillus acidophilus* se presentó una considerable alza del pH inicial desde 1,7 hasta 1,96 en sólo 17 horas, por lo que éste debió ser ajustado con ácido sulfúrico con el fin de evitar o disminuir la precipitación del ión férrico como hidróxidos o jarositas. Posteriormente, se mantuvo en torno a 1,6 hasta las 233 horas en que se observó una disminución a 1,55, posiblemente por la precipitación de hierro influenciada por la elevada temperatura del proceso y los altos valores de pH alcanzados.

Por su parte, el cultivo de biolixiviación por *Acidithiobacillus ferrooxidans* presentó un pH inicial de 1,57 el que luego disminuyó leve pero continuamente durante todo el proceso llegando a 1,51 a las 420 horas. Esto se atribuyó a la posible generación de ácido por la acción bacteriana o la formación de precipitados de hierro del tipo jarositas.

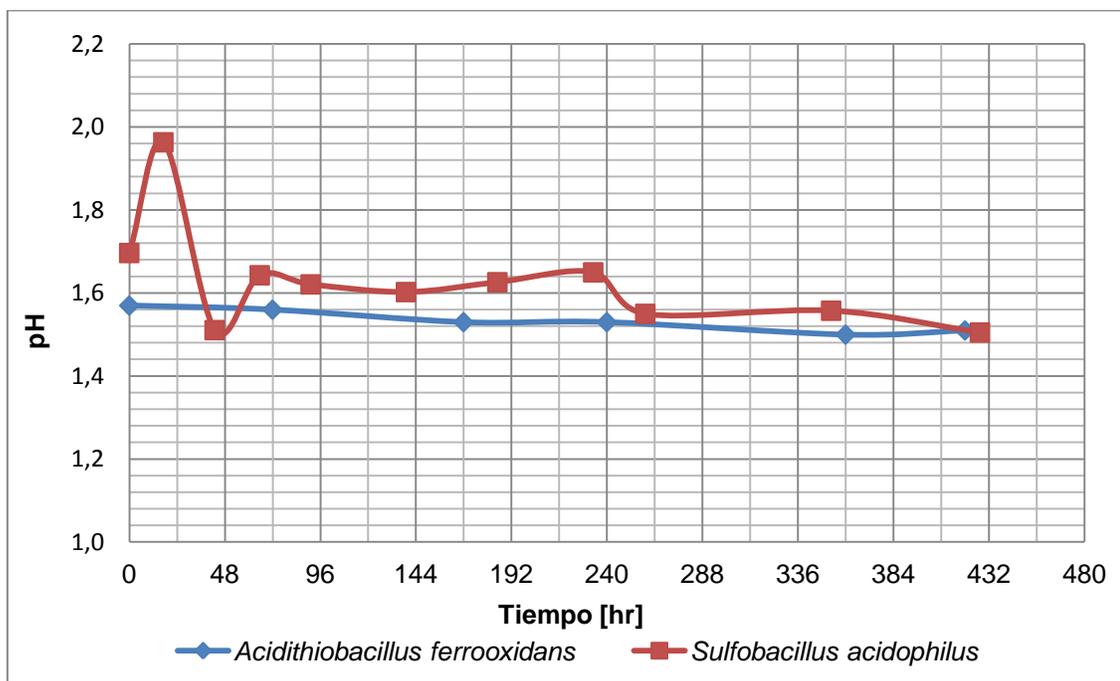


Gráfico 16: Comparación de la variación del pH durante los procesos de biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C y por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C.

En el Gráfico 17, se indican las variaciones del potencial electroquímico en el tiempo de los cultivos de biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C y por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, donde se puede observar que este último presentó un considerable aumento desde 353 a 622 [mV v/s Ag/AgCl] durante las primeras 17 horas, llegando a ser de 666 [mV v/s Ag/AgCl] a las 42 de iniciado el experimento, debido a la alta tasa de oxidación del ión ferroso por la presencia bacteriana. Posteriormente, dicho potencial descendió levemente llegando finalmente a ser de 629 [mV v/s Ag/AgCl].

Por su parte el cultivo con *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C presentó un Eh inicial de unos 670 [mV v/s Ag/AgCl], debido a que en el tiempo cero presentaba una alta concentración de ión férrico y ausencia de ferroso. Posteriormente, se observó un leve descenso de éste en las primeras horas de monitoreo, para luego mantenerse relativamente constante a lo largo del experimento, lo que se explica por la acción bacteriana puesto que los microorganismos presentes en el cultivo oxidaban el ión ferroso liberado por la disolución del mineral, manteniendo la relación férrico/ferroso.

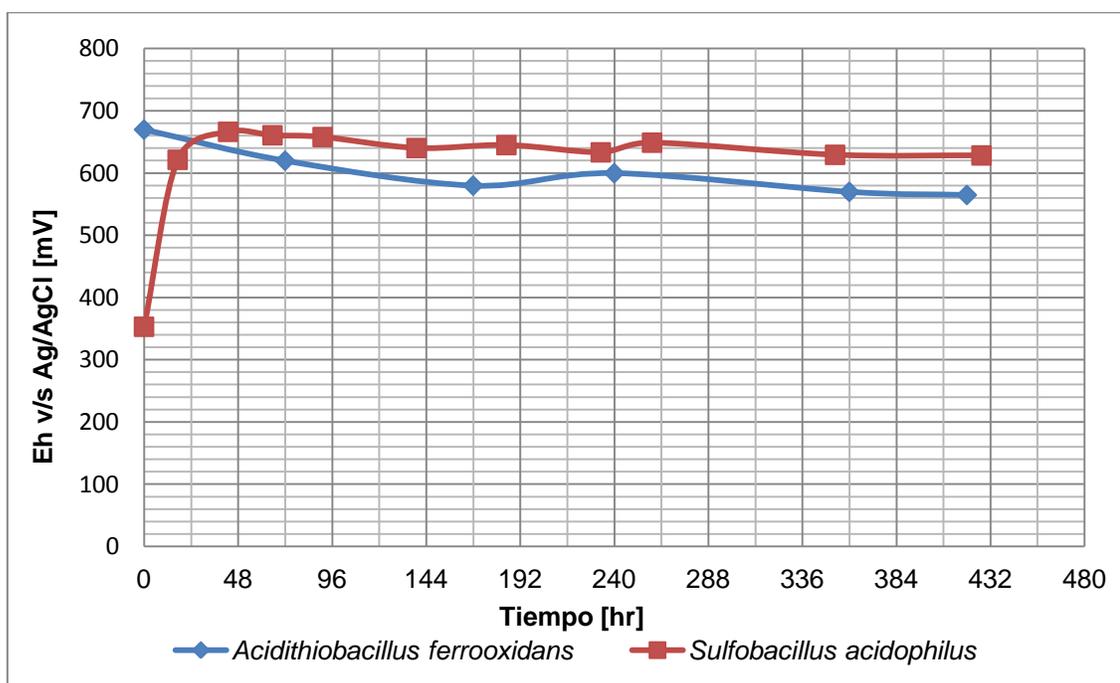


Gráfico 17: Comparación de la variación del potencial electroquímico durante los procesos de biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C y por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C.

Con el fin de analizar el efecto de la presencia de la bacteria mesófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* o de la termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* y de la temperatura utilizada para cada cultivo en la lixiviación de pirita, se comparó la disolución de hierro desde el mineral durante ambos procesos de biolixiviación.

Para lo anterior se determinó la evolución de la disolución de hierro desde la pirita utilizando el método de digestión con ácido clorhídrico, con el que se pudo disolver el hierro que se encontraba precipitado en la solución y sobre el mineral, midiendo en lo posible todo el hierro presente en la muestra; no obstante, el que se encontraba precipitado en las paredes del matraz no pudo ser recuperado y por tanto no fue medido. A dicha concentración de hierro total se le descontó la del ión ferroso agregado al inicio de la experiencia, la que tenía como fin propiciar el desarrollo inicial de los microorganismos, obteniéndose así el hierro disuelto en el cultivo de biolixiviación con *Sulfobacillus acidophilus*.

A partir de la cantidad de pirita en el cultivo de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, el porcentaje másico de hierro que ésta contenía y la estimación de la disolución de hierro desde el mineral, se evaluó la recuperación porcentual de hierro desde el mineral durante este proceso, la que se muestra en el Gráfico 18 junto a la recuperación que se obtuvo en el estudio de biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C y la del experimento control bajo las mismas condiciones que el anterior, pero sin inóculo bacteriano.

En el Gráfico 18 es posible observar para el cultivo de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, que la recuperación porcentual de hierro desde la pirita en el tiempo presentó el mismo comportamiento mostrado para el hierro disuelto desde el mineral, debido a que se calculó a partir de éste. Así, durante las primeras 91 horas se obtuvo un

considerable aumento en la recuperación llegando al 6,6% y luego de las 185 horas se volvió a registrar un incremento apreciable, llegando a obtenerse una recuperación de hierro final del 18,4%.

En cuanto a los experimentos realizados a 30°C se puede ver que la recuperación final de hierro desde el mineral en presencia de la bacteria mesófila fue de un 23%, siendo éste notoriamente diferente al experimento sin inocular en el que se recuperó un 12% a las 420 horas. Cabe mencionar que en el experimento control a 30°C se registró un incremento del potencial electroquímico al final de la experiencia, lo cual fue explicado como un posible desarrollo de microorganismos que se encontraban en estado de latencia en la muestra de pirita utilizada, dado que ésta no fue esterilizada para realizar el estudio. Dichos microorganismos podrían haber contribuido a un aumento en la disolución del mineral.

Al comparar la recuperación porcentual de hierro obtenida en los cultivos de biolixiviación, se apreció que con la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C se alcanzó un 11,6% menos de recuperación que con *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C.

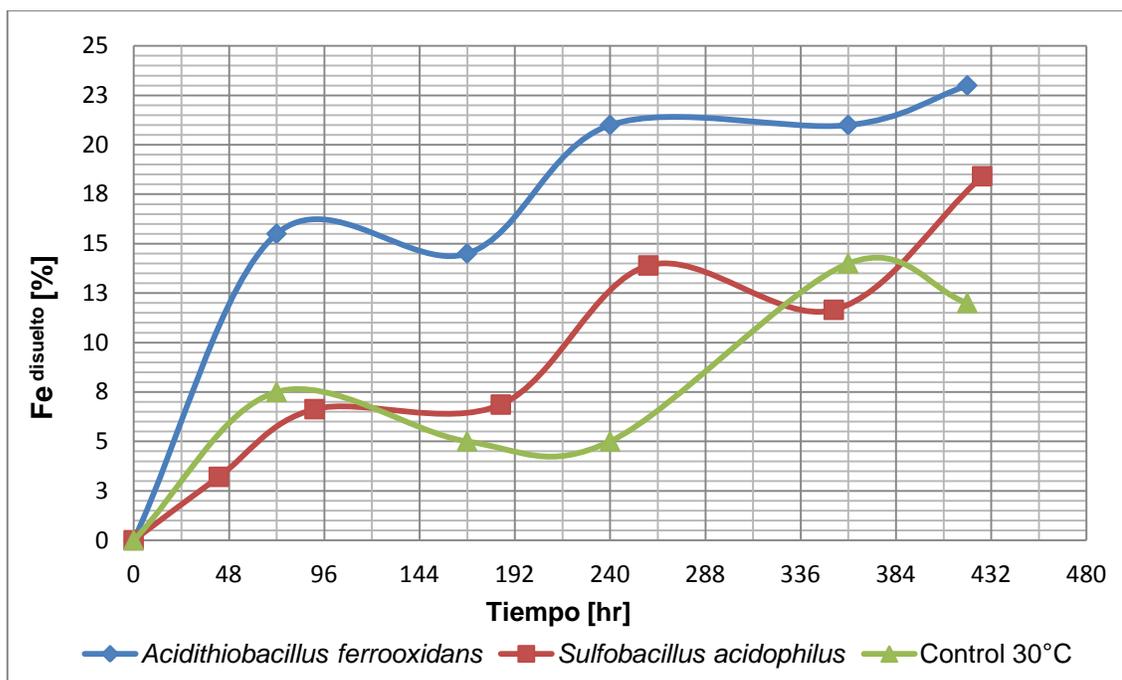


Gráfico 18: Evolución de la recuperación porcentual de hierro desde la pirita durante los procesos de biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C y por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, junto a la recuperación obtenida en un experimento control a 30°C el que no fue inoculado con microorganismos.

Por otro lado, se aplicó el modelo del núcleo sin reaccionar a las recuperaciones de hierro obtenidas en ambos cultivos de biolixiviación. Como se muestra en la Tabla 4, se determinó que el proceso de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C estuvo controlado principalmente por la reacción, con un  $R^2$  de 0,88 y que el tiempo requerido para una disolución completa del mineral sería de un  $\tau$  de 283 días. Por su parte, la biolixiviación por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C fue controlada por la difusión en la película con un  $R^2$  de

0,92 en donde el tiempo requerido para la lixiviación completa de la pirita es de un  $\tau$  de 833 días (Menadier 2009).

Tabla 4: Parámetros del Modelo del Núcleo sin Reaccionar para la Biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C y por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C.

Biolixiviación de Pirita	Etapa Controlante	Pendiente $t/\tau$	R <sup>2</sup>	$\tau$ [días]
Por <i>S. acidophilus</i> a 45°C	Reacción de Biolixiviación	1,48E-04	0,88	282,5
Por <i>At. ferrooxidans</i> a 30°C	Difusión en la Ceniza	1,20E-03	0,92	833,3

# 6 DISCUSIÓN

## 6.1 DISCUSIONES PARCIALES

### 6.1.1 CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS* SOBRE PIRITA

Como se mostró en el Gráfico 1, la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* presentó una alta capacidad de adherencia a la superficie de la pirita, llegando ésta a un 72% en las dos primeras horas. Dicho resultado muestra un importante aporte al mecanismo de biolixiviación por contacto, el cual es de suma importancia para la disolución de la pirita, debido a que es uno de los minerales de azufre reducido más estable y difícil de disolver por mecanismos electroquímicos (Tributsch 2001).

La rápida adherencia bacteriana podría llevar a lograr mayores tasas de lixiviación, como ha sido señalado en estudios anteriores donde se observó una directa relación entre la adherencia al mineral y la tasa de disolución. Esto se puede explicar por la rápida liberación de ión ferroso desde la pirita, siendo éste posteriormente oxidado por las bacterias que se encuentran libres en solución contribuyendo al desarrollo de éstas. Asimismo, el incremento en la tasa de lixiviación se puede generar por la acumulación de iones férricos en la capa de exopolímeros, conformada por sustancias poliméricas extracelulares que generan una mayor atracción electrostática entre los microorganismos y la superficie del mineral, produciéndose así un estrecho contacto entre ellos además de iniciar la disolución del mineral sulfurado (Rodríguez *et al.* 2003a).

Junto con lo anterior, la alta adherencia alcanzada por las bacterias *Sulfobacillus acidophilus* puede llevar a que una mayor superficie de la pirita sea cubierta con las sustancias extracelulares secretadas por los microorganismos adheridos y de esta forma lograr una mayor disolución. Lo anterior, se debe a que dicha capa de exopolímeros constituye una zona en que el agente extractor de electrones ( $\text{Fe}^{+3}$ ) se concentra en la superficie del mineral, además de ser propicia para el ataque electroquímico de éste (Rojas-Chapana y Tributsch 2004).

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados, la alta adherencia a la superficie de la pirita mostrada por la bacteria *Sulfobacillus acidophilus*, puede llevar a lograr mayores tasas de lixiviación del mineral mediante el mecanismo por contacto, que en presencia de un microorganismo con una capacidad de adherencia considerablemente menor.

## 6.1.2 BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA POR *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS* A 45°C

### 6.1.2.1 Análisis Físicoquímicos

El cultivo de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C presentó una importante alza en el pH de su solución, cambiando dicho valor de 1,7 a 1,96 en las primeras 17 horas, como se muestra en el Gráfico 2. El alza en el valor de pH registrada se debió a una disminución en la concentración de protones causada por la oxidación del ión ferroso a férrico. Lo anterior es apoyado por los resultados del Gráfico 6, en donde es visible un rápido descenso en la concentración del ión ferroso y el consecuente aumento del férrico.

En el cultivo de biolixiviación la tasa de oxidación del ión ferroso fue considerablemente mayor a la registrada en el experimento control, lo que se puede explicar por la acción hierro-oxidante de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* que rápidamente comenzó a oxidar el ión ferroso presente. De esta forma, las bacterias presentes en el cultivo obtienen la energía necesaria para su metabolismo y desarrollo, utilizando los protones presentes en la solución de lixiviación con el consiguiente aumento del pH.

Dado el inicial incremento del pH, éste fue ajustado a 1,6 a las 17 horas con el fin de evitar o reducir la generación de precipitados del ión férrico como hidróxidos o jarositas, los que además de disminuir la concentración de este agente lixivante, pueden cubrir la superficie del mineral formando barreras difusionales que retardan o impiden el contacto directo entre el agente lixivante y la superficie de la pirita, afectando así negativamente su disolución (Ballester 2005, Jian-nan *et al.* 2007).

Una vez que se ajustó el pH del cultivo de biolixiviación, éste tendió a mantenerse relativamente constante en torno a 1,6. Sin embargo, a las 259 horas se registró un mayor descenso en su valor llegando al final de la experiencia a ser de 1,51. Lo anterior indicaría que la generación de protones fue más rápida que su consumo, lo que puede ser explicado por una baja en la tasa de oxidación de ión ferroso, generada por una menor disolución desde el mineral, y al mismo tiempo a una mayor velocidad en la reacción que da origen a precipitados del ión férrico del tipo jarosita. Como lo muestra la Ecuación 7 de la sección 1.10 *Precipitación del Ión Férrico*, en la liberación de protones a la solución está involucrado el descenso del pH.

En el Gráfico 2 fue posible apreciar en el experimento control una leve alza del pH desde 1,77 a 1,81 durante las primeras horas, por lo que a las 19 horas fue ajustado el pH a 1,6 con ácido sulfúrico. Posteriormente, dicho valor se mantuvo relativamente constante en torno a 1,55 hasta las 353 horas donde subió a 1,61 para luego volver a disminuir hasta 1,5 al final del estudio. De esta forma, en el experimento control la tasa de consumo de protones por oxidación química del ión ferroso y la de generación de estos por disolución del mineral o formación de precipitados se mantuvo en un relativo equilibrio durante el proceso, sin embargo al igual que el cultivo de lixiviación se observaron periodos de descenso en el valor del pH de la solución, lo cual indicaría una posible generación de jarositas.

Como se mostró en el Gráfico 3, el proceso de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* presentó inicialmente un marcado incremento en su potencial electroquímico desde 353 a 622

[mV v/s Ag/AgCl] en las primeras 17 horas, alcanzando los 666 [mV v/s Ag/AgCl] a las 42 horas, para luego comenzar a mostrar un leve descenso en su valor llegando a ser éste de 629 [mV v/s Ag/AgCl] hacia el final del proceso. El alza observada puede haber sido ocasionada por una alta tasa de oxidación biológica del ión ferroso a férrico, esto sugerido por las concentraciones de dichos iones presentadas en el Gráfico 6, donde a diferencia del experimento control es apreciable un rápido descenso del ferroso e incremento del férrico. Por su parte, la caída del Eh indicaría una disminución de la razón férrico/ferroso, lo cual se puede deber a la precipitación del ión férrico originada por el incremento del pH al inicio del proceso.

Si bien en el experimento control decreció la concentración del ión ferroso, esto fue considerablemente más lento y en menor medida que ante la presencia de la bacteria, como se puede notar en el Gráfico 4. Asimismo, la evolución de su Eh muestra que este se mantuvo bajo durante todo el proceso, no superando los 428 [mV v/s Ag/AgCl]. Dicho potencial electroquímico da cuenta de que el hierro en la solución se encontraba principalmente como ión ferroso, a diferencia del cultivo con *S. acidophilus*, donde fue predominante el ión férrico.

En cuanto a la evolución de la concentración del hierro total en solución, mostrada en el Gráfico 5, durante 65 horas el cultivo con *Sulfobacillus acidophilus* mostró un aumento en la lixiviación de ésta, siendo mayor durante las primeras 17 horas. Una vez alcanzada una máxima concentración de 1126 ppm a las 65 horas, ésta comenzó a descender levemente hasta las 139 horas; a partir de las 233 horas dicha baja fue aún más pronunciada, llegando a una concentración de 904 ppm hacia el final del experimento. Por su parte, el experimento control presentó durante las primeras 19 horas sólo un incremento en el hierro total, siendo su máxima concentración 59 ppm menor que la del cultivo con la bacteria al mismo tiempo y 79 ppm más baja que la máxima lograda en presencia de *Sulfobacillus acidophilus*. Junto con esto, a partir de las 19 horas comenzó a disminuir su concentración de hierro en solución, manteniéndose en todo momento por debajo de la del cultivo de biolixiviación, llegando al final de la experiencia a ser de unas 789 ppm. Así, es posible apreciar que pese a que el pH fue ajustado para evitar o disminuir la precipitación del hierro, ésta de igual forma se pudo haber presentado durante el proceso de lixiviación de pirita a 45°C, tanto en presencia como ausencia de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus*. No obstante, en presencia del microorganismo fue posible mantener mayores concentraciones de hierro en solución, el que se encontraba principalmente como ión férrico, contribuyendo así probablemente a una mayor disolución del mineral.

Analizando en forma conjunta el Gráfico 5 y el Gráfico 2, es posible observar que en el cultivo de biolixiviación los momentos en que fue registrada una mayor disminución de la concentración del hierro total coincidieron con una caída del pH. Así, para ambos parámetros es posible ver un leve descenso a las 65 horas, siendo éste aún mayor a las 259 horas. Nuevamente, los resultados del estudio de biolixiviación de pirita mostraron que a lo largo del proceso el ión férrico fue precipitando, disminuyendo así la concentración de dicho ión y por consecuencia la del hierro total. Asimismo, estos resultados sugerirían que dichos precipitados fueron del tipo jarosita, lo que produjo la liberación de protones, lo que llevó al descenso del pH.

Lo anterior se vio reflejado en la evolución de la concentración de hierro precipitado representada en el Gráfico 6, la cual a partir de las 91 horas manifestó una continua alza llegando a estimarse que su concentración final fue de unas 512 ppm, no incluyendo ésta el hierro que se encontraba precipitado y adherido a las paredes de los matraces en que se realizó

el estudio debido a la dificultad que presentó su recuperación. Así la concentración real de hierro precipitado durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C puede haber sido significativamente mayor a la determinada.

Junto con lo anterior, en la Figura 4 las fotografías sacadas a los experimentos control y cultivos de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus*, evidencian por medio de la tonalidad que estos fueron adquiriendo durante el proceso una mayor disolución en presencia de la bacteria. Asimismo, en la Figura 5 dejan ver que dicho cultivo va adquiriendo un color ocre claro dado por la presencia de jarosita (Paipa 2004), que además de depositarse sobre el mineral se adhirió de forma significativa a las paredes del matraz, como lo revela la Figura 6.

Cómo se observó en el Gráfico 7, durante el proceso de biolixiviación se generaron hidróxidos y/o jarositas que fueron cubriendo las partículas de pirita. Si bien en las primeras horas del proceso los precipitados del ión férrico se encontraban principalmente sobre el mineral, a partir de las 192 horas se comenzó a registrar un aumento en la concentración de hierro precipitado en la solución de biolixiviación. Esto pudo haberse generado porque la mayor parte de las partículas de pirita ya se encontraban cubiertas por precipitados, y junto al movimiento rotatorio en que se mantuvieron los frascos con los cultivos, facilitaron que parte del ión férrico precipitado quedara suspendido en la solución. No obstante, durante todo el proceso se determinó una mayor concentración de hierro precipitado sobre el mineral que en la solución.

Si bien se pudo vislumbrar que la precipitación del ión férrico como jarosita no impidió del todo que la biolixiviación prosiguiese, ésta se vio retardada llegando a estimarse una disolución final de tan sólo 403 ppm, equivalente a una recuperación del 18,4% del hierro presente en el mineral. En el Gráfico 6 se aprecia que dicha concentración de hierro disuelto fue menor que la alcanzada por el hierro precipitado. Como se explicó anteriormente esto puede deberse a una menor estimación del hierro disuelto con respecto al real, pues parte del precipitado no fue recuperado, ni por lo tanto medido. Asimismo, se debe considerar que al inicio del proceso se agregó sulfato ferroso para ayudar al desarrollo inicial de los microorganismos, el que puede haber precipitado conjuntamente al hierro disuelto desde el mineral, haciendo así posible que la precipitación de hierro fuese mayor a su disolución.

En cuanto a la evolución de la disolución de azufre desde la pirita, como se puede observar en el Gráfico 9, durante las primeras 91 horas el cultivo de biolixiviación presentó un fuerte descenso en la concentración del sulfato medido, la que luego se mantuvo relativamente constante. Lo anterior discrepa de lo esperado, dado que se evidenció el inicio de la disolución de la pirita por medio de la concentración del hierro en solución, presumiendo de esta forma la consecuente alza en la concentración del azufre como sulfato. A pesar de esto, debe tomarse en cuenta que el método utilizado para evaluar el azufre en solución, sólo mide el que se encuentra como sulfato y no estados de oxidación intermedios. Por otra parte, la segunda medición de sulfato fue realizada a las 91 horas, por lo que puede haberse dado un aumento inicial en su concentración, pero al no haber sido medido no fue apreciable en la gráfica. Junto con lo anteriormente dicho, a las 91 horas ya se había comenzado a producir un descenso en la concentración del hierro en solución, así nuevamente se deja ver que la disminución del hierro puede haberse ocasionado por la precipitación de ión férrico en forma de jarosita, pues como se puede ver en la Ecuación 7, la reacción que le da origen conlleva el consumo de sulfato, reduciendo por tanto su concentración.

Debido al descenso en la concentración de azufre en el cultivo de biolixiviación, para poder comparar la disolución de éste con la obtenida en el experimento control, se estimó de forma teórica a partir del hierro disuelto el azufre como sulfato que se podría haber obtenido de no haber precipitado, teniendo éste por tanto una evolución en el tiempo similar a la mostrada para la disolución de hierro.

### 6.1.2.2 Análisis Biológicos

Los resultados obtenidos en el cultivo de biolixiviación de piritita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, respecto a la evolución de las bacterias totales planctónicas durante el proceso mostrada en el Gráfico 10, indican que durante las primeras 91 horas se produjo un crecimiento celular del tipo exponencial. Esto puede deberse a la capacidad hierro-oxidante de la bacteria, así como también a la presencia de ión ferroso al inicio del proceso, junto con extracto de levadura y sales tales como sulfato de amonio, sulfato de magnesio y fosfato potásico; así todos estos nutrientes habrían dado las condiciones propicias para su desarrollo inicial. Como es posible ver en el Gráfico 4, la bacteria *S. acidophilus* oxidó rápidamente el ión ferroso presente para obtener la energía requerida para su metabolismo y crecimiento, asimismo la piritita comenzó a ser disuelta desde tempranas horas, siendo liberados iones ferrosos que repusieron los oxidados, permitiendo así que continuase el crecimiento celular.

Junto con lo anterior, es posible advertir que el aumento en el número total de bacterias libres en solución se dio en mayor cantidad durante las primeras 42 horas, y que posteriormente éste desarrollo disminuyó levemente hacia las 91 horas. Dicho descenso en el crecimiento de bacterias planctónicas coincidió con el inicio en la disminución de la concentración de hierro total en solución mostrada en el Gráfico 5. Asimismo, entre las 91 y 185 horas se registró un incremento aún menor en el número de bacterias planctónicas, lo que puede indicar que habría comenzado a llegar a una fase estacionaria en el crecimiento bacteriano. Posteriormente se observó un descenso importante en el número de bacterias en solución, siendo dicha caída más pronunciada entre las 259 y 352 horas. Dicha disminución en las bacterias planctónicas apoya la idea de que debido a una importante precipitación de hierro durante estos periodos, las bacterias posiblemente fueron absorbidas o atrapadas en las partículas de precipitado, explicando así el menor recuento de bacterias registrado (Jian-nan *et al.* 2007).

Por otro lado, al evaluar la cantidad total de bacterias que se encontraba adherida a la superficie del mineral durante el proceso, se pudo observar en el Gráfico 12 que se estimaron  $9 \times 10^7$  bacterias a las 42 horas, cantidad significativamente menor a las  $4 \times 10^9$  bacterias esperadas considerando que el inóculo agregado al cultivo de biolixiviación fue de aproximadamente  $5,6 \times 10^9$  bacterias totales y que el experimento de adherencia de *Sulfobacillus acidophilus* a la piritita indicó que dentro de las primeras dos horas un 72% de las bacterias se adhiere al mineral. Asimismo, fue posible apreciar que la cantidad estimada de bacterias adheridas disminuyó considerablemente hasta las 185 horas, posteriormente se cuantificó una mayor cantidad siendo ésta siempre del orden de  $10^7$  bacterias totales.

El que se haya estimado un bajo número de bacterias adheridas a la superficie del mineral durante el proceso de biolixiviación y que dicha cantidad no se mantuvo relativamente

constante, sino que por el contrario presentó notables fluctuaciones, se puede deber a la dificultad que se tuvo para realizar los conteos de células en las muestras del mineral. Como se puede ver en la Figura 8, gran parte de la superficie de las partículas de pirita estaba cubierta por precipitados de hierro, bajo los cuales pueden haberse encontrado bacterias que de esta forma no fueron visibles en el microscopio de Epifluorescencia y por tanto no fueron contabilizadas.

### 6.1.2.3 Mecanismo de Biolixiviación de Pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C

Para determinar el mecanismo de biolixiviación de pirita por *S. acidophilus* se evaluó la evolución de la conversión de la reacción de biolixiviación y se hizo uso del modelo del núcleo sin reaccionar como una representación matemática del proceso. De acuerdo a los resultados mostrados en el Gráfico 15, se consideró que la etapa limitante en el proceso fue la reacción, pues así el modelo tienen un mejor ajuste a los resultados obtenidos con un  $R^2$  de 0,88, mientras que al suponer que la etapa limitante fue la difusión de los reactantes y productos de la reacción de biolixiviación en la ceniza, los datos se ajustaron con un coeficiente de determinación de sólo 0,77.

El que en la biolixiviación de pirita con la bacteria termófila moderada hubiese control por la reacción, indicaría ésta fue la etapa que más tiempo tardaba en el proceso. No obstante, otras etapas también pueden haber sido lentas, pero afectaron en menor grado al proceso de biolixiviación. Como se puede ver en la evolución de la concentración de hierro, el ión férrico fue precipitando como hidróxidos y/o jarositas, lo que produjo que la superficie del mineral fuese cubierta por dichos precipitados, dificultando así la difusión del ión férrico hacia el mineral, así como también la del ión ferroso disuelto ante el ataque electroquímico del férrico, lo que también llevaba a un retardo en la disolución. Una vez superadas las barreras difusionales causadas por los precipitados, se comenzaba a reactivar la disolución del mineral, la que en ese momento comenzaba a ser controlada por su velocidad de reacción.

Dado que el proceso de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C fue controlado principalmente por la reacción y que la bacteria mostró una alta capacidad hierro-oxidante y de adherencia a la superficie de la pirita, se puede inferir que el mecanismo de biolixiviación de *S. acidophilus* sería el cooperativo, donde tanto el mecanismo indirecto como el directo juegan un rol importante en la lixiviación de la pirita.

### 6.1.3 COMPARACIÓN DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE PIRITA POR *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS* A 45°C Y POR *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* A 30°C

El proceso de biolixiviación de pirita con la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C se comparó con el realizado en presencia de la bacteria mesófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* a una temperatura de 30°C. Este último estudio fue realizado anteriormente como trabajo de título por Maurice Andre Menadier Stavelot (Menadier 2009). Para lo anterior se evaluaron las evoluciones de los valores de pH, potenciales electroquímicos y recuperaciones de hierro desde la pirita, registradas durante el proceso de biolixiviación en presencia de cada una de las especies bacterianas.

En el Gráfico 16 es posible observar una notable diferencia en los valores de pH alcanzados en ambos cultivos, donde en presencia de *S. acidophilus* se manifestó un rápido incremento en dicho parámetro durante las primeras 17 horas, lo que puede haber sido causado por una alta tasa de oxidación del ión ferroso presente en el cultivo debido a la capacidad hierro-oxidante de esta bacteria. Pese a que el pH de este cultivo fue ajustado a 1,6 para evitar la precipitación del ión férrico, como se pudo ver en la evolución del hierro en solución mostrada en el Gráfico 6, ésta igual se presentó durante el proceso y de forma importante causando no sólo la disminución del hierro en solución, sino también impidiendo o retardando la disolución del mineral. Por su parte, el cultivo con *At. ferrooxidans* mantuvo su pH por debajo de 1,57 el que fue disminuyendo paulatinamente llegando a ser de 1,51 a final de la experiencia. Esto se puede haber producido pues inicialmente este cultivo de biolixiviación presentó hierro como ión férrico, por lo que la oxidación se dio sólo con el ión ferroso producido por la reducción del férrico y el que se liberaba por la lixiviación del mineral, siendo así más lenta la tasa de consumo de protones que causó el alza del pH en el cultivo con la bacteria termófilo moderada.

Lo anterior se vio reflejado en el potencial electroquímico de los dos cultivos, donde en presencia de *Sulfobacillus acidophilus* se observó un notable aumento durante las primeras 17 horas debido a la disminución de la concentración del ión ferroso y el consecuente incremento del férrico, el que luego de las 42 horas comenzó a mostrar un leve descenso por una menor concentración de ión férrico a causa de su precipitación. Por su parte, el cultivo con *Acidithiobacillus ferrooxidans* presentó inicialmente un alto Eh pues el hierro se encontraba principalmente en forma de ión férrico. Posteriormente éste bajó paulatinamente, hecho explicado por la acción bacteriana que permitió que el ferroso liberado por la disolución del mineral fuese oxidado a férrico, manteniéndose así la razón entre dichos iones.

Respecto a la disolución de la pirita lograda, como se pudo ver en el Gráfico 18 pese a que se esperaba que una mayor temperatura en el proceso llevara a lograr mayores tasas de lixiviación, la recuperación de hierro desde el mineral es en todo momento mayor para el proceso de biolixiviación por *At. ferrooxidans* a 30°C que ante la presencia de *S. acidophilus* y una temperatura de 45°C. De esta forma, se logró una recuperación final del 23% con el microorganismo mesófilo, mientras que con el termófilo moderado ésta alcanzó sólo el 18,4%. Sin embargo, en ambos casos se dio una mayor disolución del mineral que en el experimento control a 30°C donde ésta llegó a un 12%.

La mayor recuperación de hierro conseguida en el cultivo de biolixiviación de pirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C, puede deberse a que el cultivo con *Sulfobacillus acidophilus* fue mantenido a una mayor temperatura, lo que en conjunto con los mayores valores de pH registrados desde el inicio del proceso habrían propiciado el inicio de la precipitación del ión férrico, junto con aumentar la tasa de generación de dichos precipitados que cubrieron la superficie del mineral, formando así barreras difusionales para el ataque electroquímico del ión férrico y por tanto dificultando la lixiviación de la pirita (Rodríguez *et al.* 2003b, Ballester 2005).

Junto con lo anterior, de acuerdo a lo señalado por estudios anteriores es posible decir que la estrategia más propicia para la biolixiviación de la pirita es el mecanismo cooperativo. En éste mecanismo la tasa de disolución y la extracción final obtenida guardan directa relación con la concentración del ión férrico en la solución lixivante, el que es generado más rápidamente con microorganismos mesófilos que con termófilos. Esto coincide con que la mayor recuperación de hierro obtenida se dio con la bacteria mesófila *At. ferrooxidans* (Rodríguez *et al.* 2003a, Rodríguez *et al.* 2003b).

Sin embargo, se debe considerar que el cultivo de biolixiviación por *S. acidophilus* presentó durante todo el proceso una concentración de ión férrico considerablemente menor que el cultivo con *At. ferrooxidans*, siendo ésta inicialmente nula. Si bien la acción hierro-oxidante de la bacteria contribuyó a que aumentara rápidamente el férrico, su máxima concentración alcanzada fue de 1116 ppm, la que posteriormente decayó debido a su precipitación. Por su parte, el cultivo con la bacteria mesófila comenzó con ión férrico a una concentración de unas 2400 ppm, la cual fue mantenida relativamente constante durante el proceso gracias a que dicho microorganismo iba oxidando el ferroso disuelto desde el mineral y el producido por la reducción del ión férrico presente, como lo deja en evidencia la evolución del potencial electroquímico del cultivo de biolixiviación por *At. ferrooxidans*.

De acuerdo a los resultados de recuperación de hierro obtenidos y a la aplicación del modelo del núcleo sin reaccionar para representar el proceso de biolixiviación de pirita por *S. acidophilus*, éste estuvo controlado principalmente por la reacción. Así, el tiempo requerido para una disolución completa del mineral sería de un  $\tau$  de 283 días. Por su parte, la biolixiviación con *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C fue controlada por la difusión en la película con un  $R^2$  de 0,92 en donde el tiempo requerido para la lixiviación completa de la pirita es de un  $\tau$  de 833 días. De esta forma, se deja vislumbrar que la biolixiviación se ve favorecida con la presencia de la bacteria termófila moderada, la que disminuiría los tiempos de lixiviación del mineral. Sin embargo, de acuerdo a los resultados anteriormente analizados, posiblemente ésta no pudo ejercer en pleno su acción catalítica en la lixiviación de la pirita, esto debido a una importante precipitación del hierro sobre el mineral, por lo que los resultados de disolución obtenidos pueden corresponder a una lixiviación principalmente química, la que se vio favorecida por el incremento de la temperatura.

## 6.2 DISCUSIÓN GENERAL

El cultivo de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C evidenció la capacidad hierro-oxidante de esta bacteria, dada la alta tasa de oxidación biológica del ión ferroso percibida mediante un rápido incremento de los valores de pH y potencial electroquímico de las soluciones lixiviantes, así como también por el abrupto descenso de la concentración del ión ferroso y el consecuente aumento del férrico en solución, a diferencia del experimento control sin microorganismos donde la concentración del ión férrico no aumentó considerablemente manteniendo así un bajo Eh.

Junto con esto, se determinó que la bacteria termófila moderada *S. acidophilus* presenta una buena adherencia a la superficie de la pirita, llegando a ser ésta de un 72% en las dos primeras horas. Esta rápida adherencia sería propicia para lograr mayores tasas de lixiviación, así como también mostraría un importante aporte al mecanismo de lixiviación por contacto y por tanto a la disolución de la pirita, la que es uno de los minerales de azufre reducido más estables y difícil de disolver por mecanismos electroquímicos (Tributsch 2001, Rodríguez *et al.* 2003a).

Al observar la evolución de las concentraciones de hierro se apreció un temprano incremento en la concentración de hierro total en solución, el que partió en aproximadamente 1012 [mg/L] y llegó a unos 1126 [mg/L] a las 65 horas, para luego comenzar a descender debido a la precipitación del ión férrico como hidróxidos o jarositas. Pese a esto, las concentraciones de hierro total en la solución del cultivo con *S. acidophilus* en todo momento fueron mayores a las registradas en el experimento control sin bacterias, lo cual indicaría que con este microorganismo se logran mayores tasas de disolución de la pirita que en su ausencia.

Durante el proceso de biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, se percibió una importante precipitación del ión férrico, ocasionando la disminución de su concentración al igual que la del hierro total en la solución, lo que llevó a un aumento del hierro total precipitado afectando así la disolución del mineral.

Si bien se esperaba un aumento en la concentración de azufre como sulfato debido a la disolución del mineral, se apreció que éste bajó durante las primeras horas y no mostró un incremento posterior. Junto con ello, se observó que los periodos en que el hierro en solución descendía en mayor magnitud, se producía una caída en el valor del pH, además de la disminución de la tasa de disolución del mineral, y la velocidad de crecimiento bacteriano y/o el número total de bacterias planctónicas. De esta forma, se evidenció que el ión férrico estaba precipitando posiblemente como jarosita, cuya reacción de formación consume iones férricos y sulfato, libera protones que llevan al descenso del pH, y puede absorber o atrapar bacterias que se encuentren en la solución. Como se pudo ver en el Gráfico 7 y la Figura 6, dichos precipitados se depositaron tanto en la superficie del mineral como en las paredes de los matraces usados para los cultivos. La precipitación del ión férrico ya sea como jarositas o hidróxidos, puede haber provocado mayores barreras difusionales para el ataque electroquímico del ión férrico, y cubierto las bacterias que se encontraban adheridas a las partículas de pirita como se evidencia en la Figura 8 y el Gráfico 12, afectando así la recuperación final de hierro desde el mineral. De esta forma, se espera que de no haberse

producido tan importante precipitación del hierro, se habría logrado una mayor lixiviación de la pirita.

Dentro de los factores que pueden haber contribuido a la formación de precipitados de hierro está la alta temperatura del proceso, la cual llevaría a una mayor tasa de formación de los precursores de jarositas, así como también la acción conjunta de la oxidación biológica del sulfato ferroso y del consumo de protones por las bacterias presentes, la que favorece las reacciones de hidrólisis, junto con la formación de hidróxido férrico, un precursor de las jarositas. Además, durante el proceso de biolixiviación de la pirita se alcanzó dentro de las primeras horas un pH de 1,96 lo que puede haber dado origen a schwertmanita ( $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_6(\text{SO}_4)$ ), cuya precipitación se ve favorecida a pH sobre 1,9 y constituye un precipitado férrico meta-estable, que en presencia de iones tales como el amonio o el potasio se puede transformar en jarosita (Paipa 2004).

Junto con ello, algunos estudios han señalado la dificultad de evitar la precipitación de hierro como jarosita, debido a que se produciría desde bajas concentraciones de cationes monovalentes como el hidronio, amonio o potasio, así como también a bajos valores de pH y temperaturas llegando a registrarse su formación incluso a 25°C y pH 1 (Babcan 1971, Liddel y Bautista 1983). De esta forma, la alta temperatura en que fue mantenido el cultivo de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* y el que los pH registrados en él estuvieron entre 1,51 y 1,96, hicieron propicias las condiciones para la formación de precipitados del ión férrico.

Conjuntamente, las bacterias planctónicas presentes en la solución de lixiviación podrían actuar como centros de cristalización para las jarositas, lo que explicaría el descenso en el número total de bacterias libres en solución registrada en el proceso de biolixiviación. De esta forma, la presencia de bacterias planctónicas puede haber contribuido a extender el rango de precipitación de las jarositas a menores valores de pH y a disminuir los tiempos necesarios para la iniciación de la cristalización del precipitado, lo que llevaría a aumentar la tasa de precipitación del ión férrico (Dutrizac 1996, Jian-nan *et al.* 2007, Dutrizac 2008).

Del mismo modo, probablemente las sustancias extracelulares secretadas por las bacterias tienen un rol importante en la nucleación y crecimiento de los cristales de jarosita, lo que ayudaría a que se formara un importante precipitado sobre la superficie del mineral y sobre las bacterias adheridas a éste, como fue apreciable en la Figura 8, en la que gran parte de las partículas de pirita estaban cubiertas por precipitados y las bacterias eran difícilmente visibles (Sasaki *et al.* 1995, Sadowski 1999, Sasaki y Konno 2000).

Al evaluar la recuperación de hierro desde la pirita con el modelo del núcleo sin reaccionar, fue posible advertir que la biolixiviación de dicho mineral presenta un mayor rendimiento en cuanto al tiempo que se requiere para su completa disolución, en presencia de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* que con la mesófila *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El tiempo necesario para una lixiviación del 100% sería de un  $\tau$  de 283 días con el microorganismo termófilo moderado, y este aumentaría considerablemente hasta un  $\tau$  de 833 días en presencia de la bacteria mesófila. Asimismo, se logró establecer que el proceso de biolixiviación por *S. acidophilus* estaría controlado principalmente por la reacción, mientras que con *At. ferrooxidans* se tendría un predominante control por la difusión en la película.

Los resultados de recuperación porcentual de hierro desde el mineral mostraron que la mayor disolución de la pirita se logró en el cultivo de biolixiviación con el microorganismo mesófilo a 30°C siendo ésta de un 23%, mientras que con el termófilo moderado a 45°C se alcanzó tan sólo un 18,4%. Dichos resultados, se deberían posiblemente a que el cultivo con *Acidithiobacillus ferrooxidans* presentó durante todo el proceso una concentración de ión férrico considerablemente mayor a la del cultivo con *Sulfobacillus acidophilus*, generándose de esta forma una mayor disolución debido a que dicho ión es el principal agente lixivante de la pirita por el método indirecto. Junto con esto, la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* puede no haber ejercido plenamente su acción catalítica en la biolixiviación de la pirita, debido a que durante el proceso se produjo una importante precipitación del ión férrico, el que se depositaba sobre la superficie del mineral pudiendo formar barreras difusionales que impedían o retardaban su lixiviación, obteniéndose de esta forma menores tasas de disolución y por consecuencia una menor recuperación final.

Otro factor que puede haber llevado a la menor tasa de disolución de la pirita en el cultivo de biolixiviación por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, es el alto potencial que mantuvo la solución lixivante, el que estuvo entre los 621 y 666 [mV v/s Ag/AgCl] desde las 17 horas. Esto debido a que la biolixiviación de pirita es notablemente afectada por el estado de oxidación del hierro disuelto. Se ha observado que a Eh mayores a 650 [mV v/s Ag/AgCl] la capacidad oxidativa de la bacteria es inhibida por el ión férrico, por lo que no es posible incrementar la concentración de este, aunque se tenga disponible ión ferroso para ser oxidado. De esta manera, pueden haberse dado momentos en que el ión férrico precipitaba y no era repuesto, disminuyendo así su concentración y por tanto afectando el mecanismo indirecto en la lixiviación de la pirita (Rodríguez *et al.* 2003b, Collari 2011).

En cuanto al pH, se ha reportado que un valor óptimo de éste para el crecimiento de la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* es aproximadamente 2,0 (Norris *et al.* 1996). No obstante, estudios de biolixiviación de pirita a bajos pH, muestran que es posible el desarrollo y actividad bacteriana a menores pH, siendo 1,6 un adecuado valor para dicho parámetro, pues se produciría una menor precipitación del ión férrico como hidróxidos o jarositas. Es por lo anterior, que el presente estudio de biolixiviación de pirita por *S. acidophilus* se realizó con un pH en torno a 1,6; sin embargo, como se observó en el Gráfico 5, a partir de las 65 horas se registró una constante disminución en la concentración de hierro total en solución, causada por una considerable precipitación del ión férrico, la que llegó a ser de unas 113 ppm a las 352 horas, mientras que un cultivo de biolixiviación con esta bacteria termófila moderada, que se mantuvo a un pH entre 1,2 y 1,4 (cuyos resultados no son expuestos en el presente trabajo de título), mostró un continuo aumento en la concentración de hierro total en solución, llegando dicho incremento a ser de unas 347 ppm a las 459 horas.

Esto último, concuerda con estudios anteriores, en los que se vio que la biolixiviación era efectiva sólo cuando el pH de los cultivos se encontraba entre 1,2 y 1,5 e incluso hasta 1,0. Esto debido a que era posible el desarrollo de la bacteria a dichos valores de pH, continuando así la lixiviación del mineral, y que a pH mayores se formaban precipitados del ión férrico, los que generaban barreras difusionales y afectaban de esta forma la tasa de disolución del mineral, y por tanto la recuperación final de hierro desde el mineral (Yahya y Johnson 2002).

Debido a lo anterior, se recomienda mantener el pH de la solución lixivante entre 1,0 y 1,4, para de esta forma aumentar los tiempos necesario para el inicio de la formación de precipitados de hierro, junto con disminuir sus tasas de precipitación. Así, se podría ayudar a lograr mayores tasas de lixiviación y porcentajes de recuperación de hierro desde el mineral, sin pérdida de la actividad bacteriana, debido a que la bacteria *Sulfobacillus acidophilus* puede desarrollarse en ambientes tan ácidos como pH 1,0 (Yahya y Johnson 2002).

## 7 CONCLUSIONES

La capacidad hierro-oxidante de la bacteria termófila moderada *Sulfobacillus acidophilus* durante el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C, fue apreciable a partir de la evolución que tuvieron el pH y el potencial electroquímico, así como también las concentraciones de los iones ferroso y férrico. La biolixiviación de pirita por *S. acidophilus* presentó una alta tasa de oxidación del ión ferroso, comparativamente al experimento control que no fue inoculado con éste microorganismo. Asimismo, se determinó que la bacteria *S. acidophilus* posee una buena capacidad de adherencia a la superficie de la pirita, llegando a un 72% en dos horas.

Dada la alta capacidad hierro-oxidante y de adherencia a la superficie de la pirita de la bacteria termófila moderada *S. acidophilus*, así como también el que la precipitación del ión férrico haya afectado significativamente la disolución de dicho mineral, indican que el mecanismo de biolixiviación de pirita por *S. acidophilus* sería el mecanismo cooperativo, donde tanto el mecanismo indirecto como el directo juegan un rol importante en la lixiviación del mineral.

El proceso de biolixiviación de pirita por *S. acidophilus* a 45°C estuvo controlado principalmente por la reacción de biolixiviación, por lo que se requerirían unas 6780 horas, equivalentes a 283 días para la completa disolución del mineral.

Al comparar la biolixiviación de pirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C, con el proceso realizado por la bacteria mesófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* y a una temperatura de 30°C, se observó que con el microorganismo mesófilo se logró una mayor disolución del mineral llegando a un 23% de recuperación de hierro, mientras que en el cultivo con la bacteria termófila moderada se alcanzó tan sólo un 18,4% de recuperación.

La menor disolución de pirita lograda en el cultivo de biolixiviación por *S. acidophilus* se debió principalmente al alto grado de precipitación del ión férrico, que llevó a disminuir la concentración de este agente lixivante, además de producir barreras difusionales para su ataque electroquímico mediante el mecanismo de lixiviación directo. No obstante, en el proceso de biolixiviación de pirita a 45°C se obtuvo una mayor disolución del mineral en presencia de *S. acidophilus*, que en la lixiviación química, por lo que se considera que dicha bacteria contribuye a lograr mayores tasas de disolución de pirita.

Los precipitados del ión férrico generados no sólo disminuyeron el número de bacterias planctónicas, las que contribuían a la oxidación del ión ferroso disuelto desde el mineral, recuperando así el ión férrico, sino que también cubrieron tanto la superficie del mineral como a las bacterias adheridas a él y las sustancias extracelulares secretadas por ellas, afectando de esta forma el mecanismo de lixiviación por contacto debido a una mayor dificultad para concentrar en la capa de exopolímeros los iones férricos y liberar los iones ferrosos, lo que llevó a lograr menores tasas de lixiviación del mineral.

Debido a que la precipitación del ión férrico afecta considerablemente la tasa de lixiviación y la recuperación final de hierro desde el mineral, se recomienda mantener el pH de la solución lixivante entre 1,0 y 1,4 para así aumentar los tiempos necesario para el inicio de la formación de precipitados de hierro y disminuir sus tasas de precipitación. Lo anterior puede ayudar a lograr mayores tasas de lixiviación y porcentajes de recuperación de hierro del mineral sin pérdida de la actividad bacteriana.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

- Babcan, J. (1971). Synthesis of jarosite  $KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ . *Geoloski Zbornik* 22(2): 299–304.
- Ballester, A. (2005). Mecanismo de la Biolixiviación. En: *Fundamentos y Perspectivas de las Tecnologías Biomineras*. Editado por Acevedo F. y Gentina J.C. 1° Edición. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Valparaíso. 9-24.
- Bennett, J.C. y Tributsch, H. (1978). Bacterial Leaching Patterns on Pyrite Crystal Surfaces. *Journal of Bacteriology* 134:310-317.
- Bridget, T. y Johnson, D.B. (1998). Reduction of Soluble Iron and Reductive Dissolution of Ferric Iron-Containing Minerals by Moderately Thermophilic Iron-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2181-2186.
- Chandra, A.P. y Gerson, A. R. (2010). Review. The mechanism of pyrite oxidation and leaching: A fundamental perspective. *Surface Science Reports* 65:293-315.
- COCHILCO (2009). *Biolixiviación: Desarrollo Actual y sus Expectativas*, Comisión Chilena de Cobre. Dirección de Estudios y Políticas Públicas.
- COCHILCO (2010). *Informe de Tendencias del Mercado del Cobre 2011-2012*, Comisión Chilena de Cobre. Dirección de Estudios y Políticas Públicas.
- Collari, A. (2011). Estudio de Oxidación de ión Ferroso por *Sulfobacillus acidophilus* con uso de Celda Electroquímica. Memoria de Ingeniero Civil en Biotecnología. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile.
- Dutrizac, J.E. (1996) The effect of seeding on the rate of precipitation of ammonium jarosite and sodium jarosite. *Hydrometallurgy* 42:293-312.
- Dutrizac, J.E. (2008). Factors Affecting the Precipitation of Potassium Jarosite in Sulfate and Chloride Media. *Metallurgical and Materials Transactions B*. 39B: 771-783.
- Elberling, B. (2005). Temperature and oxygen control on pyrite oxidation in frozen mine tailings. *Cold Regions Science and Technology*. 41: 121-133.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. y Sand, W. (1998). Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology* 64(7):2743-2747.
- Jian-nan, D., Jian, G., Xue-ling, W., Cheng-gui, Z., Dian-zuo, W., Guan-zhou, Q. (2007). Jarosite-type precipitates mediated by YN22, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, and their influences on strain. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*. 17:1038-1044.

Levenspiel, O. (1987). Ingeniería de las Reacciones Químicas. 2° Edición, México, Reverté Ediciones S.A. p 397 - 411.

Liddell, K. y Bautista, R. (1983). A partial equilibrium model to characterize the precipitation of ferric ion during the leaching of chalcopyrite with ferric sulfate. Metallurgical Transactions B 14B: 5-15.

Lindström, E.B., Carlson, L., Hallberg, K.B. y Tuovinen, O. H. (1992). Solid- Phase products of bacterial oxidation of arsenal pyrite. Applied and Environmental Microbiology 58(3):1046-1049.

Menadier, M. (2009). Biolixiviación de Piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y Cepas Nativas. Memoria de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile.

Muir, M.K. y Anderson, T.N. (1997). Determination of ferrous iron in copper process metallurgical solutions by o-phenanthroline colorimetric method. Metallurgical And Materials Transactions B 8(2):517-518.

Ndlovu, S. y Monhemius, A.J. (2005). The influence of crystal orientation on the bacterial dissolution of pyrite. Hydrometallurgy 78:187-197.

Norris, P., Clark, D., Owen, J. y Waterhouse, S. (1996). Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. Microbiology 142: 775-783.

Paipa, C. (2004). Estudio Cinético de la Precipitación de Jarositas en el Sistema  $Fe_2(SO_4)-H_2O-H_2SO_4-M_2SO_4$  a 70°C. Tesis de Doctorado en Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago, Universidad de Chile.

Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R. (2002). Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria Applied and Environmental Microbiology 68:3094-3101.

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

Pradhan, N., Nathsarma, K.C., Srinivasa Rao, K., Sukla, L.B. y Mishra, B.K. (2008). Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. Minerals Engineering 21: 355-365.

Rodríguez, P. (2007). Estudio de la Expresión de Proteínas en *Sulfolobus Metallicus* durante la Biolixiviación de Calcopirita. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago, Universidad de Chile. Ingeniero Civil en Biotecnología.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blásquez, M.L., González, F. y Muñoz, J.A. (2001). La biolixiviación al comienzo del siglo XXI. Revista de Metalurgia 37: 616-627.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blásquez, M.L., González, F. y Muñoz, J.A. (2003a). Study of Bacterial Attachment During the Bioleaching of Pyrite, Chalcopyrite, and Sphalerite. *Geomicrobiology Journal* 20:131-141.

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

Rojas-Chapana, J., Giersing, M. y Tributsch, H. (1995). Sulfur colloids as temporary energy reservoirs for *Thiobacillus ferrooxidans* during pyrite oxidation. *Archives of Microbiology* 163:352-356.

Rojas-Capana, J., y Tributsch, H. (2001). Biochemistry of sulfur extraction in bio-corrosion of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 59:291-300.

Rojas-Capana, J., Tributsch, H. (2004). Interfacial activity and leaching patterns of *Leptospirillum ferrooxidans* on pyrite. *Microbiology Ecology* 47:19-29.

Sadowski, Z. (1999). Adhesion of microorganism cells and jarosite particles on the mineral surface. *Process Metallurgy* 9:393-398.

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

Sasaki, K., Tsunekawa, M. y Konno, H. (1995). Characterization of argentojarosite formed from biologically oxidized Fe<sup>+3</sup> ions. *The Canadian Mineralogist* 33: 1311-1319.

Sasaki, K. (1997) Raman study of the microbially mediated dissolution of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *The Canadian Mineralogist* 35: 999-1008.

Sasaki, K. y Konno, H. (2000). Morphology of jarosite-group compounds precipitated from biologically and chemically oxidized Fe ions. *The Canadian Mineralogist* 38:45-56.

Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59: 177-185.

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

# 9 ANEXOS

## 9.1 ANEXO A: REACCIONES SÓLIDO-FLUIDO

Las reacciones sólido fluido son reacciones heterogéneas en las que un gas o líquido se pone en contacto con un sólido reaccionando con él y transformándolo en el producto. En el caso que las partículas sólidas contengan gran cantidad de impurezas que queden adheridas como ceniza o si estas forman un producto material consolidado sólido o fluido-sólido, éstas no cambiarán de tamaño; mientras que éste disminuirá cuando se forme una ceniza no adherente o un producto no consolidado (Levenspiel 1987).

Las reacciones heterogéneas son numerosas y de gran importancia industrial. Algunas de las reacciones en que no cambia considerablemente el tamaño del sólido durante la reacción son la tostación u oxidación, la preparación de metales a partir de sus óxidos por reacción en atmósfera reductora y la protección de superficies sólidas por procesos tales como la electrodeposición de metales, entre otras. Se puede nombrar como ejemplos en que varía el tamaño del sólido las reacciones de sustancias carbonosas, las de tiosulfato sódico a partir de azufre y sulfito sódico, las de disolución, el ataque de metales por ácidos y la oxidación del hierro (Levenspiel 1987).

El transcurso de una reacción puede ser representado matemáticamente dada su ecuación cinética por un modelo, el cual deber representar de la forma más precisa y sin demasiada complicación matemática el proceso real.

Se consideran dos modelos idealizados para las reacciones no catalíticas de las partículas sólidas con el fluido que les rodea, estos son: la conversión progresiva y el del núcleo sin reaccionar. Donde en el primero de estos, se considera que el líquido reaccionante penetra y reacciona simultáneamente en toda la partícula sólida, aunque no necesariamente a igual velocidad en los distintos lugares de ésta; de esta forma el reactante sólido se está convirtiendo continua y progresivamente en toda la partícula.

Por su parte, en el modelo del núcleo sin reaccionar la reacción tiene primero lugar en la superficie exterior de la partícula sólida, luego se desplaza hacia el interior del sólido, dejando atrás el material convertido y sólido inerte llamado *ceniza*. Así, en el transcurso de la reacción existe un núcleo de la partícula sólida que no ha reaccionado y cuyo tamaño va disminuyendo conforme ocurre la reacción. Dicho modelo en la mayoría de los casos representa con mayor aproximación el comportamiento real.

### 9.1.1 MODELO DEL NÚCLEO SIN REACCIONAR

Este modelo considera que durante la reacción se presentan sucesivamente cinco etapas, las cuales son (Levenspiel 1987):

- Etapa 1: Difusión de los reactivos lixiviantes ( $H^+$  y  $Fe^{+3}$ ) hasta la superficie del sólido a través de la película de fluido o capa límite que le rodea.
- Etapa 2: Penetración y difusión de los reactivos lixiviantes a través de la capa de ceniza hasta la superficie que no ha reaccionado o superficie de reacción.
- Etapa 3: Reacción de los reactivos lixiviantes con el sólido en la superficie de reacción.
- Etapa 4: Difusión de los productos solubles de la reacción ( $Fe^{+2}$ ) a través de la capa de cenizas hacia la superficie exterior del sólido.
- Etapa 5: Difusión de los productos solubles de la reacción hasta el seno del fluido a través de la capa límite.

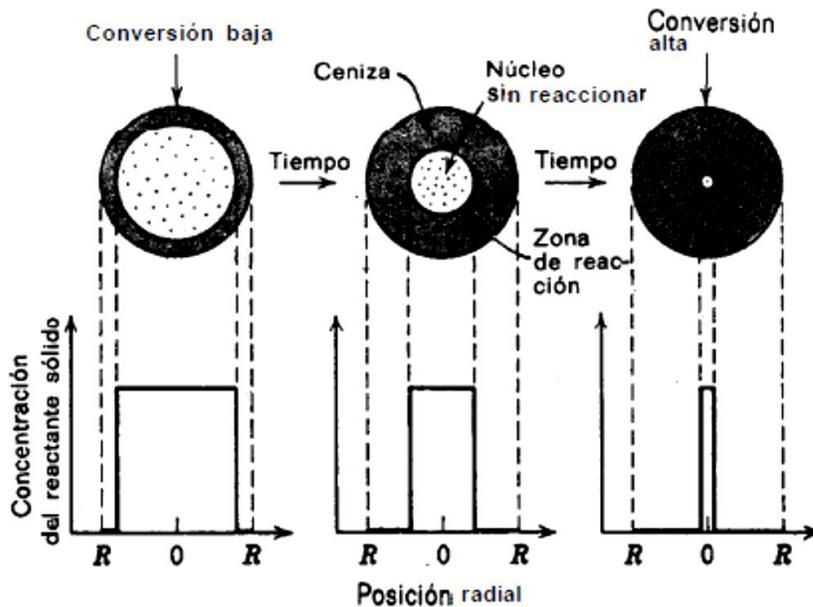


Figura 9: Esquema de proceso de lixiviación en el tiempo según modelo de núcleo sin reaccionar (Levenspiel 1987).

Dado que las resistencias de las distintas etapas suelen ser muy diferentes, debe tenerse en cuenta que aquella etapa que presente mayor resistencia constituye la etapa controlante de la velocidad de reacción.

La conversión alcanzada por la partícula ( $X_B$ ) en un tiempo ( $t$ ) en función del radio de la partícula sólida ( $R$ ) que durante la reacción es constante y del radio del núcleo sin reaccionar ( $r_c$ ) que va disminuyendo con la acción de los agentes lixiviantes, está dada por:

$$X_B = 1 - \left(\frac{r_c}{R}\right)^3 \quad (\text{Ec. 9})$$

Cuando el radio del núcleo llega a cero, se tiene una conversión del 100% habiendo transcurrido un tiempo ( $\tau$ ), donde dicho tiempo depende de la resistencia que controla la reacción.

Las ecuaciones de conversión para partículas esféricas de tamaño constante según el modelo del núcleo sin reaccionar y la etapa controlante se indican a continuación:

- Difusión a través de la película:

$$\frac{t}{\tau} = X_B, \text{ donde } \tau = \frac{\rho_B * R}{3 * b * k_g * C_{Ag}} \quad (\text{Ec.10})$$

- Difusión a través de la ceniza:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - 3 * (1 - X_B)^{2/3} + 2 * (1 - X_B), \text{ donde } \tau = \frac{\rho_B * R^2}{6 * b * D_e * C_{Ag}} \quad (\text{Ec. 11})$$

- Reacción química:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - (1 - X_B)^{1/3}, \text{ donde } \tau = \frac{\rho_B * R}{b * k_s * C_{Ag}} \quad (\text{Ec.12})$$

Los parámetros de dichas ecuaciones son: la densidad molar del sólido ( $\rho_B$ ) y su constante estequiométrica ( $b$ ), donde en el caso en estudio corresponde a la pirita en la reacción de lixiviación; la concentración del reactante en la superficie del mineral ( $C_{Ag}$ ); el coeficiente de difusión efectiva del reactante en la ceniza ( $D_e$ ); el coeficiente de transferencia de masa entre el fluido y la partícula sólida ( $k_g$ ) y el coeficiente cinético de primer orden para la reacción en la superficie ( $k_s$ ).

## 9.2 ANEXO B: TRATAMIENTO Y ANÁLISIS MATEMÁTICOS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

### 9.2.1 AJUSTE DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN

Los valores de las concentraciones de hierro y sulfato determinadas al realizar los monitoreos a los cultivos de biolixiviación y experimentos control deben ser ajustadas, esto debido a que para realizar las mediciones era necesario sacar un determinado volumen de la solución de los matraces, el que se recuperaba añadiendo medio de cultivo basal estéril a pH 1,6 para mantener así un volumen total de 100 ml. Lo anterior implica una consecuente dilución de estos parámetros en estudio, por tanto para determinar la concentración real de estos se debe agregar matemáticamente la cantidad eliminada al tomar la muestra.

En las siguientes ecuaciones se muestra el ajuste para las concentraciones de hierro total y ferroso, utilizando para ello las concentraciones determinadas por el método de la orto-fenantrolina en un determinado tiempo ( $[Fe]_{t+1}^{medido}$ ), la concentración real en el tiempo anterior ( $Fe_t^{real}$ ), el volumen de muestra sacado desde la solución ( $V_{muestra}$ ) y el volumen total en los matraces ( $V_{total\ matraz}$ ) correspondiente a 100 ml.

$$[Fe^{total}]_{t+1}^{real} = [Fe^{total}]_{t+1}^{medido} + \frac{[Fe^{total}]_t^{real} * V_{muestra}}{V_{total\ matraz}} \quad (Ec.13)$$

$$[Fe^{+2}]_{t+1}^{real} = [Fe^{+2}]_{t+1}^{medido} + \frac{[Fe^{+2}]_t^{real} * V_{muestra}}{V_{total\ matraz}} \quad (Ec.14)$$

Para determinar la concentración de ión férrico en solución ( $[Fe^{+3}]_t^{real}$ ), se utilizan las concentraciones de ión ferroso ( $[Fe^{+2}]_t^{real}$ ) y de hierro total ( $[Fe^{total}]_t^{real}$ ), este último correspondiente a las concentraciones de ferroso y férrico en solución.

$$[Fe^{+3}]_t^{real} = [Fe^{total}]_t^{real} - [Fe^{+2}]_t^{real} \quad (Ec.15)$$

El porcentaje de recuperación de hierro desde la pirita ( $\% Fe_{recuperado}$ ) a causa de la disolución de este mineral, se determina utilizando la concentración de hierro total ( $[Fe^{disuelto}]_{final}$ ), como ferroso, férrico y férrico precipitado al final del estudio, para estimar a qué porcentaje corresponde esta disolución con respecto a la cantidad inicial en la muestra de

mineral utilizada, la que corresponde a la ponderación entre la masa de mineral usada ( $Masa\ Pirita_{inicial}$ ) y el porcentaje másico de hierro que esta contiene ( $\%Fe_{pirita}$ ). De esta forma se tiene:

$$\% Fe_{recuperado} = \frac{[Fe^{disuelto}]_{final} * V_{total\ matraz}}{Masa\ Pirita_{inicial} * \%Fe_{pirita}} * 100 \quad (Ec. 16)$$

El ajuste de la concentración de sulfato en solución implica agregar el que se saca al tomar la muestra ( $[SO_4^{-2}]_t^{real}$ ), y restar el que se agrega con el medio de cultivo basal añadido para compensar el volumen de solución extraído ( $[SO_4^{-2}]_{t=0}^{real}$ ).

$$[SO_4^{-2}]_{t+1}^{real} = [SO_4^{-2}]_{t+1}^{medido} + \frac{([SO_4^{-2}]_t^{real} - [SO_4^{-2}]_{t=0}^{real}) * V_{muestra}}{V_{total\ matraz}} \quad (Ec. 17)$$

Junto con lo anterior, se puede estimar la disolución de azufre como sulfato desde el mineral de forma teórica de acuerdo a la reacción de disolución del mineral indicada en la Ecuación 6 de la sección 1.7.1 *Mecanismo de Lixiviación Indirecta*, donde por cada mol de pirita disuelta se libera un átomo de hierro y dos moléculas de sulfato. De esta forma, la concentración teórica de sulfato en un cierto tiempo ( $[SO_4^{-2}]_t^{disuelto\ teórico}$ ) está dada por dos veces la concentración de hierro disuelto ( $[Fe^{disuelto}]_t$ ) ponderada por la razón entre el peso molecular del sulfato y el peso atómico del hierro, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$[SO_4^{-2}]_t^{disuelto\ teórico} = 2 * [Fe^{disuelto}]_t * \left( \frac{PM_{SO_4^{-2}}}{PM_{Fe}} \right) \quad (Ec. 18)$$

## 9.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ADHERENCIA BACTERIANA AL MINERAL

Como se menciona en la sección 4.4.1 *Determinación de la Capacidad de Adherencia Bacteriana al Mineral*, para estudiar la adherencia de la bacteria al mineral, se calcula a diferentes tiempos la concentración de células en solución mediante recuento directo de bacterias usando para ello un microscopio de contraste de fase y una cámara de recuento Petroff-Hausser. Son contadas las bacterias de cada muestra unas cinco veces en distintos cuadrados de la cámara de recuento, dichas cantidades son promediadas y el valor resultante correspondiente a  $\overline{Bacterias}_t^{contadas}$  se multiplica por  $1,25 \times 10^6$  o  $2,00 \times 10^7$ , según se haya realizado el conteo en cuadros grandes o pequeños respectivamente. La cantidad total de bacterias en la solución ( $Bacterias_t^{totales}$ ) corresponde al producto entre la concentración de bacterias determinada y el volumen de la solución en el matraz ( $V_{total\ matraz}$ ).

Las siguientes ecuaciones muestran el cálculo de bacterias totales para el conteo realizado en cuadro grande y chico respectivamente:

$$Bacterias_t^{totales} = \overline{Bacterias_t^{contadas}} * (2 * 10^7) * V_{total\ matraz} \quad (Ec. 19)$$

$$Bacterias_t^{totales} = \overline{Bacterias_t^{contadas}} * (1,25 * 10^6) * V_{total\ matraz} \quad (Ec. 20)$$

A partir del cálculo de bacterias totales en la muestra para un determinado tiempo ( $Bacterias_t^{totales}$ ) y el inicial ( $Bacterias_{t=0}^{totales}$ ) se evalúa la capacidad de adherencia bacteriana al mineral, la que está dada por:

$$\% Adherencia_t = \frac{Bacterias_{t=0}^{totales} - Bacterias_t^{totales}}{Bacterias_{t=0}^{totales}} * 100 \quad (Ec. 21)$$

### 9.2.3 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS PLANCTÓNICAS Y ADHERIDAS

Dado que para realizar los monitoreos de los cultivos de lixiviación se debió retirar un determinado volumen de la solución en el que eran también extraídas bacterias planctónicas, se debe ajustar matemáticamente la cantidad total de dichas bacterias para un cierto tiempo ( $Bact. P_t^{totales\ reales}$ ). Para lo anterior se debe considerar las células que fueron eliminadas al tomar las muestras, correspondiente a la sumatoria del producto de la concentración de bacterias hasta el tiempo anterior ( $[Bact. P_t^{totales}]$ ) y el volumen de muestra extraído para cada monitoreo ( $V_i^{muestra}$ ), de esta forma la cantidad de bacterias planctónica reales queda:

$$Bact. P_t^{totales\ reales} = [Bact. P_t^{totales}] * V_{total\ matraz} + \sum_{i=0}^{i=t-1} [Bact. P_t^{totales}] * V_i^{muestra} \quad (Ec. 22)$$

Donde, la concentración total de bacterias planctónicas en un tiempo ( $[Bact. P_t^{totales}]$ ) está dada por el promedio de bacterias contadas por área de mineral ( $\overline{[Bact. P]_{\acute{a}rea}}$ ), multiplicado por un factor para la conversión a concentración volumétrica ( $\alpha_{\acute{a}rea/volumen} = 1,734 * 10^7$ ), y dividido por el volumen de la muestra de la solución tomada para la fijación de las bacterias en solución a la membrana de policarbonato ( $V_{muestra\ DAPI}$ ), como se indica a continuación:

$$[Bact. P_t^{totales}] = \frac{\overline{[Bact. P]_{\acute{a}rea}} * \alpha_{\acute{a}rea/volumen}}{V_{muestra\ DAPI}} \quad (Ec. 23)$$

A partir de los datos de la cantidad de bacterias planctónicas reales se determina la velocidad máxima de crecimiento de *Sulfobacillus acidophilus* en un cultivo de biolixiviación de pirita, considerando para ello que durante la primera etapa el desarrollo bacteriano se encuentra en la fase exponencial de crecimiento de un cultivo batch. Luego, el logaritmo de la razón entre las bacterias totales en un cierto tiempo ( $Bact.P_t^{totales\ reales}$ ) y la cantidad inicial de ésta ( $Bact.P_{t=0}^{totales\ reales}$ ) es igual a la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) por el tiempo de cultivo. Así, realizando una linealización de dichos datos se obtiene la máxima velocidad de crecimiento, correspondiente a la pendiente de dicha recta como se aprecia en la ecuación a continuación:

$$\ln\left(\frac{Bact.P_t^{totales\ reales}}{Bact.P_{t=0}^{totales\ reales}}\right) = \mu_{max} * t \quad (Ec. 24)$$

Para determinar la cantidad de bacterias adheridas al mineral se debe calcular la superficie total disponible para el crecimiento bacteriano, esto a partir de la estimación del área promedio de las partículas del mineral, la que es obtenida a partir de la evaluación de éstas en el microscopio de Epifluorescencia, colocando una gradilla ocular de 1 mm<sup>2</sup> con divisiones internas cada 1 µm. Considerando que el área promedio de las partículas evaluadas corresponde a la de un círculo, se estima el radio de las partículas ( $A_{circular}^{part. pirita}$ ) desde:

$$A_{circular}^{part. pirita} = \pi * r_{part. pirita}^2 \quad (Ec. 25)$$

Con dicho radio se calcula el área esférica ( $A_{esférica}^{part. pirita}$ ) y volumen esférico ( $V_{esférico}^{part. pirita}$ ) de una partícula del mineral, según:

$$A_{esférica}^{part. pirita} = 4 * \pi * r_{part. pirita}^2 \quad (Ec. 26)$$

$$V_{esférico}^{part. pirita} = \frac{4}{3} * \pi * r_{part. pirita}^3 \quad (Ec. 27)$$

Luego, el área total de mineral disponible ( $A_{total}$ ) está dada por la masa de pirita en la muestra ( $m_{pirita}$ ), la densidad promedio de ésta ( $\rho_{pirita}$ ), el área y volumen esféricos de la partícula, según:

$$A_{total} = \frac{m_{pirita}}{\rho_{pirita}} * \frac{A_{circular}^{part. pirita}}{V_{esférico}^{part. pirita}} \quad (Ec. 28)$$

Así, la cantidad de bacterias totales adheridas al mineral ( $Bacterias_t^{totales\ adheridas}$ ) se calcula con el promedio de bacterias por área de pirita ( $Bact\ totales_t^{área}$ ) y el área total del mineral, como se muestra en la ecuación a continuación:

$$Bacterias_t^{totales\ adheridas} = Bact\ totales_t^{área} * A_{total} \quad (Ec. 29)$$