



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

BIOLIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA POR *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS*

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

DANIELA ANDREA BRAVO SALINAS

PROFESOR GUÍA:
BLANCA ESCOBAR MIGUEL

MIEMBROS DE LA COMISIÓN
TOMÁS VARGAS VALERO
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

SANTIAGO DE CHILE
Enero, 2016

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: INGENIERO CIVIL QUÍMICO E
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: DANIELA ANDREA BRAVO SALINAS
FECHA: 14/01/2016
PROFESOR GUÍA: BLANCA ESCOBAR MIGUEL

“BIOLIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA POR *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS*”

El presente trabajo tiene por objetivo el estudio de la acción catalítica del microorganismo termófilo moderado *Sulfobacillus acidophilus* en la biolixiviación de calcopirita a 45°C, con el fin de demostrar una mayor tasa de recuperación de cobre al elevar la temperatura de operación. Con este objeto, se realizó un estudio comparativo de la biolixiviación de calcopirita por un microorganismo mesófilo *Acidithiobacillus ferrooxidans* y el microorganismo *Sulfobacillus acidophilus*.

El estudio consistió en la biolixiviación de un concentrado de calcopirita en frascos agitados a 30 y 45°C para los cultivos mesófilo y termófilo moderado, respectivamente. Los frascos fueron monitoreados periódicamente por un periodo de 648 horas, para la medición de Eh, pH, Fe(II) y Fe total en solución, fierro precipitado, sulfato y cobre en solución. Las poblaciones de bacterias de ambos microorganismos (planctónicas y adheridas a los minerales) se cuantificaron utilizando tinción con DAPI y su evaluación en un microscopio de epifluorescencia. Además, mediante el análisis de los datos obtenidos de cobre en solución se determinaron las tasas de recuperación, y las respectivas etapas controlante del proceso según el modelo del núcleo sin reaccionar.

Los resultados mostraron para ambas cepas una alta capacidad de adherencia sobre la calcopirita de aproximadamente 85%. Sin embargo, el porcentaje de recuperación de cobre y el tiempo de disolución total de la calcopirita (τ) muestra una diferencia apreciable entre los cultivos. Se obtuvo un porcentaje de recuperación de 7,3% y 13,3% y valores de τ de 20.833 y 6.944 días para *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus*, respectivamente.

Los resultados obtenidos permiten concluir que *S. acidophilus* no fue capaz de aumentar la tasa de recuperación de cobre, lo que se evidenció por obtener una tasa menor a la obtenida en el experimento control (sin microorganismo), a la misma temperatura de estudio. Esto debido a la mayor precipitación de jarositas en el cultivo inoculado, lo que pasivó el mineral. Estos resultados darían cuenta que los experimentos con *S. acidophilus* corresponderían a una lixiviación química y el aumento de éste rendimiento se atribuye al aumento de la temperatura de 30 a 45°C, lo que aceleraría la reacción química.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le doy gracias a mi familia por el apoyo incondicional que me han entregado durante toda mi vida. A mi papa y a mi mama (sin orden de preferencia) que han estado siempre conmigo acompañándome, entregándome todo su amor y sus valores. A mis hermanos, Paula, Felipe y Tomas por soportarme en los momentos de estrés.

Agradezco también a Felipe por todo el amor, compañía, apoyo y paciencia que me ha dado durante todos nuestros años juntos.

También quiero agradecer a mi amiga Bea por su incondicional amistad. A mis amigos de la U, David y Nacho por estar ahí y hacerme reír. A mis amigas/os de BT/IQ: Coni, Gabi, Seba y Oscar por hacer más entretenido mi paso por la carrera, ya se trabajando, estudiando o solo conversando.

Le agradezco además, a mi profe guía Blanca Escobar no solo por su valiosa ayuda, apoyo y dedicación en el desarrollo de este trabajo, sino también por su disposición, paciencia y comprensión entregada. Agradezco también al profesor Tomás Vargas por su valioso aporte a esta tesis. A la Sra. Emma por su excelente disposición y ayudarme en todo lo que necesitaba, además de hacer más entretenido junto con la Caro las eternas horas en el laboratorio.

Quiero agradecer a Gina Madariaga por toda su ayuda y orientación entregada en los momentos donde todo se veía oscuro.

Finalmente, agradezco a Diosito y a la Virgencita por acompañarme durante toda mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Capítulo 1 | Introducción | 1 |
| 1. | Antecedentes Generales | 1 |
| 1.1 | <i>Antecedentes Bibliográficos</i> | 1 |
| 1.1.1 | Proceso de Biolixiviación | 1 |
| 1.1.2 | Microorganismos en los proceso de biolixiviación | 4 |
| 1.1.3 | Calcopirita | 6 |
| 1.1.4 | Lixiviación de Calcopirita | 7 |
| 1.1.5 | Efecto de la Temperatura sobre la Biolixiviación de Calcopirita | 8 |
| 1.2 | <i>Proyecto</i> | 11 |
| 1.2.1 | Descripción del Proyecto | 11 |
| 1.2.2 | Justificación | 12 |
| 1.2.3 | Objetivos | 12 |
| Capítulo 2 | Metodología | 13 |
| 2.1 | <i>Determinación de la Capacidad de Biolixiviación de Calcopirita de un cultivo</i> | 13 |
| 2.2 | <i>Análisis Químicos realizados a las muestras de biolixiviación</i> | 14 |
| 2.2.1 | Determinación del Hierro en solución | 14 |
| 2.2.2 | Determinación del Fe (III) precipitado | 15 |
| 2.2.3 | Determinación del Sulfato en solución por Turbidimetría. | 16 |
| 2.2.4 | Determinación de Cobre en solución | 17 |
| 2.3 | <i>Análisis biológicos realizados a muestras de biolixiviación</i> | 17 |
| 2.3.1 | Determinación de la capacidad de Adherencia de un cultivo | 17 |
| 2.3.2 | Cuantificación de las Bacterias por Tinción con DAPI | 18 |
| 2.4 | <i>Tratamiento y análisis matemáticos de los datos experimentales</i> | 19 |
| 2.4.1 | Adherencia bacteriana sobre calcopirita | 19 |
| 2.4.2 | Parámetros bioquímicos para el proceso de biolixiviación | 19 |
| 2.4.3 | Cuantificación de bacterias en la solución lixiviante y asociado al mineral | 20 |
| 2.4.4 | Modelo de Núcleo Sin Reaccionar | 21 |
| Capítulo 3 | Resultados | 23 |
| 3.1 | <i>Adherencia bacteriana en calcopirita</i> | 23 |
| 3.2 | <i>Biolixiviación de Calcopirita por Acidithiobacillus ferrooxidans y Sulfobacillus acidophilus</i> | 24 |
| 3.2.1 | Cuantificación de las Bacterias Planktónicas y adheridas a la superficie del mineral | 36 |
| 3.2.2 | Modelo del núcleo sin reaccionar | 40 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Capítulo 4 | Discusión | 42 |
| 4.1 | <i>Adherencia bacteriana sobre calcopirita</i> | 42 |
| 4.2 | <i>Biolixiviación de Calcopirita por Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 42 |
| 4.3 | <i>Biolixiviación de Calcopirita con Microorganismo Sulfolobus acidophilus</i> | 44 |
| 4.4 | <i>Cuantificación de las Bacterias en la solución lixivante y en la superficie del mineral</i> | 46 |
| 4.5 | <i>Consideraciones Finales</i> | 48 |
| Capítulo 5 | Conclusiones | 51 |
| Capítulo 6 | Bibliografía | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Esquema de los mecanismos de lixiviación: mecanismo indirecto, de contacto y de cooperación de minerales sulfuros (adaptación de Tributsch H., 2001)..... | 3 |
| Figura 2: Esquema de los mecanismos de lixiviación indirecta vía tiosulfato y polisulfuro (adaptación Sand W., 2001)..... | 4 |
| Figura 3: Estructura cristalina de la calcopirita (Sand, W. (2001))..... | 6 |
| Figura 4: Comparación de lixiviación de cobre desde calcopirita por tres consorcios: mesófilo a una temperatura de 30°C, termófilo y <i>Sulfobacillus</i> estos últimos a una temperatura de 50°C (Marhual et al. (2008))..... | 9 |
| Figura 5: Recuento de bacterias totales y porcentaje de adherencia de <i>A. ferrooxidans</i> en solución a 30°C durante 120 minutos..... | 23 |
| Figura 6: Recuento de bacterias totales y porcentaje de adherencia de <i>S. acidophilus</i> en solución a 45°C durante 120 minutos..... | 24 |
| Figura 7: Porcentaje de adherencia de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>S. acidophilus</i> sobre un concentrado de calcopirita..... | 25 |
| Figura 8: Recuperación de cobre desde calcopirita con <i>S. acidophilus</i> y <i>A. ferrooxidans</i> y sus respectivos experimentos controles..... | 26 |
| Figura 9: Recuperación de cobre desde calcopirita con <i>S. acidophilus</i> y <i>A. ferrooxidans</i> y sus respectivos experimentos controles ajustados a tiempo cero..... | 26 |
| Figura 10: Disolución de cobre a partir de las 72 horas de ensayo para cultivo de <i>S. acidophilus</i> y experimento control a 45°C..... | 27 |
| Figura 11: Variación del Eh en presencia de 2 g/L de ferroso y 0,02% de extracto de levadura y concentraciones de cobre de 0, 200, 250. 300 y 400 mg/L..... | 28 |
| Figura 13: Recuperación de azufre desde de calcopirita por la acción de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>S. acidophilus</i> a 30 y 45 °C respectivamente..... | 29 |
| Figura 12: A: Recuperación de cobre desde calcopirita por <i>S. acidophilus</i> bajo diferentes condiciones iniciales de ión ferroso a 45°C. En B se muestra una amplificación de A..... | 29 |
| Figura 14: Variación del Eh durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C y su respectivo experimento control..... | 30 |
| Figura 15: Variación del pH durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a 30°C y su respectivo experimento control..... | 31 |
| Figura 16: Evolución de la concentración de hierro en la solución durante el proceso de biolixiviación con <i>A. ferrooxidans</i> | 32 |

| | |
|---|----|
| Figura 17: Evolución de la concentración de fierro en la solución durante el proceso de lixiviación en experimento control a 30°C..... | 33 |
| Figura 18: Variación del Eh durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C y su respectivo experimento control. | 33 |
| Figura 19: Variación del pH durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por <i>Sulfobacillus acidophilus</i> a 45°C y su respectivo experimento control. | 34 |
| Figura 20: Evolución de la concentración de fierro en la solución durante el proceso de biolixiviación con <i>S. acidophilus</i> | 35 |
| Figura 21: Evolución de la concentración de fierro en la solución durante el proceso de lixiviación en cultivo control a 45°C | 36 |
| Figura 22: Evolución en el tiempo de bacterias <i>A. ferrooxidans</i> en la solución lixivante. | 38 |
| Figura 23: Evolución en el tiempo de bacterias <i>A. ferrooxidans</i> en la superficie del mineral. | 38 |
| Figura 24: Evolución en el tiempo de bacterias <i>S. acidophilus</i> en la solución lixivante. | 39 |
| Figura 25: Evolución en el tiempo de bacterias <i>S. acidophilus</i> en la superficie del mineral. | 40 |
| Figura 26: Modelo núcleo sin reaccionar para la biolixiviación de calcopirita por <i>A. ferrooxidans</i> a 30 °C..... | 41 |
| Figura 27: Modelo núcleo sin reaccionar para la biolixiviación de calcopirita por <i>S. acidophilus</i> a 45 °C | 41 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Porcentaje de recuperación de cobre para los cultivos estudiados..... | 27 |
| Tabla 2: Concentración de fierro precipitado como jarositas en los experimentos realizados..... | 36 |
| Tabla 3: Área, radio y volumen de la partícula de calcopirita | 37 |
| Tabla 4: Propiedades y área disponible de calcopirita | 37 |

CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN

1. ANTECEDENTES GENERALES

La importancia económica que representa la producción de cobre a nivel mundial hace necesario el desarrollo y mejoramiento de las tecnologías para la obtención de este preciado metal. En particular, la calcopirita es el mineral de cobre más abundante en la naturaleza, contando con aproximadamente el 70% de las reservas de cobre en el mundo (Córdoba et al. 2008) por lo que ha generado especial interés por parte de la industria minera la extracción de cobre a partir de éste mineral.

Tradicionalmente, la calcopirita ha sido tratada por medio de métodos pirometalúrgicos, sin embargo, la búsqueda de un método hidrometalúrgico como alternativa a la fundición presenta importantes ventajas tales como la posibilidad de tratar minerales de baja ley (cada vez más abundante en el caso del cobre), mayor control de los residuos, beneficios al medio ambiente; al no emitir dióxido de azufre (SO_2) durante la operación y menores costos de capital que los asociados a las fundiciones.

A pesar de que, la mayoría de los sulfuros de cobre secundarios, como calcocita, digenite, bornita y covelita, puede ser biolixiviados con éxito por microorganismos mesófilos, los sulfuros de cobre primarios como la calcopirita siguen siendo un reto importante para la biolixiviación debido a su carácter altamente refractario bajo condiciones de hidrometalurgia y a la formación de precipitados de fierro que crean una capa pasivante.

Las mayores tasas de biolixiviación de cobre ocurren a temperaturas elevadas por la acción de microorganismos termófilos. En particular, la calcopirita recalcitrante se vuelve más susceptible a la biolixiviación. Sin embargo, el calentamiento elevado de una pila de biolixiviación conlleva un encarecimiento de los costos de operación. Es por esto, que en el presente trabajo se estudiará la biolixiviación de calcopirita con microorganismos termófilos moderados, particularmente *Sulfobacillus acidophilus*, los que no requieren un calentamiento excesivo del medio en que se desarrollan.

1.1 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1.1 PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN

La biolixiviación es el proceso mediante el cual los microorganismos catalizan la disolución de minerales sulfurados para la recuperación de metales de interés. Se

proponen dos mecanismos de disolución de minerales que explican el proceso de lixiviación: mecanismo por contacto y mecanismo indirecto.

De acuerdo con la definición, el mecanismo por contacto supone la oxidación del mineral por acción de la adherencia bacteriana al sulfuro metálico mediante sustancias poliméricas extracelulares, EPS, y la formación de un biofilm. La fracción de azufre de los minerales se supone que es biológicamente oxidado a sulfato y cationes metálicos, sin que se detecte ningún tipo de intermediarios. La adherencia de las bacterias sobre la superficie del mineral es una condición necesaria para la existencia de este mecanismo (Tributsch, 2001) (ver Figura 1).

Este mecanismo ocurriría según la siguiente reacción:



En contraste con el mecanismo de contacto, el mecanismo indirecto considera básicamente la acción oxidante de los iones férricos sobre el mineral sulfurado, disolviéndolo. A través de esta reacción química de lixiviación, se producen ion ferroso y azufre elemental. Finalmente, estas especies químicas son oxidadas biológicamente a ion férrico e ion sulfato, respectivamente. Este mecanismo, en principio, no requiere la adherencia de las bacterias al mineral sulfurado (Sand, W. 2001) (ver Figura 1).

La reacción que describe este mecanismo es la siguiente:



Paralelamente la acción bacteriana cataliza la oxidación del ion ferroso y azufre elemental producidos durante la lixiviación química, a ión férrico e ión sulfato, según las siguientes reacciones:



Se ha demostrado, que la lixiviación cooperativa es posible, mediante la cual tanto las bacterias adheridas al mineral como las que se encuentran libres en la solución cooperan disolviendo el mineral. Es decir, es la acción simultánea de los dos mecanismos mencionados anteriormente (Tributsch, H. 2001) (ver Figura 1).

Los estudios realizados por W. Sand et al. 2001, presentaron nuevas evidencias para proponer un modelo integral para la biolixiviación. La hipótesis de este modelo plantea que los iones férricos y/o los protones son los únicos agentes que disuelven al sulfuro metálico, por lo tanto, en el sentido estricto es un mecanismo indirecto. Por otra parte, las bacterias tienen la función de regenerar el ión férrico y concentrarlo en la interface mineral/solución o mineral/bacteria con el fin de mejorar la degradación del

mineral. En este modelo, el factor determinante corresponde a la fina capa de exopolímeros que rodea a las células, donde tienen lugar los procesos químicos que causan la degradación del mineral. Esto explicaría la aceleración de la disolución del mineral en presencia de bacterias.

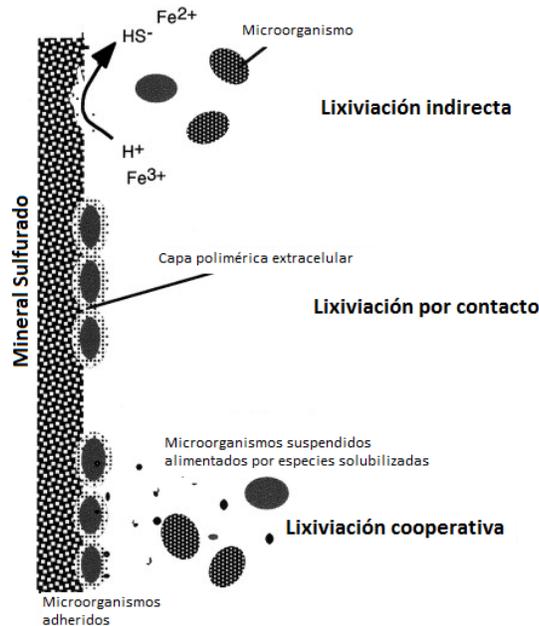


Figura 1: Esquema de los mecanismos de lixiviación: mecanismo indirecto, de contacto y de cooperación de minerales sulfurados (adaptación de Tributsch H., 2001).

Por otra parte, basado en los productos intermedios, W. Sand et al. 2001 propusieron dos mecanismos de lixiviación indirecta: mecanismo del tiosulfato y mecanismo del polisulfuro.

El mecanismo del tiosulfato ocurre en sulfuros metálicos que no son solubles en ácido, como molibdenita, tungstenita y pirita. Estos minerales son únicamente degradados por un agente oxidante como es el caso del ión férrico, generándose como compuesto intermediario principal tiosulfato y sulfato como producto final (ver Figura 2).

El mecanismo del polisulfuro se lleva a cabo en la mayoría de los sulfuros (esfalerita, calcopirita, galena, entre otros), los cuales son degradados simultáneamente por un agente oxidante y protones, generándose como compuestos intermediarios polisulfuros y azufre elemental (ver Figura 2).

1.1.2 MICROORGANISMOS EN LOS PROCESOS DE BIOLIXIVIACIÓN

Los microorganismos que están presentes en los procesos de biolixiviación juegan un papel importante en la solubilización de minerales y poseen una serie de características en común. Estos se caracterizan por su capacidad de desarrollarse en ambientes extremos, como es el drenaje ácido de minas que posee un bajo pH, altas concentraciones de metales pesados y, en algunos casos, temperaturas elevadas (Pradhan et al. 2008).

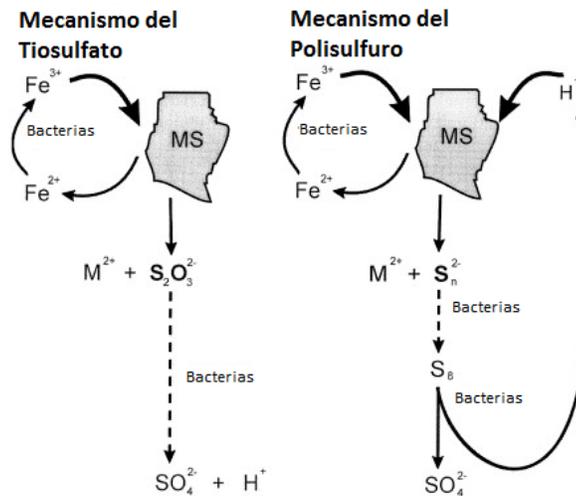


Figura 2: Esquema de los mecanismos de lixiviación indirecta vía tiosulfato y polisulfuro (adaptación Sand W., 2001).

A pesar de estas condiciones desfavorables, existen microorganismos que se adaptan a estas condiciones e intervienen en la biooxidación de minerales, y son responsables de la producción de ion férrico y ácido sulfúrico requeridos para las reacciones de biolixiviación (Pradhan et al. (2008)).

Estos microorganismos, cuyo papel puede considerarse similar a los catalizadores, se pueden clasificar en función del rango de temperatura en la cual son capaces de sobrevivir: (Olson et al. 2004) (Pradhan et al 2008).

Microorganismos Mesófilos: Son bacterias Gram negativas, con un óptimo de temperatura de crecimiento entre los 30 y 40°C. Entre estos destacan: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*.

Microorganismos termófilos moderados: Estos microorganismos crecen a una temperatura óptima entre los 40 y 60°C aproximadamente e incluyen las especies de *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfobacillus acidophilus* y *Acidithiobacillus caldus*.

Microorganismos termófilos extremos: Son principalmente arqueas que crecen a temperaturas superiores a los 65°C, destacándose *Sulfolobus metallicus* y *Metallosphaera sedula* entre otras.

En las operaciones industriales, la temperatura dentro de la pila puede llegar sobre los 50°C debido a la reacción exotérmica de la oxidación de algunos sulfuros. Con el aumento de la temperatura, la actividad de los microorganismos mesófilos es inhibida y desplazada por microorganismos termófilos hierro y azufre oxidantes. A su vez, los termófilos extremos pueden desplazar a los termófilos moderados cuando las temperaturas se incrementen sobre los 60°C. Esto se debe a que por debajo de la temperatura óptima de los microorganismos, ellos se vuelven inactivos y a temperaturas por encima de ella, son rápidamente destruidos (Pradhan et al. 2008).

En particular, en el presente trabajo se estudió la capacidad de biolixiviación de calcopirita de dos cultivos; en el primero un microorganismo mesófilo, en particular *Acidithiobacillus ferrooxidans* y de un microorganismos termófilo moderado, específicamente *Sulfobacillus acidophilus*.

1.1.2.1 *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la familia γ -proteobacteria. Corresponde a un microorganismo mesófilo con una temperatura óptima entre 30 y 40°C y un pH óptimo entre 1,8 y 2 considerándose acidófila. Posee un crecimiento quimiolitótrofo capaz de oxidar ión ferroso y azufre elemental. Es una bacteria abundante en ambientes naturales asociados a yacimientos de pirita, depósitos de carbón y drenajes ácidos (Valdez et al. (2008)).

1.1.2.2 *Sulfobacillus acidophilus*

Uno de estos microorganismos termófilo moderado y que se estudia en este trabajo es *Sulfobacillus acidophilus* un bacilo Gram positiva, formadora de endoesporas esféricas. La temperatura óptima corresponde entre 45 y 50°C y debido al rango de pH de crecimiento de 1,4 - 2 es clasificada como acidófila. Posee un crecimiento autótrofo al fijar el CO₂ como fuente principal de carbono y crecimiento quimiolitótrofo al ser capaz de utilizar ión ferroso y azufre elemental como sustrato. Además, puede crecer en ión ferroso mixotróficamente con la utilización simultánea de glucosa y CO₂. Por último, tiene un crecimiento heterotrófico con extracto de levadura como sustrato (Norris, P. (1996)).

Cabe destacar que debido al crecimiento heterotrófico de estas bacterias, la presencia de extracto de levadura y/o glucosa como sustrato, tiende a seleccionar las

bacterias del género *Sulfobacillus*, por lo que el enriquecimiento de *Sulfobacillus* en un medio de cultivo, es posible por la presencia de una pequeña cantidad de extracto de levadura y/o glucosa como fuente de carbono. Se ha demostrado, además, que en ausencia de extracto de levadura la tasa de crecimiento de *Sulfobacillus* es muy lenta (Marhual et al. (2008)).

Los microorganismos termófilos moderados al actuar en condiciones de temperatura de rango entre 40 y 60°C, permiten emplearse en procesos de biolixiviación para minerales que son más recalcitrantes a este proceso, favoreciendo el incremento de las tasas de disolución sin un encarecimiento excesivo de los costos de operación como lo sería al utilizarse microorganismos termófilos extremos.

1.1.3 CALCOPIRITA

La fórmula química que mejor describe a la calcopirita (CuFeS_2) es $\text{Cu}^+ \text{Fe}^{+3} \text{S}_2^{-2}$, donde el cobre está principalmente en estado cuproso y el hierro en estado férrico. La estructura cristalina de éste mineral consiste en una red tetragonal relativamente simple, centrada en las caras, con los siguientes parámetros $a=5,25 \text{ \AA}$, $c=10,32 \text{ \AA}$ y $Z=4$, y donde los iones de azufre están rodeados por cuatro átomos de cobre y cuatro átomos de hierro localizado en los ángulos de un tetraedro (Córdoba et al. (2008)).

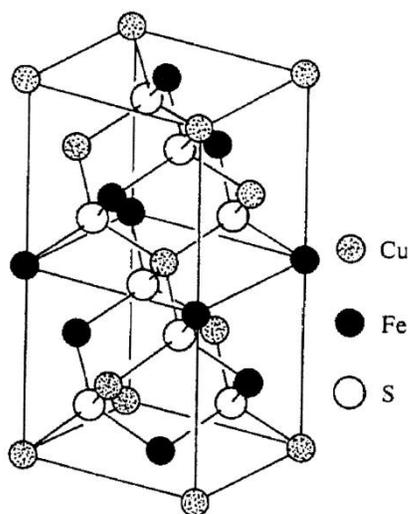
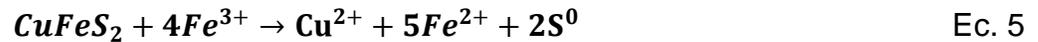


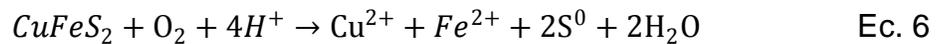
Figura 3: Estructura cristalina de la calcopirita (Sand, W. (2001)).

1.1.4 LIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA

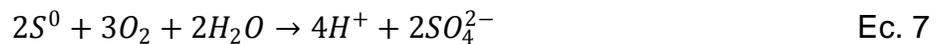
El mecanismo propuesto para la disolución de calcopirita por tratamientos hidrometalúrgico está dado por la oxidación férrica en presencia de ácido, según la ecuación 5 generando iones cúprico y ferroso además de azufre elemental. De acuerdo a esta ecuación, la creciente concentración de los iones férrico en solución dará lugar a la liberación de cantidades más altas de cobre. Así un incremento del Eh, representa una acumulación de Fe^{3+} , lo que debe favorecer la lixiviación de calcopirita.



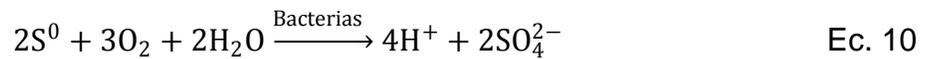
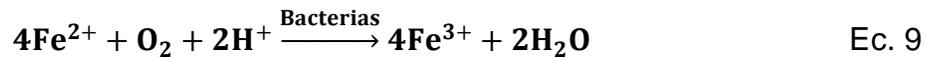
Además la calcopirita puede ser oxidada por oxígeno disuelto, con el consiguiente consumo de ácido, según la ecuación 6.



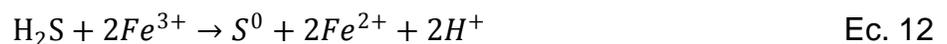
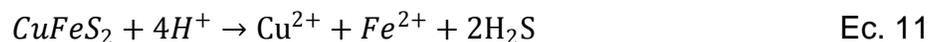
El azufre elemental liberado de la oxidación de la calcopirita puede ser oxidado tanto por iones férrico como por oxígeno disuelto según las ecuaciones 7 y 8.



Cabe destacar, que tanto la oxidación de ión ferroso a ión férrico como la oxidación de azufre elemental pueden ser catalizadas biológicamente según las siguientes ecuaciones.



Otros estudios con respecto a la lixiviación de la calcopirita corresponde al mecanismo del polisulfuro, como se menciona anteriormente. En este mecanismo, el sulfuro de cobre es atacado por un ácido, desestabilizándose la estructura del mineral antes de que el azufre sulfuro sea oxidado, generándose iones metálicos y un polisulfuro. Éste último luego es oxidado a azufre elemental. Las ecuaciones 11 y 12 muestran el mecanismo de reacción.

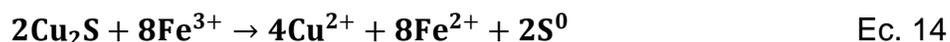


Se ha reportado que la lixiviación química de calcopirita, podría verse favorecida en condiciones de un Eh inferior a un valor crítico, es decir, a una razón apropiada de $[Fe^{3+}]/[Fe^{2+}]$ (Hiroyoshi et al. 2001).

Se ha estudiado recientemente la existencia de un rango óptimo de potencial redox en la oxidación de calcopirita con *S. thermosulfidooxidans* (termófilo moderado), y que a un Eh superior a un valor crítico se suprimiría la lixiviación mediante este mecanismo (Xia, et al. 2010), lo cual está en concordancia con el modelo de dos pasos propuesto por Hiroyoshi (2001). En presencia suficiente de iones ferrosos y cobre la calcopirita es reducida a calcocita de acuerdo con la siguiente reacción:



Luego el intermediario calcocita (Cu_2S), que es más susceptible a la lixiviación que la calcopirita, se oxida por los iones de férricos de la siguiente manera:



Al parecer, las reacciones antes mencionadas podrían ocurrir sólo cuando el potencial redox es lo suficientemente bajo para la formación de calcocita (420 a 470 mV) (Xia, et al. (2010)) pero lo suficientemente alto para la oxidación posterior de calcocita.

Este modelo sugiere además, que las concentraciones de iones ferrosos y cúpricos también son importantes en la lixiviación de la calcopirita. Cuando las concentraciones de estos iones no son suficientes, la calcopirita es directamente oxidada por los iones férricos mediante la reacción general dada por la ecuación 5, sin embargo, en este caso la Cu_2S no se forma y la tasa de extracción de cobre es más lenta. Esto es concordante, debido a la presencia de calcocita que se formó durante el proceso de lixiviación.

1.1.5 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA BIOLIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA

La calcopirita es un mineral altamente refractario a la lixiviación. La principal causa del carácter refractario es la formación de una capa pasiva estable sobre la superficie del mineral en condiciones oxidantes, generando bajas tasas de disolución de cobre y una lenta cinética de disolución tanto en la lixiviación química como en la biológica (Marhual, et al. 2008) (Xia et al. 2010). Esta película pasivante sobre la superficie, evita el contacto directo entre la solución y el mineral, limitando el transporte electroquímico necesario para el mecanismo de disolución (Cancho et al 2007).

Además, la calcopirita es un sulfuro primario que no responde bien a la acción de microorganismos mesófilos. En los estudios de Marhual et al. 2008 la biolixiviación de calcopirita fue llevada a cabo a temperaturas de 30 y 50°C. Los microorganismos mesófilos fueron crecidos a 30°C, mientras que un consorcio de termófilos y un cultivo enriquecido con *Sulfobacillus* fueron incubados a 50°C. La eficiencia de lixiviación de cobre alcanzado con microorganismos termófilos fue mayor que la obtenida con

bacterias mesófilas, con un aumento significativo de casi el doble de extracción de cobre (ver Figura 4).

Bo Fu et al. 2008 estudiaron la biolixiviación de calcopirita con cultivos puros y mixtos de bacterias mesófilas y termófilas moderadas. Se concluyó que el cultivo mixto de bacterias termófilas moderadas *L. ferriphilum* y *A. caldus* a 40°C biolixivió la calcopirita más eficientemente que los cultivos puro y mixto de bacterias mesófilas a 30°C.

Estos hallazgos permiten mostrar la mayor capacidad de lixiviación de las bacterias termófilas moderadas sobre las bacterias mesófilas, la que se debe presumiblemente al efecto positivo de elevar la temperatura en la disolución de minerales sulfurados.

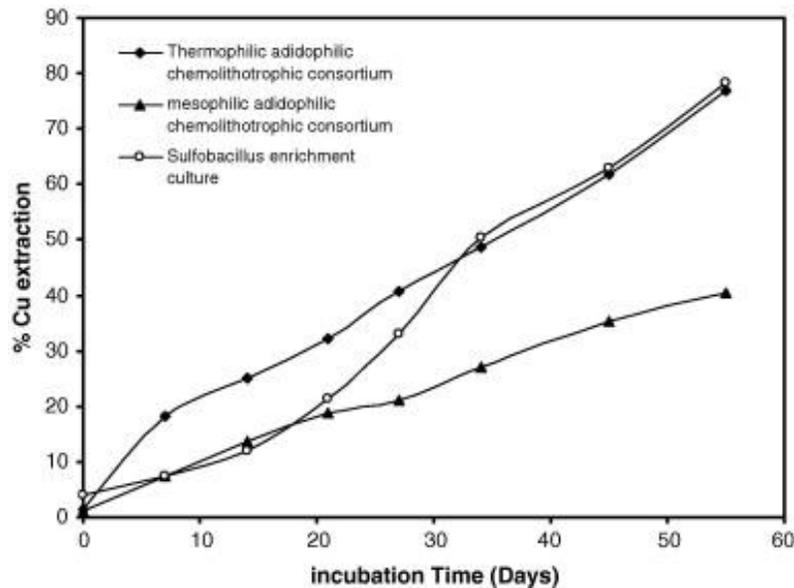


Figura 4: Comparación de lixiviación de cobre desde calcopirita por tres consorcios: mesófilo a una temperatura de 30°C, termófilo y Sulfobacillus estos últimos a una temperatura de 50°C (Marhual et al. (2008))

Si bien una de las soluciones más comunes para el efecto de la pasivación del mineral, y la cinética lenta en los procesos de biolixiviación en general, es elevar la temperatura, el uso de microorganismos termófilos extremos para la lixiviación de calcopirita pueden presentar una serie de dificultades tales como: baja solubilidad del oxígeno en el agua. Por otro lado, estos microorganismos son menos resistentes a altas concentraciones de sólidos y presentan resistencia mecánica inferior que los microorganismos mesófilos y termófilos moderados por el desgaste de sus membranas. Además, la mayoría de los microorganismos termófilos extremos que resisten a temperaturas superiores a 60°C se clasifican como archaea los que presentan una

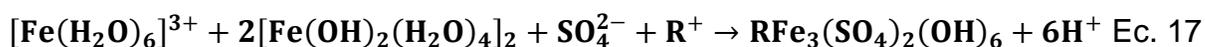
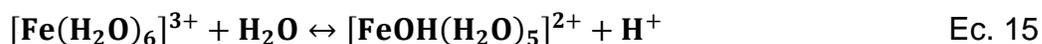
pared celular más delgada que la bacterial, lo que dificulta la sobrevivencia en presencia de una alta densidad de la pulpa (Cancho et al. (2007)) (Zhou et al. (2009)).

Con respecto al empleo de microorganismos termófilos extremos en el proceso de biolixiviación de calcopirita, se detectó la formación de una capa pasiva de jarosita con *Acidianus manzaenis*, la cual contribuía a un 84% de los componente de la superficie del mineral al final del proceso (He et al. (2009)). Esta fue 4 veces mayor que la reportada con *S. thermosulfidooxidans* bajo condiciones similares de operación. Este fenómeno sugiere que una temperatura moderadamente alta (por debajo de 60 °C), es más favorable para atenuar el efecto de pasivación del mineral, mejorando así la cinética de disolución (Xia et al. (2010)).

Hong-Bo Zhou et al. (2009) estudiaron la biolixiviación de calcopirita en un reactor de tanque agitado obteniéndose un 75% de extracción de cobre al finalizar la lixiviación, identificándose sólo dos especies bacterianas *A. caldus* y *Leptospirillum ferriphilum*. El análisis de residuos del mineral mostraron que la formación de la capa de pasivación de calcopirita es acelerada sólo después que la mayor parte del cobre fue extraído de los depósitos, por lo que se confirma que el uso de los termófilos moderados en el proceso de biolixiviación de calcopirita podría evitar la pasivación excesiva de minerales (Zhou et al. (2009)).

Cabe destacar, que las reacciones de lixiviación son exotérmicas, elevando la temperatura de tanques agitados a 40-50°C, que es el rango óptimo para el crecimiento de microorganismos termófilos moderados.

Se ha reportado diversos resultados sobre la composición química de la capa de pasivación formada en la superficie del mineral y ésta corresponde a azufre elemental, compuestos de polisulfuros, jarosita, y la existencia simultánea de ellos (Ding et al. (2007)), (Pradhan et al. (2008)) (Xia et al. (2010)). Durante el proceso ocurre una acumulación de ácido, como se describe en las siguientes ecuaciones (Xia et al. (2010)):



Y la ecuación total para el proceso:



donde R puede representar potasio K^+ o NH_4^+ . Cabe destacar, que la composición de la capa de pasivación detectado por análisis SEM, sugieren que los precipitados formados por una cepa de *S. thermosulfidooxidans* a 53 °C son la mezcla de potasio y amonio jarosita (Ding et al (2007)).

1.2 PROYECTO

1.2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El proyecto de memoria para optar al título de Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología consiste en el estudio comparativo de la biolixiviación de calcopirita con microorganismos mesófilo, particularmente *Acidithiobacillus ferrooxidans* y con microorganismos termófilo moderado, específicamente *Sulfobacillus acidophilus*.

Los microorganismos termófilos moderados podrían mostrar una mejoría significativa en la biolixiviación de sulfuros primarios como es el caso de la calcopirita, con respecto a microorganismos mesófilos, ya sea mejorando la cinética de lixiviación con el aumento de temperatura y/o evitando la pasivación del mineral. Cabe destacar que la presencia de estos microorganismos, capaces de oxidar azufre incrementaría la tasa de disolución y el porcentaje de recuperación de cobre desde la calcopirita, debido a que la oxidación de azufre ayuda a reducir la acumulación de éste mediante su transformación a ácido sulfúrico. El azufre intermediario puede formar una capa en la superficie del mineral sulfurado que influye negativamente en la cinética de lixiviación. Estas bacterias también son capaces de oxidar el ión ferroso a ión férrico, aumentando así la lixiviación de calcopirita.

Es por lo anterior que se hace necesario el estudio comparativo de microorganismos mesófilos y termófilos moderados. Para esto se realizarán la biolixiviación de calcopirita en frascos agitados a 30 y 45°C con *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Sulfobacillus acidophilus* respectivamente.

Mediante estos experimentos de biolixiviación se estudiará la cinética de disolución de la calcopirita para determinar la tasa de recuperación del cobre y hierro. Además con los datos obtenidos de la conversión de cobre se determinará la etapa controlante y la velocidad de reacción del proceso según el modelo del núcleo sin reaccionar.

Además, las poblaciones bacterianas en solución y adheridas al mineral se analizarán con la técnica de tinción con DAPI y evaluación en el microscopio de epifluorescencia, permitiendo determinar el grado de influencia en la adherencia del mineral sobre el mecanismo de disolución del mineral.

1.2.2 JUSTIFICACIÓN

La calcopirita es el mineral de cobre más abundante en la naturaleza, pero a su vez es altamente refractaria a la lixiviación; es por eso que aún sigue siendo un reto importante la aplicación de la hidrometalurgia a este mineral.

Las ventajas que presenta la biolixiviación frente a los procesos de recuperación convencionales de metales como las fundiciones son claras, como por ejemplo ser más amigable con el medio ambiente, menores costos de operación, entre otras características, las que hacen atractiva su aplicación a calcopirita y en general en los minerales de interés.

Se ha reportado que con el aumento de la temperatura en las pilas y/o reactores de lixiviación, se logra aumentar considerablemente la recuperación de metales favoreciendo la selección de microorganismos termófilos. En particular en un rango de 40-60 °C se favorece la actividad de los microorganismos termófilos moderados.

Es por lo anterior que el estudio y comprensión de los mecanismos que emplean los microorganismos termófilos moderados, en particular *S. acidophilus*, en el proceso de biolixiviación de calcopirita se hace necesaria, lo que permitiría su posterior escalamiento en la industria minera si los resultados de los estudios son favorables.

1.2.3 OBJETIVOS

1.2.3.1 *Objetivo General*

Determinar la cinética y mecanismo de disolución de calcopirita a 45°C en presencia de *Sulfobacillus acidophilus*.

1.2.3.2 *Objetivos Específicos*

Comparar la cinética de disolución de calcopirita a 45°C con *S. acidophilus* con la obtenida con *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C.

Determinar la influencia del grado de adherencia de *S. acidophilus* sobre el mecanismo de biolixiviación.

CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA

2.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOLIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA DE UN CULTIVO

Materiales y Equipos

- Concentrado de alta pureza (90%) proveniente de la División Andina de CODELCO Chile, tamaño de la partícula -325 +400, de composición: 29,94% cobre; 31,19% hierro y 38, 87% azufre.
- Equipo de espectrofotometría UV, marca Agilen modelo 8453, el cual esta equipado con una lámpara de Tungsteno. Utilizado para la determinación de hierro y sulfato en solución.
- Electrodo de pH, marca Corning modelo 340 con electrodo de Ag/AgCl.
- Electrodo de Eh, marca Hanna Instruments, modelo 211 con electrodo de Ag/AgCl, para la medición del Eh.
- Equipo de espectrofotometría de absorción atómica marca Perkin-Elmer modelo 1100B. Utilizado para la determinación de cobre en solución.
- Shaker a 30 y 45°C

Microorganismos

En los experimentos de biolixiviación con microorganismos mesófilos se utilizó un cultivo de bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* cepa ATCC 19859. En los experimentos de biolixiviación con bacterias termófilas moderadas se utilizó un cultivo de *Sulfobacillus acidophilus* cepa DSMZ 10332.

Diseño del Experimento

Los experimentos de biolixiviación de calcopirita con microorganismos mesófilos se realizó utilizando 14 matraces estériles de 250 mL, cada uno con 0,5 g de calcopirita, 100 ml de medio MC previamente esterilizado (0,4 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ Y 0,056 g/L KH_2PO_4 , pH ajustado a 1,6 con H_2SO_4) y 2 g/L de Fe(II) (como sulfato de Fe(II)). Los frascos fueron incubados y mantenidos en un shaker a 30°C con agitación de 100 rpm. Los experimentos se realizaron en duplicado.

Para el caso del experimento de biolixiviación de calcopirita con *S. acidophilus* se utilizó 14 matraces estériles de 250 mL, con 0,5 g de calcopirita, 100 ml de medio MC

previamente esterilizado, 2 g/L de Fe(II) y 0,02% de extracto de levadura. Los frascos fueron incubados en un shaker a 45°C con agitación de 100 rpm. Los experimentos se realizaron en duplicado.

En ambos experimentos, los frascos fueron monitoreados dos veces por semana, durante 4 semanas, midiéndose el pH, Eh, Fe(II), Fe total, sulfato en solución, y cobre para lo cual se tomaron muestras de 3 mL, obteniéndose un total de 8 muestreos. Además, en cada medición se retiró un matraz y su duplicado para cuantificar los precipitados de hierro y el análisis de la población bacteriana en solución y asociado al mineral por medio de la técnica de tinción con DAPI.

Además, para determinar la actividad bacteriana de *S. acidophilus* en presencia cobre, se dispuso de 5 matraces estériles de 200 mL, cada uno con 50 mL de medio MC estéril, 2 g/L de Fe (II) (como sulfato ferrico), 0,02% de extracto de levadura y concentraciones de cobre (como sulfato de cobre) con concentraciones de 0, 200, 250, 300 y 400 mg/L. Los frascos fueron monitoreados por 144 horas, midiéndose el Eh y controlando el pH en 1,6.

Por último, se realizó un experimento con diferentes concentraciones iniciales de ión ferroso para estudiar su influencia en la disolución de calcopirita en presencia de *S. acidophilus*. Para el experimento se utilizó 6 matraces estériles de 250 mL, cada uno con 100 mL de medio MC estéril, 0,02% de extracto de levadura y concentraciones de 2 g/L, 1 g/L y sin ión ferroso inicial. Los frascos fueron monitoreados durante 648 horas, midiéndose el cobre en solución, verificando Eh y ajustando el pH entorno a 1,6. Los experimentos se realizaron en duplicados.

2.2 ANÁLISIS QUÍMICOS REALIZADOS A LAS MUESTRAS DE BIOLIXIVIACIÓN

2.2.1 DETERMINACIÓN DEL FIERRO EN SOLUCIÓN

Materiales y Equipos

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

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

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

2.2.1.2 *Medición de Fierro Total*

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

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

- Tome 0,1 mL de muestra sin diluir.
- Agregue 1 mL de solución NaF 0,5M. Agitar.
- Agregue 0,4 mL de solución de Fenantrolina. Agitar.
- Agregue 1 mL de agua destilada. Agitar.
- Leer absorbancia a 510 nm.

2.2.2 *DETERMINACIÓN DEL FE (III) PRECIPITADO*

Materiales y Equipos

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

2.2.2.1 *Tratamiento de la solución*

- Tomar 2 mL de muestra
- Aforar a 20 mL de HCl 5N
- Incubar a 60°C por 30 minutos con agitación

- Medir el hierro según lo indicado en la sección 1.2.1.2 (medición de hierro total)

2.2.2.2 *Tratamiento del mineral*

- Filtrar todo el contenido del matraz
- Romper el papel filtro y lavarlo con 50 mL de HCl, con el fin de recuperar la calcopirita en un recipiente.
- Incubar a 60°C por 60 minutos con agitación
- Enfriar y recuperar la solución filtrando.
- Aforar a 100 mL con agua destilada
- Medir el hierro según lo indicado en la sección 1.2.1.2 (medición de hierro total)

2.2.3 *DETERMINACIÓN DEL SULFATO EN SOLUCIÓN POR TURBIDIMETRÍA.*

Materiales y Equipos

- BaCl₂ x H₂O
- NaCl 240 g/L en solución de HCl al 0,3%
- Agua desionizada
- Espectrofotómetro UV marca Agilen
- Glicerina 1:1 filtrada

Método

Eliminación del Fe en solución:

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

Medición del Sulfato:

- En un matraz aforado de 50 mL agregar 2 mL de muestra tratada anteriormente.
- Agregar 5 mL de glicerina 1:1. Agitar.
- Agregar 2,5 mL de NaCl 240 g/L. Agitar.
- Aforar a 50 mL con agua des-ionizada. Agitar.
- Agregar 0,15 g de BaCl₂ x H₂O. Agitar durante 1 min y dejar reposar por 1 min.

- Leer absorbancia a 500 nm.

2.2.4 DETERMINACIÓN DE COBRE EN SOLUCIÓN

Mediante la técnica de absorción atómica, en el espectrofotómetro de absorción atómica 1100B Perkin-Elmer, se analizó las muestras para determinar el cobre presente en la solución lixiviante.

2.3 ANÁLISIS BIOLÓGICOS REALIZADOS A MUESTRAS DE BIOLIXIVIACIÓN

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADHERENCIA DE UN CULTIVO

Materiales y Equipos

- Concentrado de calcopirita
- Inóculo de bacterias
- Cámara de recuento de células Petroff-Hausser de 0,02 mm de profundidad.
- Microscopio de contraste de fases, marca Nikon modelo Labaphot.

Método

Para determinar la capacidad de adherencia a la calcopirita de las bacterias *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus*, se realizó un experimento utilizando un matraz de 50 mL, con un volumen de 25 mL de medio MC, 0,25 g de calcopirita y un inóculo de bacterias.

Se determinó la concentración inicial de bacterias en la solución con el mineral concentrado, para luego llevar el matraz a un agitador de 30 y 45°C para el cultivo mesófilo y termófilo moderado respectivamente, y se mantuvieron ahí hasta el final de la experiencia. Para determinar la capacidad de adherencia se realizó un conteo de las células en solución, extrayendo 8 μ L de la solución, y cargándolos en una cámara de conteo Petroff-Hausser y contando las células de la muestra en un microscopio de contraste de fases.

Los conteos se realizaron en el momento inmediatamente posterior al contacto con el mineral, es decir, en el tiempo cero, y cada 15 min hasta completar los 60 min, y luego cada 30 min hasta completar los 120 min de experiencia. Los experimentos se realizaron en duplicado.

2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS POR TINCIÓN CON DAPI

Materiales y Equipos

- Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)
- Filtro policarbonato, con tamaño de poro de poro de 0,2 μm
- Formaldeído al 37%
- Microscopio de Epifluorescencia, marca Zeiss, equipado con los filtros de 365 nm y 546 nm.
- Cámara fotográfica Nikon, modelo coolpix 4500, 4 megapíxeles.

2.3.2.1 *Protocolo para el tratamiento de las células en suspensión*

Traspaso de células desde una suspensión a un soporte

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

1. Fijación celular de 5 mL de suspensión con al menos $8 \cdot 10^5$ cel/mL ($4 \cdot 10^6$ cel totales) con formaldeído al 4% por 1 hora en hielo.
2. Filtrar en membrana de policarbonato.
3. Teñir con DAPI 1 $\mu\text{g/mL}$.
4. Colocar una sección de filtro sobre el portaobjeto.
5. Cubrir la sección de filtro con Mountant (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes de 1x PBS con DAPI concentración final 1 $\mu\text{g/mL}$)
6. Colocar un cubreobjeto sobre el filtro, y agregar una gota de aceite de cedro.
7. Evaluar las secciones de filtro, utilizando un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000x (objeto 100x y ocular 10x) y filtro de luz UV con una longitud de onda 365 nm.

2.3.2.2 *Protocolo para el tratamiento de las células adheridas al mineral*

Fijación de las células

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

1. Lavar el mineral 5 veces con el medio de cultivo MC.
2. Incubar el mineral en 5 mL de PBS 1x con formaldeído al 4% por 1 hora en hielo.
3. Teñir una porción del mineral con DAPI 1 $\mu\text{g/mL}$.

4. Traspasar el mineral a un portaobjetos.
5. Cubrir el mineral con Mountant (5,5 partes de Citifluor, 1 parte de VectaShield, 0,5 partes de 1x PBS con DAPI concentración final 1 µg/mL).
6. Colocar el cubreobjeto sobre el mineral, y agregar una gota de aceite de cedro.
7. Utilizar un papel blanco bajo el portaobjeto para facilitar la observación de las bacterias sobre el mineral.
8. Evaluar el mineral, utilizando un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 1000x (objeto 100x y ocular 10x) y filtro de luz UV con una longitud de onda 365nm.

2.4 TRATAMIENTO Y ANÁLISIS MATEMÁTICOS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

2.4.1 ADHERENCIA BACTERIANA SOBRE CALCOPIRITA

El conteo de las bacterias presente en el medio de cultivo se realizó con la Cámara de recuento Petroff-Hausser en un microscopio de contraste de fase. El promedio de estas bacterias corresponden a las $Bact_{contadas}$, con las cuales se determina las bacterias totales de acuerdo a las ecuaciones 19 y 20 cuando se realiza el conteo en el cuadrado grande o chico de la cámara de recuento, respectivamente.

$$Bact_t^{totales} = Bact_t^{contadas} \cdot 2 \cdot 10^7 \cdot V_{total} \quad \text{Ec. 19}$$

$$Bact_t^{totales} = Bact_t^{contadas} \cdot 1,25 \cdot 10^6 \cdot V_{total} \quad \text{Ec. 20}$$

El porcentaje de las bacterias adheridas para todos los tiempos estudiados, se determina mediante la ecuación 21.

$$\% \text{ Adherencia} = \frac{Bact_{t=0}^{totales} - Bact_t^{totales}}{Bact_{t=0}^{totales}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 21}$$

2.4.2 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS PARA EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN

Los datos obtenidos para las mediciones de fierro y cobre se ajustaron a la concentración real, correspondiente a la incorporación de lo que se ha eliminado al tomar las muestras, mediante las ecuaciones 22, 23, 24 y 25.

$$[Cu^{+2}]_{(t+1)}^{real} = [Cu^{+2}]_{(t+1)}^{medido} + \frac{[Cu^{+2}]_{(t)}^{real} \cdot V_{muestra}}{V_{total}} \quad \text{Ec. 22}$$

$$[\text{Fe}^{+2}]_{(t+1)}^{\text{real}} = [\text{Fe}^{+2}]_{(t+1)}^{\text{medido}} + \frac{[\text{Fe}^{+2}]_{(t)}^{\text{real}} \cdot V_{\text{muestra}}}{V_{\text{total}}} \quad \text{Ec. 23}$$

$$[\text{Fe}^{\text{total}}]_{(t+1)}^{\text{real}} = [\text{Fe}^{\text{total}}]_{(t+1)}^{\text{medido}} + \frac{[\text{Fe}^{\text{total}}]_{(t)}^{\text{real}} \cdot V_{\text{muestra}}}{V_{\text{total}}} \quad \text{Ec. 24}$$

$$[\text{Fe}^{\text{total}}]^{\text{real}} = [\text{Fe}^{+2}]^{\text{real}} + [\text{Fe}^{+3}]^{\text{real}} \quad \text{Ec. 25}$$

El cálculo teórico del porcentaje de recuperación de cobre a partir de la calcopirita inicial se muestra en la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Cobre recuperado} = \frac{[\text{Cu}^{+2}]_{\text{final}} \cdot V_{\text{total}}}{\text{Masa Cu}_{\text{total}}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 26}$$

En cuanto al sulfato medido en solución, se debe agregar el sulfato eliminado al tomar la muestra y considerar el sulfato que contiene la solución proveniente del medio MC.

$$[\text{SO}_4^{-2}]_{(t+1)}^{\text{real}} = [\text{SO}_4^{-2}]_{(t+1)}^{\text{real}} + \frac{([\text{SO}_4^{-2}]_{(t)}^{\text{real}} - [\text{SO}_4^{-2}]_{(t=0)}^{\text{real}}) \cdot V_{\text{muestra}}}{V_{\text{total}}} \quad \text{Ec. 27}$$

Con el fin de comparar la extracción de hierro con el hierro que debería lixiviarse de acuerdo a la composición de la calcopirita, se determina el hierro total teórico a partir del cobre lixiviado según la ecuación 28.

$$\text{Fe}^{\text{total teórico}} = \text{Cu}^{2+\text{lixiviado}} \cdot \frac{\text{PA}(\text{Fe})}{\text{PA}(\text{Cu})} \quad \text{Ec. 28}$$

2.4.3 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS EN LA SOLUCIÓN LIXIVIANTE Y ASOCIADO AL MINERAL

El ajuste matemático realizado a los datos obtenidos de la cuantificación de las bacterias se realizó agregando las células eliminadas al momento de tomar la muestra, según la ecuación 29.

$$\overline{\text{Bact}_t^{\text{totales}}} = \text{Bact}_t^{\text{totales}} \cdot V + \sum_{i=0}^{t-1} (\text{Bact}_i^{\text{totales}} \cdot \text{vol}_i) \quad \text{Ec. 29}$$

Para determinar la población bacteriana asociada al mineral, se debe determinar la superficie total disponible para el crecimiento bacteriano (A_{total}). Para esto, se determina el área promedio de las partículas de mineral evaluándolas en el microscopio de epifluorescencia equipado en una gradilla del ocular de 1 mm^2 , con divisiones internas cada $1 \mu\text{m}$. Se asume que el área promedio corresponde a un círculo ($A_{\text{círculo}}$) y se despeja su radio (r), desde la ecuación 30, el cual corresponde al radio de la esfera. Obtenido el radio promedio, éste se utiliza para calcular el volumen promedio (V_{esfera})

utilizando la fórmula 31. Finalmente, con la ecuación 32, se determina el área total disponible (A_{total}).

$$A_{circulo} = \pi \cdot r^2 \quad \text{Ec. 30}$$

$$V_{esfera} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \quad \text{Ec. 31}$$

$$A_{total} = \frac{m_{calcopirita}}{\rho_{calcopirita}} \cdot \frac{4 \cdot \pi \cdot r^2}{V_{esfera}} \quad \text{Ec. 32}$$

La cantidad de bacterias totales se determina por la cuantificación de las bacterias por unidad de área promedio la cual se multiplica por el área total disponible.

2.4.4 MODELO DE NÚCLEO SIN REACCIONAR

El análisis de la cinética de extracción de cobre, se realizó mediante el modelo de Núcleo sin reaccionar para partículas esféricas de tamaño constante en reacciones sólido-gas, donde en este caso, corresponde a la reacción entre iones disueltos y sólido. Este modelo permite predecir la conversión del sólido en función del tiempo dependiendo de la etapa controlante de la velocidad (Levenspiel O., 1993).

El modelo considera que durante la reacción se presentan sucesivamente las siguientes cinco etapas:

1. Difusión de los reactivos lixiviantes hasta la superficie del sólido a través de la película del fluido que le rodea.
2. Difusión de los reactivos lixiviantes a través de la capa de ceniza hasta la superficie de reacción.
3. Reacción de los reactivos lixiviantes con el sólido en la superficie de reacción
4. Difusión de los productos formados a través de la capa de ceniza hacia el exterior del sólido.
5. Difusión de los productos de reacción hasta el seno del fluido.

Las ecuaciones de conversión para partículas esféricas según la etapa controlante se muestran a continuación:

- a. Difusión a través de la ceniza:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - 3(1 - X_B)^{2/3} + 2(1 - X_B) \quad \text{Ec. 33}$$

donde $\tau = \frac{\rho_B \cdot R^2}{6 \cdot b \cdot D_e \cdot C_{ag}}$

- b. Reacción química:

$$\frac{t}{\tau} = 1 - (1 - X_B)^{1/3} \quad \text{Ec. 34}$$

donde $\tau = \frac{\rho_B \cdot R}{b \cdot K_S \cdot C_{ag}}$

Los parámetros de las ecuaciones son los siguientes: ρ_B corresponde a la densidad molar del sólido a lixiviar, b constante estequiométrica de la calcopirita, k_y coeficiente de transferencia de masa, D_e coeficiente de difusión en la ceniza y C_{ag} concentración del reactante en la superficie del mineral.

La conversión alcanzada por la partícula esta dada por:

$$X_B = 1 - \left(\frac{r_c}{R}\right)^2 \quad \text{Ec. 35}$$

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

Para determinar la etapa controlante se grafico las ecuaciones 33 y 34 en función del tiempo, resultando la etapa controlante aquella que mejor se ajusta a una tendencia lineal, a través de la regresión lineal de los datos.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS

3.1 ADHERENCIA BACTERIANA EN CALCOPIRITA

Este experimento se realizó con el fin de determinar la capacidad de adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Sulfobacillus acidophilus* mediante recuento directo de bacterias totales. Las bacterias fueron contactadas con el mineral de calcopirita durante 120 minutos. El valor del porcentaje de adherencia de las bacterias corresponde a la resta de las bacterias iniciales con las bacterias planktónicas, cabe destacar la posibilidad de la adherencia de las bacterias al matraz, sin embargo, estas no fueron consideradas en este experimento debido al poco tiempo de duración del experimento (2 horas).

La adherencia bacteriana del cultivo con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre el concentrado de calcopirita a 30°C se muestra en la Figura 5. En ella se observa una concentración inicial de $4,8 \cdot 10^9$ bacterias totales, la cual decae bruscamente durante los primeros 30 minutos hasta una concentración de $1,5 \cdot 10^9$ bacterias, que representa una adherencia de 68,5%. Posteriormente, la adherencia continúa, pero a una tasa menor, logrando un 83,7% de bacterias adheridas al mineral al final de la experiencia que corresponde a $8 \cdot 10^8$ bacterias totales.

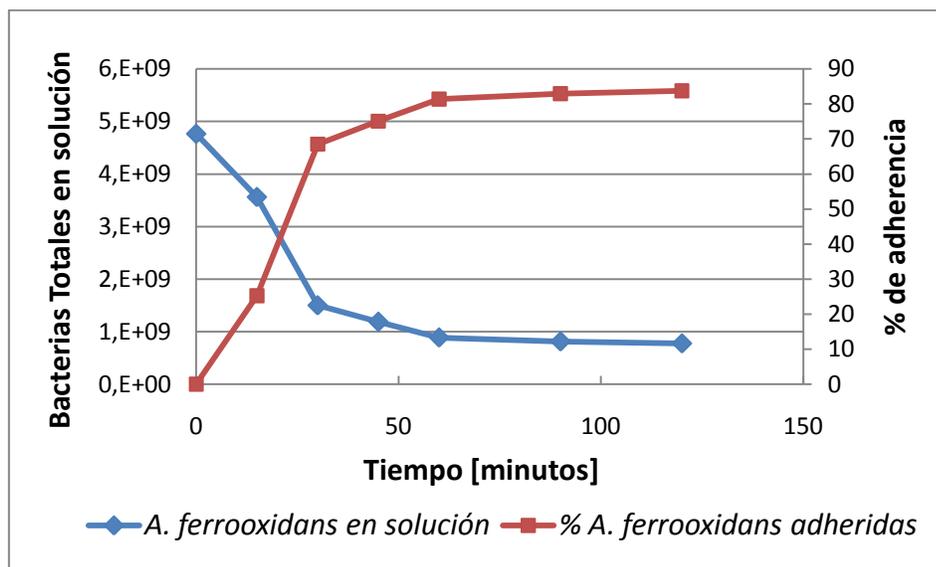


Figura 5: Recuento de bacterias totales y porcentaje de adherencia de *A. ferrooxidans* en solución a 30°C durante 120 minutos.

Por otra parte, la adherencia bacteriana de la cepa *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C sobre el concentrado de calcopirita se muestra en la Figura 6. En la gráfica se aprecia una concentración inicial de $1,8 \cdot 10^9$ bacterias totales, que al cabo de 60 minutos alcanza un porcentaje de adherencia de 76,4%, para finalmente llegar a una adherencia al mineral de un 86,4% al final del experimento.

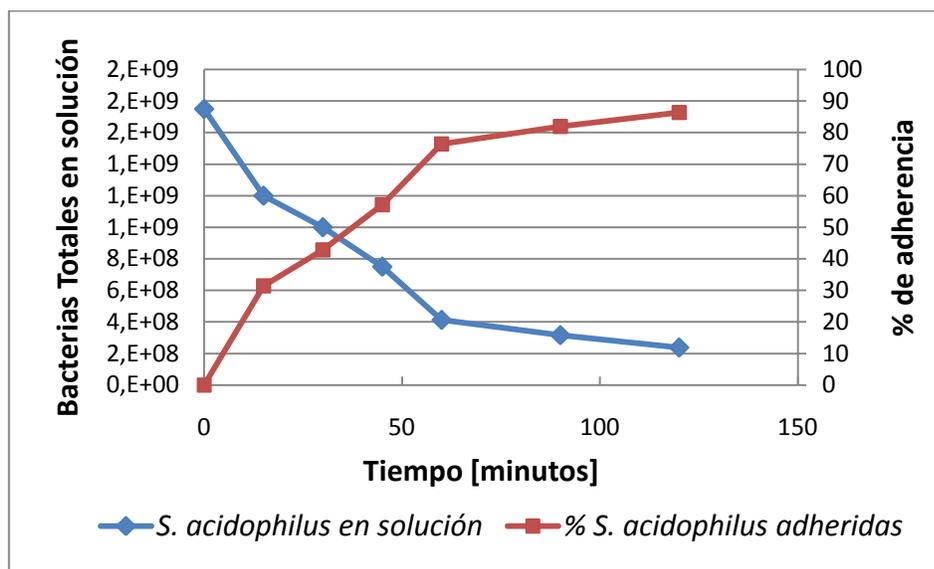


Figura 6: Recuento de bacterias totales y porcentaje de adherencia de *S. acidophilus* en solución a 45°C durante 120 minutos.

En la Figura 7 se comparan los porcentajes de adherencia de las dos cepas estudiadas en el presente trabajo. En ella se observa que la tasa de adherencia, durante los primeros 60 minutos, es mayor para el caso de la cepa *A. ferrooxidans* por sobre *S. acidophilus*. Sin embargo, al final de la experiencia se logran porcentajes de adherencia similares.

3.2 BIOLIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA POR *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* Y *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS*

En los siguientes subcapítulos se muestran los resultados obtenidos para el proceso de biolixiviación de Calcopirita por acción de un cultivo de microorganismos mesófilo, en particular, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y para un cultivo termófilo moderado, específicamente, *Sulfobacillus acidophilus*, con sus respectivos experimentos controles.

Durante el proceso de biolixiviación se monitorearon el cobre lixiviado y sulfato en solución. Además de los parámetros fisicoquímicos tales como Eh y pH, además la concentración de hierro (II) y hierro total por método de o-fenantrolina. Además se determinó el hierro precipitado en la solución y sobre el mineral mediante la digestión con ácido clorhídrico. Por último, se realizó el recuento de bacterias en solución y adheridas al mineral por el método de tinción con DAPI.

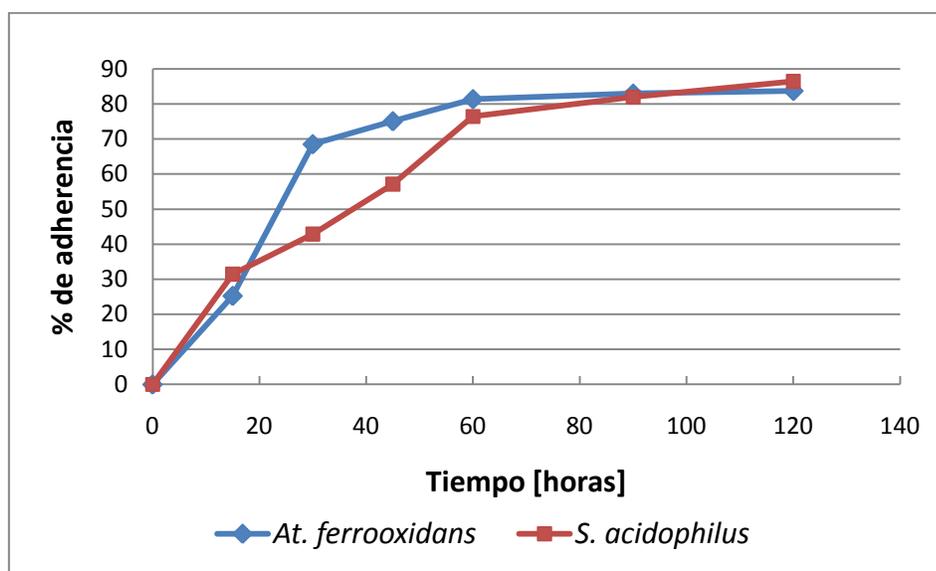


Figura 7: Porcentaje de adherencia de *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus* sobre un concentrado de calcopirita

La recuperación de cobre desde calcopirita por los distintos microorganismos estudiados se muestra en la Figura 8. En la Figura 9 se muestra la concentración de cobre con los valores ajustados al tiempo inicial. En ella se observa que en los experimentos incubados a 30°C, ya sean inoculados o sin microorganismos, la extracción de cobre tiene un aumento significativo en las primeras 96 horas de iniciado el ensayo llegando a los 90 ppm, para luego obtener una tasa de disolución cercana a cero, y finalmente extraer 110 ppm. Lo anterior podría deberse a que el efecto observado no corresponde a una biolixiviación y sería más bien una lixiviación química o una posible contaminación del experimento control.

Con respecto a los experimentos incubados a 45°C en presencia de *S. acidophilus* y en el experimento control, que también se muestra en la Figura 8 y 9, se aprecia un aumento significativo en las primeras 72 horas alcanzando una extracción de cobre de 110 ppm, para luego disminuir la tasa de disolución obteniéndose 160 ppm de cobre a las 336 horas. En éste punto se ve claramente una diferencia en las curvas de extracción de cobre. Estas diferencias en las velocidades de disolución de cobre se aprecian más claramente en la Figura 10. En la etapa I, que corresponde entre las 72 y

336 horas, los experimentos poseen una velocidad de extracción de 0,17[mg/L-hr] con un R^2 de 0,98. En la etapa II, que parte a las 336 horas, se ve como el experimento control disminuye a una velocidad de 0,13[mg/L-hr] con un R^2 de 0,92, mientras que el cultivo con *S. acidophilus* se aprecia una disminución mayor alcanzando los 0,038[mg/L-hr] con un R^2 de 0,78.

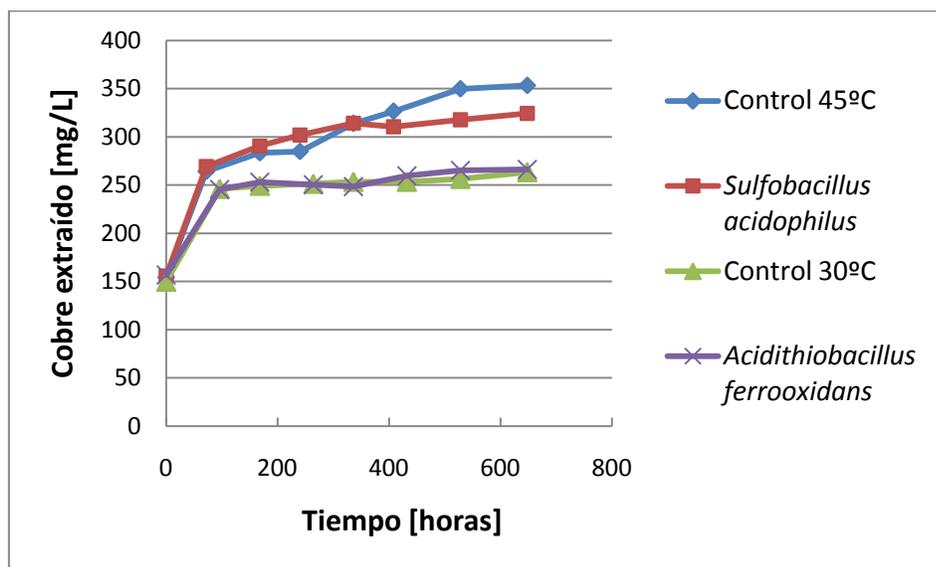


Figura 8: Recuperación de cobre desde calcopirita con *S. acidophilus* y *A. ferrooxidans* y sus respectivos experimentos controles.

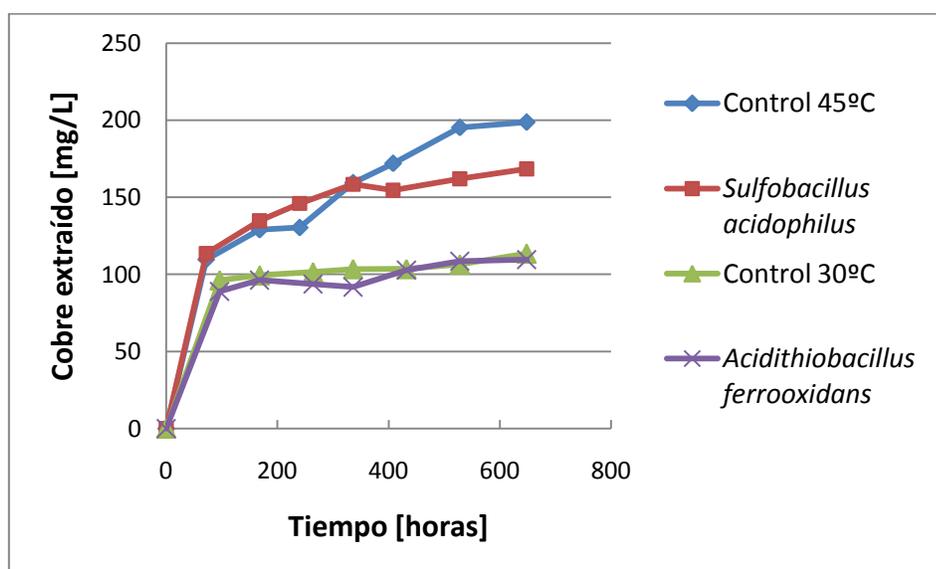


Figura 9: Recuperación de cobre desde calcopirita con *S. acidophilus* y *A. ferrooxidans* y sus respectivos experimentos controles ajustados a tiempo cero.

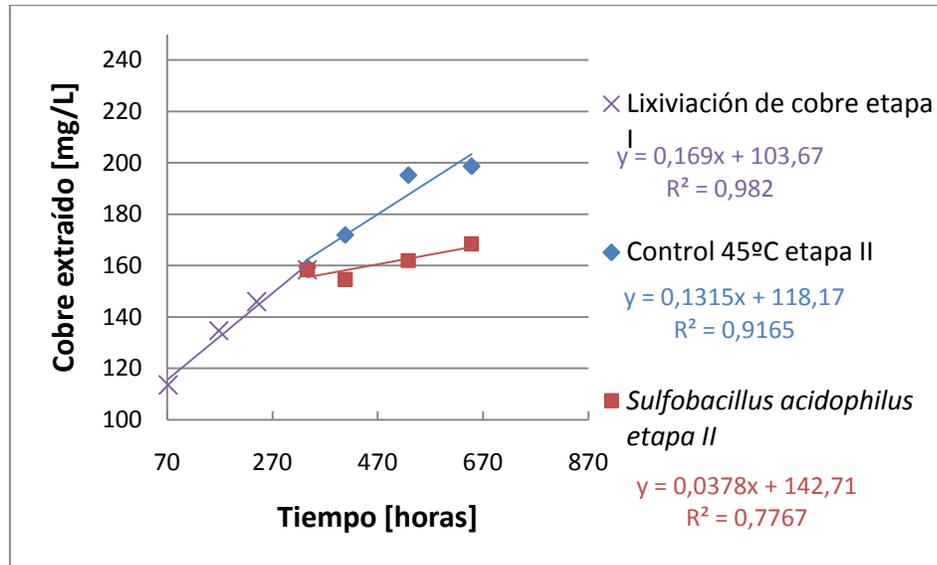


Figura 10: Disolución de cobre a partir de las 72 horas de ensayo para cultivo de *S. acidophilus* y experimento control a 45°C

El aumento de la temperatura desde 30 a 45°C tuvo un efecto positivo sobre la disolución de calcopirita, al contrario del efecto negativo de la inoculación de microorganismos lo que se demuestra en los porcentajes de recuperación de cobre mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1: Porcentaje de recuperación de cobre para los cultivos estudiados

| Cultivo | Porcentaje de recuperación de cobre % |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 7,58 |
| Control 30 °C | 7,58 |
| <i>Sulfobacillus acidophilus</i> | 11,25 |
| Control 45 °C | 13,27 |

En la Figura 11, se observa el efecto del cobre sobre la acción catalítica de *S. acidophilus*, mediante el experimento con distintas concentraciones de cobre (como sulfato de cobre). En ella se observa un aumento del potencial electroquímico en el cultivo sin cobre desde los 408 hasta los 568 [mV vs Ag/AgCl] en las primeras 24 horas, hasta alcanzar un potencial de 600 [mV vs Ag/AgCl] a las 48 horas. Por otra parte, en los cultivos en presencia de cobre se observa una menor tasa de aumento del potencial que la presentada por el cultivo sin cobre, alcanzando recién a las 120 horas un potencial de 600 [mV vs Ag/AgCl]. Esto nos permite inferir, que la cepa *S. acidophilus*

estudiada en esta investigación es al menos tolerante hasta una concentración de cobre de 400 mg/L, pero requirió de un tiempo de adaptación a la presencia de cobre.

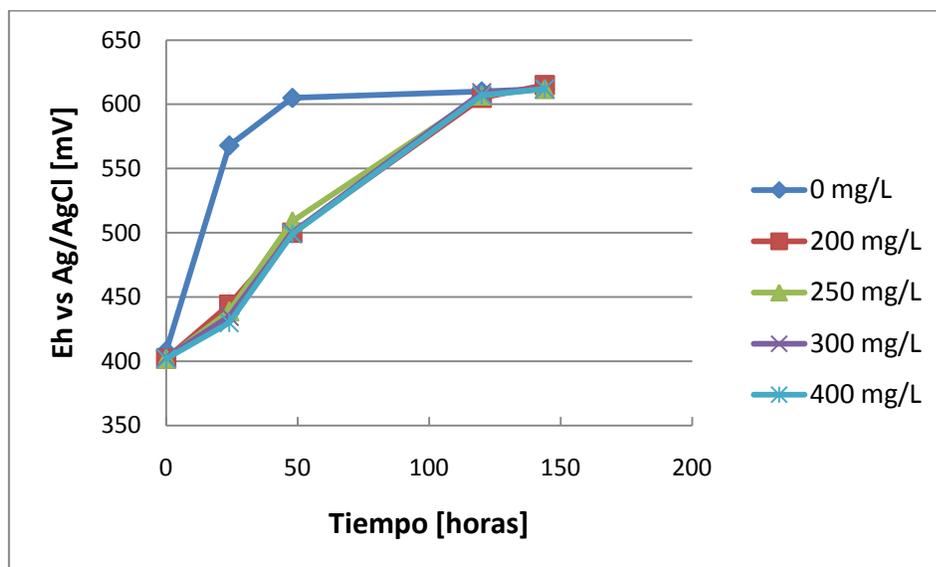


Figura 11: Variación del Eh en presencia de 2 g/L de ferroso y 0,02% de extracto de levadura y concentraciones de cobre de 0, 200, 250, 300 y 400 mg/L.

En la Figura 12A se muestran los resultados obtenidos para la disolución de calcopirita por acción de *S. acidophilus* bajo distintas condiciones de ión ferroso inicial, en la Figura 12B se aprecia más detalladamente el porcentaje de recuperación alcanzado por *S. acidophilus*. Durante las primeras 192 horas se observa un aumento hasta una concentración de cobre aproximada de 130 ppm, sin diferencias entre concentraciones de ión ferroso inicial. En las siguientes horas se logra mayores niveles de recuperación de cobre cuando la concentración de ión ferroso inicial es de 2 [g/L], lo que indicaría un efecto positivo de la acción del ión ferroso inicial en la disolución de la calcopirita.

La disolución de azufre como sulfato por disolución de calcopirita se observa en la Figura 13 para los cultivos inoculados con *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus*. Durante las primeras horas de biolixiviación se ve un aumento significativo en la concentración de azufre, acorde con lo descrito anteriormente con respecto a la recuperación de cobre, para ambos microorganismos (Figura 8 y 9). Sin embargo, a las 168 horas se ve un descenso en la concentración de azufre, siendo este decaimiento mayor para el caso de *A. ferrooxidans*, esto se podría deber a una precipitación de sulfato como jarosita. En cuanto al cultivo de termófilo moderado se aprecia una menor disminución de azufre con respecto al cultivo a 30 °C. Cabe destacar que los valores de la concentración de azufre corresponden sólo al referido al sulfato en solución, pues con

el método utilizado no es posible determinar compuestos intermediarios como polisulfuros y azufre elemental.

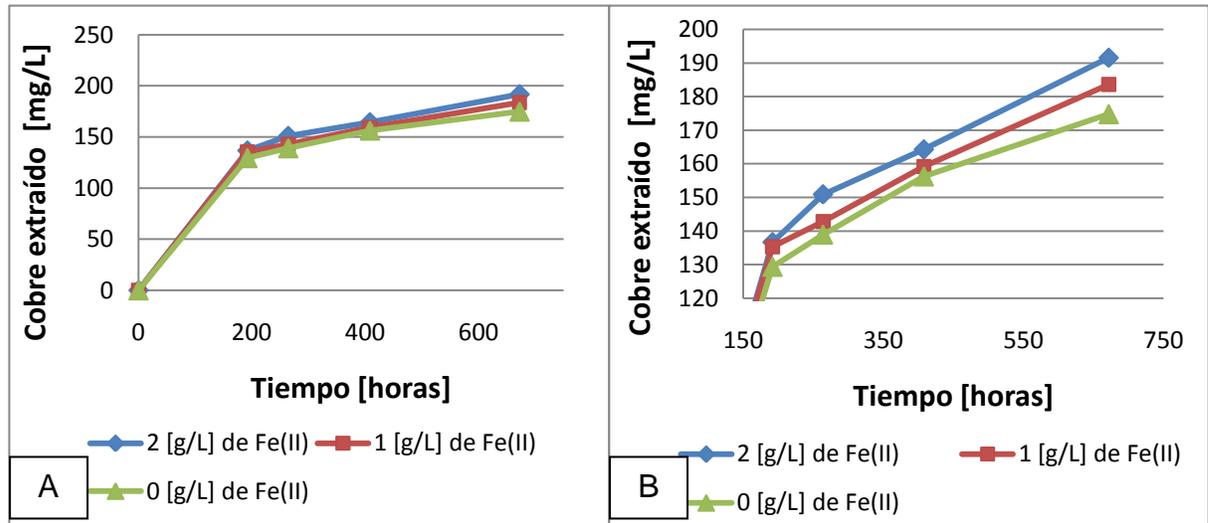


Figura 12: A: Recuperación de cobre desde calcopirita por *S. acidophilus* bajo diferentes condiciones iniciales de ión ferroso a 45°C. En B se muestra una ampliación de A.

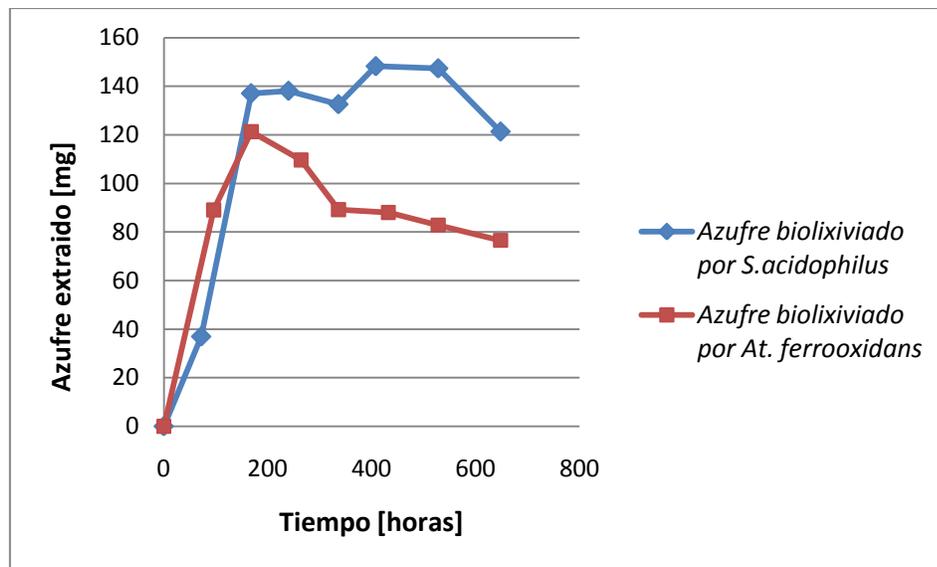


Figura 13: Recuperación de azufre desde de calcopirita por la acción de *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus* a 30 y 45 °C respectivamente.

En la Figura 14 se muestra la variación del potencial electroquímico en el proceso de biolixiviación de calcopirita por acción de *A. ferrooxidans* a una temperatura de 30°C y su respectivo experimento control. En ella se observa un potencial de 350 [mV vs Ag/AgCl] al inicio del ensayo, indicando que la mayoría del hierro está en estado

ferroso, en concordancia con las condiciones iniciales del proceso. En las primeras horas del monitoreo se observa un aumento en el potencial para luego establecerse en el tiempo en un valor constante en torno a los 570 [mV vs Ag/AgCl], lo cual indica que el hierro en solución se encuentra en su máximo estado de oxidación (ión férrico). Cabe destacar, que la actividad bacteriana se aprecia por la diferencia de potencial entre los cultivos inoculados y el experimento control. Sin embargo, en el experimento control se observó un incremento del potencial sobre los 400 [mV vs Ag/AgCl], que se hace notorio a las 168 horas, llegando a igualar el potencial del cultivo con microorganismos transcurridos 432 horas que se mantiene hasta el final de la experiencia. Esto es posiblemente, debido a que el mineral no fue esterilizado inicialmente, produciéndose el desarrollado de los microorganismos presentes en la calcopirita o por una contaminación del cultivo control. Esto sería concordante con que la recuperación de cobre en el cultivo mesófilo y el experimento control fueran similares.

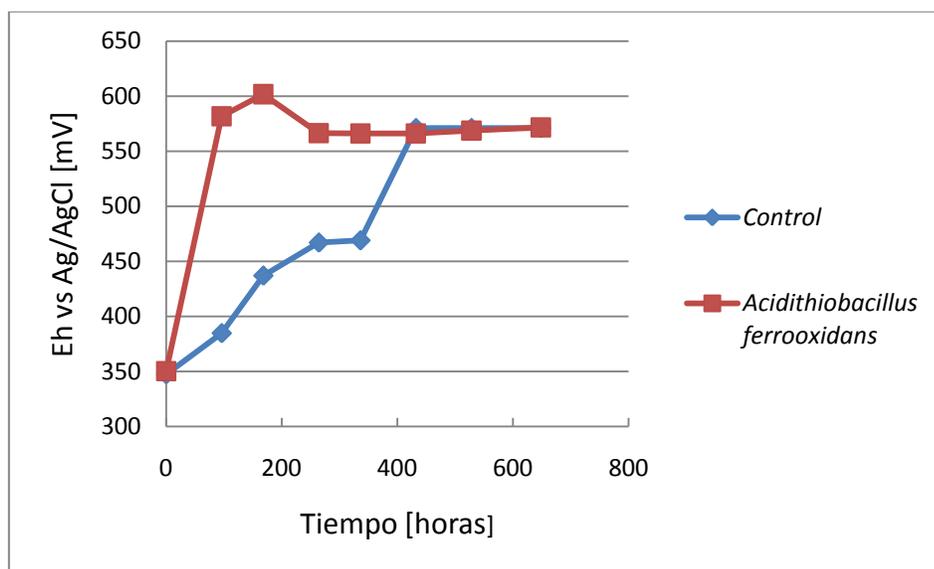


Figura 14: Variación del Eh durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C y su respectivo experimento control.

Las curvas de pH del cultivo con *A. ferrooxidans* y su experimento control se muestran en la Figura 15, donde se observa un incremento desde pH 1,7 hasta pH 2,1 en las primeras 96 horas en el cultivo inoculado, lo que se puede deber tanto a un consumo de protones debido a la oxidación biológica de ión ferroso a ión férrico (ecuación 9) como a una posible oxidación de calcopirita por oxígeno disuelto (ecuación 6). Para evitar la formación de exceso de precipitados, que pasiven el mineral, se ajustó el pH a un valor de 1,6 a las 96 horas de proceso. A partir de las 264 horas, el pH tiende a decrecer, lo que indicaría que la oxidación de azufre elemental a sulfato (ecuación 8 y 10) como a la formación de precipitados de hidróxido férrico, como jarositas, (ecuación 18), son mayores que la oxidación del ión ferroso y calcopirita.

Luego, en las horas finales del experimento, se aprecia una estabilización del pH lo que mostraría que la generación y consumo de protones se equilibran. En el caso del cultivo control se observa un comportamiento similar al mostrado por el cultivo con *A. ferrooxidans*, no obstante, el incremento en las primeras es menor con respecto al cultivo inoculado, asociando éste aumento sólo a la oxidación química del ión ferroso.

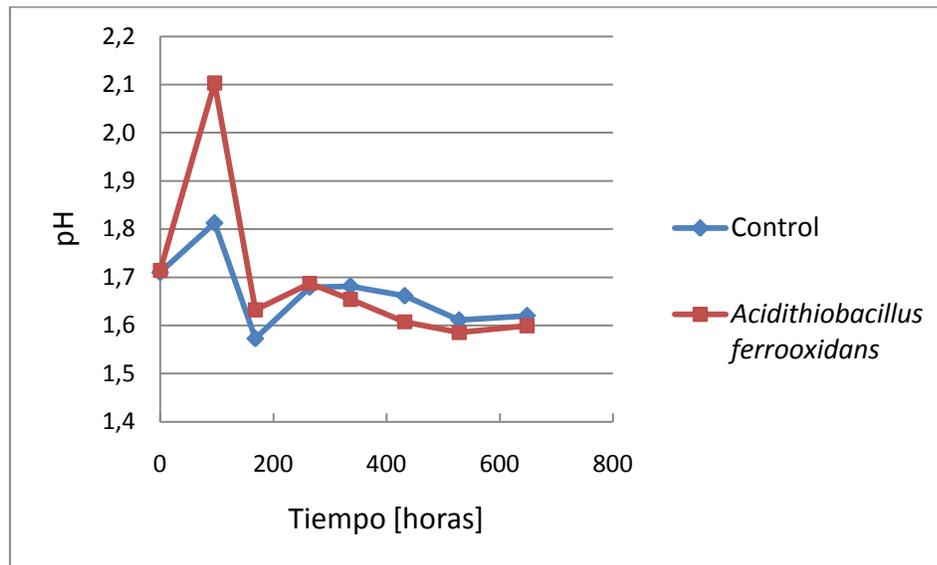


Figura 15: Variación del pH durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por *Acidithiobacillus ferrooxidans* a 30°C y su respectivo experimento control.

Como se observa en la Figura 16, al inicio del proceso de biolixiviación con *A. ferrooxidans* el hierro total se encuentra principalmente como ión ferroso en una concentración cercana a los 2300 ppm correspondiente a las condiciones iniciales del proceso. Transcurrido 96 horas de experimento, la concentración de ión ferroso decae llegando a una concentración de 100 ppm, mientras la concentración de ión férrico aumenta a los 1600 ppm, lo cual es concordante con los valores obtenidos de Eh y pH a dicho intervalo de tiempo. A partir de éste tiempo el 96% aproximadamente de la concentración de hierro total experimental se encuentra como ión férrico; sin embargo, no se observa un aumento en el hierro total por disolución de la calcopirita durante el curso de la biolixiviación al realizar las mediciones con el método de o-fenantrolina y digestión con ácido clorhídrico. Si bien el método con HCl solubiliza todo el hierro precipitado, no fue posible solubilizar el precipitado de las paredes del matraz. Se calculó el hierro total teórico a partir del cobre lixiviado (ecuación 28), el cual al final de la experiencia alcanza una concentración de 2.432 ppm, observándose una diferencia apreciable de 1.033 ppm con respecto a lo medido experimentalmente. Esta diferencia es posiblemente debido a la precipitación del ión férrico como hidróxido de Fe (III) y/o jarositas.

En la Figura 17 se observa la evolución de la concentración de fierro en el experimento control a 30 °C. Al igual que el caso anterior, el fierro total al inicio de la experiencia se encuentra principalmente como ión ferroso, correspondiente a las condiciones iniciales del proceso. Durante el transcurso del tiempo la concentración de ión ferroso disminuye constantemente, hasta alcanzar una concentración de 60 ppm al finalizar la experiencia. Con respecto al ión férrico, pasadas las 168 horas de experimento, la concentración aumenta progresivamente hasta que el 96% del fierro total corresponde a ión férrico. La oxidación de ión ferroso a ión férrico en el experimento control, da cuenta de la contaminación del frasco del experimento estéril lo cual es coherente con la recuperación de cobre y las curvas de Eh y pH obtenidas. Al igual que el caso del cultivo con microorganismos, se observa una disminución en el fierro total, con una diferencia de 1.000 ppm con respecto al fierro total teórico, producto de la precipitación del ión férrico como hidróxido férrico o jarosita.

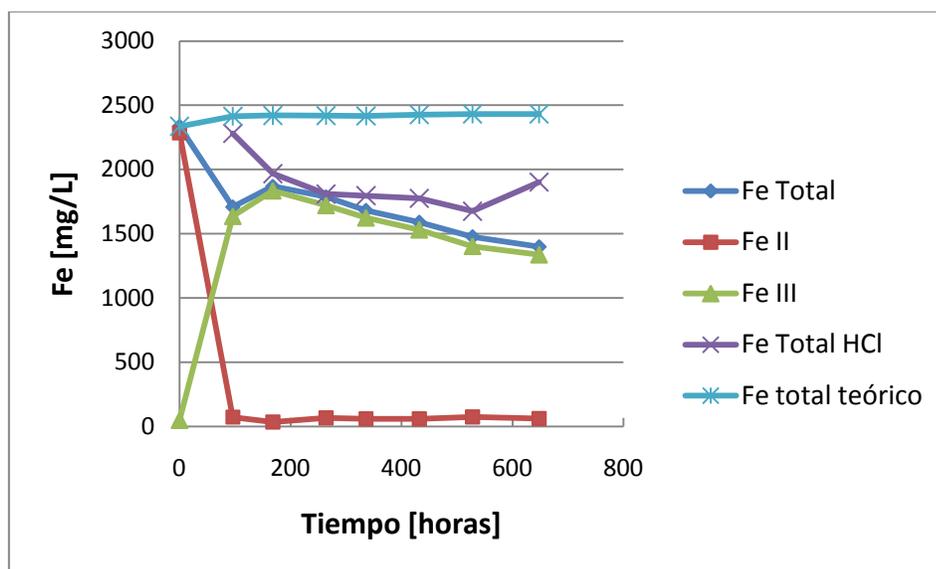


Figura 16: Evolución de la concentración de fierro en la solución durante el proceso de biolixiviación con *A. ferrooxidans*.

En la Figura 18 se observa la variación del potencial electroquímico en el proceso de biolixiviación de calcopirita por acción de *S. acidophilus* a 45°C. Inicialmente éste presenta un valor de 350 [mV vs Ag/AgCl], indicando que la mayoría del fierro está en estado ferroso, correspondiente a las condiciones iniciales del proceso. Durante las primeras horas del monitoreo el potencial se eleva hasta los 630 [mV vs Ag/AgCl], dando cuenta que el fierro en solución se encuentra en estado de ión férrico, disminuyendo paulatinamente hasta los 600 [mV vs Ag/AgCl] al final del monitoreo. Por otra parte, en la Figura 18 se muestra además el experimento control, el cual inicia al mismo potencial del cultivo inoculado, sin embargo, el potencial alcanza un valor menor

en torno a los 420 [mV vs Ag/AgCl], mostrando que el hierro se encuentra principalmente como ión ferroso.

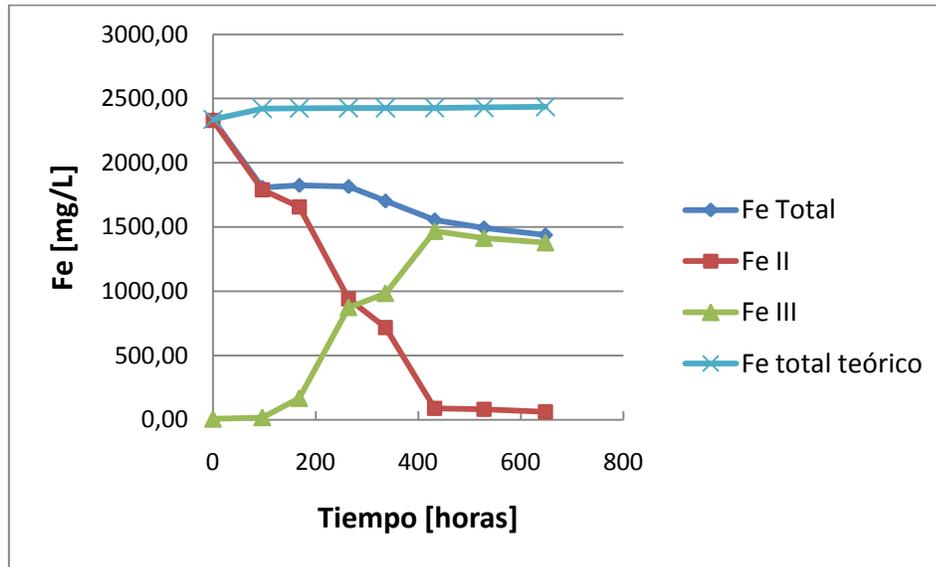


Figura 17: Evolución de la concentración de hierro en la solución durante el proceso de lixiviación en experimento control a 30°C

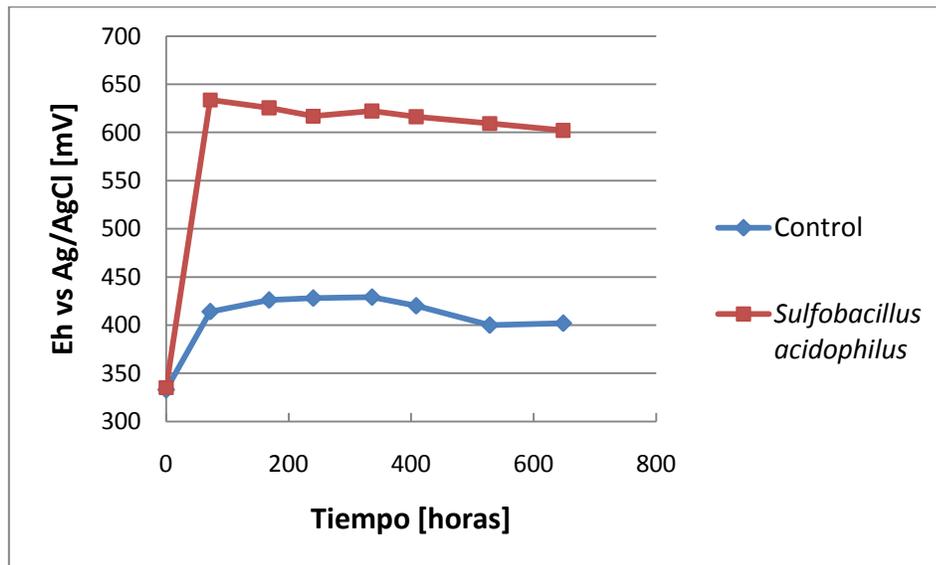


Figura 18: Variación del Eh durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C y su respectivo experimento control.

A continuación, se muestra en la Figura 19 la variación del pH del cultivo inoculado con *S. acidophilus* y su control a 45°C, en el tiempo de monitoreo. El pH inicial del medio basal inoculado es cercano a 2, por lo cual se ajustó, para evitar la precipitación de hidróxido férrico, observándose una disminución y posterior valor constante en torno a los 1,64, infiriéndose que la generación y consumo de protones se

equilibra. A partir de las 408 horas se observa una disminución del pH lo que implicaría que la tasa de generación de protones es mayor que de la de consumo, lo que indicaría un aumento de la precipitación de ión férrico en forma de jarosita o hidróxido férrico (ecuación 18) como también a la oxidación biológica de azufre elemental (ecuación 10). En cuanto al experimento control, se observa un comportamiento similar al cultivo inoculado, sin embargo, a partir de las 408 horas se muestra un aumento en el pH hasta los 1,86, deduciéndose que la tasa de consumo de H^+ es mayor que la de generación posiblemente a la oxidación química de la calcopirita por oxígeno disuelto (ecuación 6) o por el mecanismo de polisulfuro (ecuación 11) y a una menor precipitación de jarositas (ecuación 18)

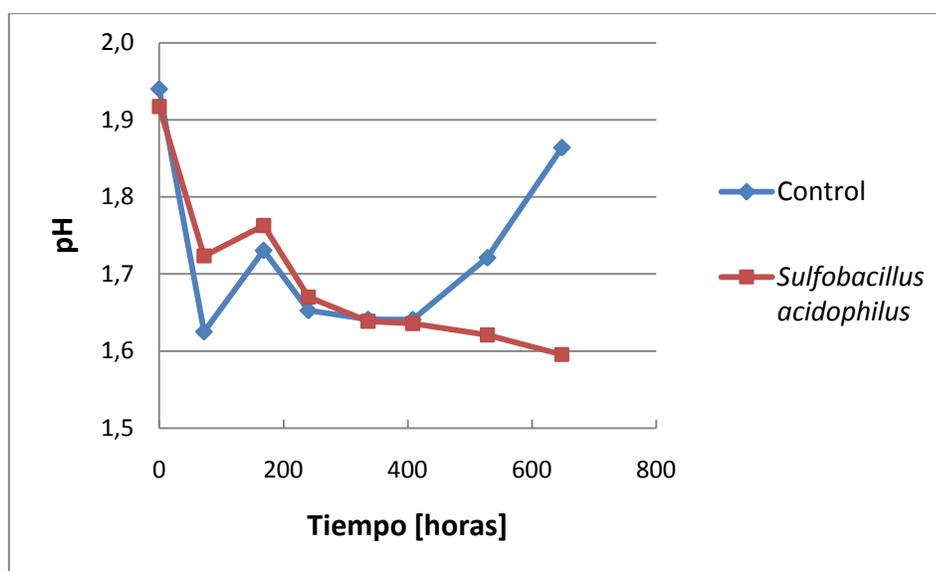


Figura 19: Variación del pH durante el proceso de biolixiviación de calcopirita por *Sulfobacillus acidophilus* a 45°C y su respectivo experimento control.

En la Figura 20 se observa la evolución de la concentración de hierro durante el monitoreo de la biolixiviación con *S. acidophilus*, que al igual que el caso con *A. ferrooxidans*, al inicio del proceso de biolixiviación el hierro total se encuentra principalmente como ión ferroso, en una concentración aproximada de 2300 ppm. A las 72 horas se observa un descenso de la concentración de ión ferroso alcanzando una concentración de 90 ppm, simultáneamente la concentración de ión férrico aumenta hasta las 1900 ppm lo cual es concordante con el aumento de Eh durante estas horas (Figura 17). A partir de esta hora aproximadamente el 97% de la concentración de hierro total se encuentra como ión férrico. Sin embargo, no se observa un aumento en el hierro total por disolución de la calcopirita durante el curso de la biolixiviación; no obstante, se ve una diferencia significativa de 700 ppm entre el hierro total medido por el método de o-fenantrolina y la disolución con ácido clorhídrico. Es más, al compararlo con el hierro

total teórico lixiviado la diferencia aumenta a 950 ppm, asociándose esta diferencia con el hierro precipitado.

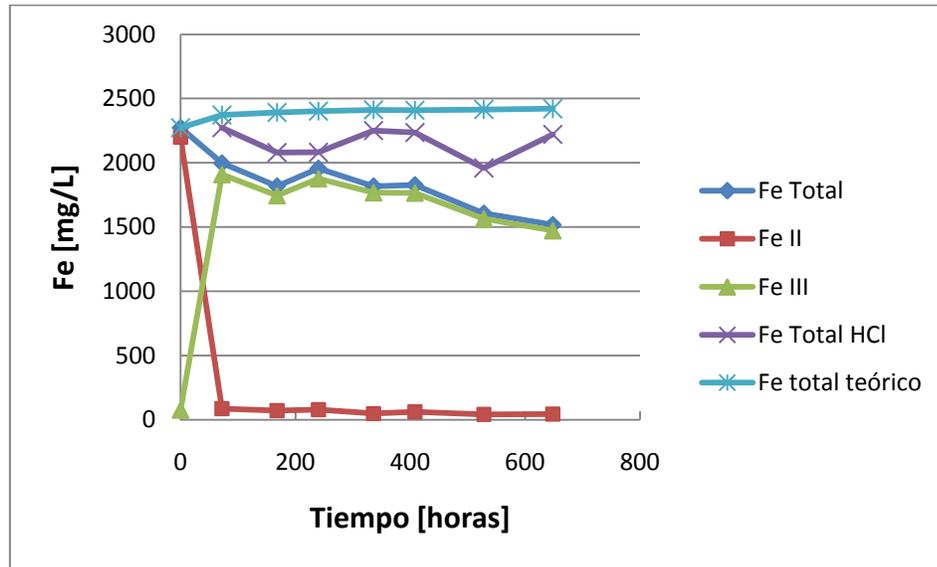


Figura 20: Evolución de la concentración de hierro en la solución durante el proceso de biolixiviación con *S. acidophilus*.

En la Figura 21 se observa la variación de la concentración de hierro en el experimento control sin microorganismos a 45°C. Inicialmente se aprecia una concentración de hierro total y ferroso acorde a las condiciones iniciales del experimento. Al pasar las horas, la concentración de ferroso disminuye aumentando así la concentración de ión férrico, pero en comparación con el cultivo inoculado, el ión ferroso oxidado a ión férrico es un 80% mayor que el experimento control. Además, se ve una disminución del hierro total llegando a una concentración de 1700 ppm, que al compararla con el hierro total teórico lixiviado se tiene una diferencia de 570 ppm.

En la tabla 2 se muestra un resumen del hierro precipitado como jarositas en los experimentos realizados. Esta capa pasivante evitaría el intercambio iónico entre la solución lixiviante y el mineral de calcopirita.

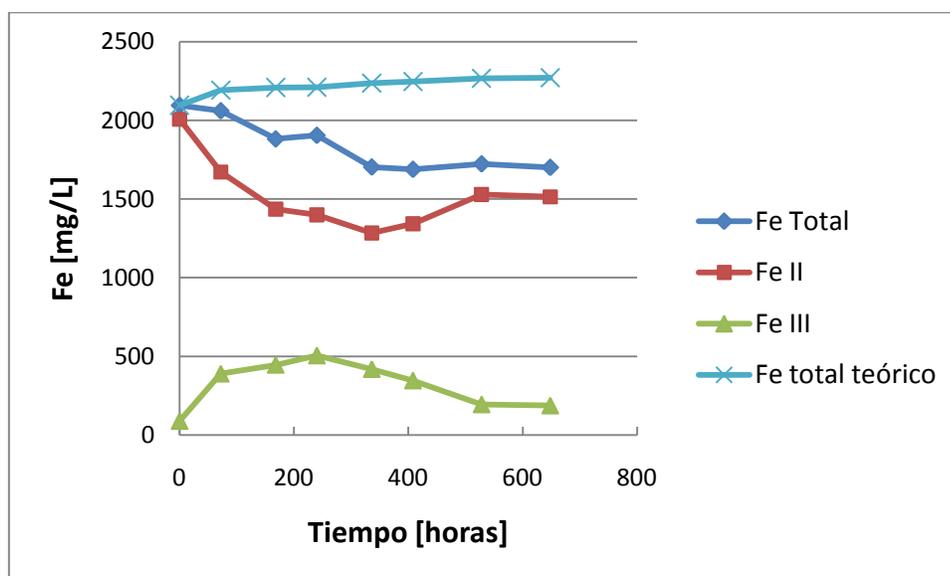


Figura 21: Evolución de la concentración de hierro en la solución durante el proceso de lixiviación en cultivo control a 45°C

Tabla 2: Concentración de hierro precipitado como jarositas en los experimentos realizados

| Cultivo | Fierro precipitado [mg/L] |
|---------------------------------------|---------------------------|
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> | 1.033 |
| Control 30 °C | 1.000 |
| <i>Sulfobacillus acidophilus</i> | 950 |
| Control 45 °C | 570 |

3.2.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PLANKTÓNICAS Y ADHERIDAS A LA SUPERFICIE DEL MINERAL

A continuación se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación tanto de las bacterias en la solución lixiviante como de las que se encuentran adheridas en la superficie del mineral, durante el proceso de biolixiviación de calcopirita con *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus*. La cuantificación de las bacterias se realizaron en todos los puntos del monitoreo de las experiencias.

Para la cuantificación de las bacterias en la solución se utilizó tinción con DAPI y observación al microscopio de epifluorescencia, y se aplicó el tratamiento matemático descrito en la sección 2.4.3. Por otra parte, para la cuantificación de las bacterias en la superficie del mineral también se utilizó tinción con DAPI y observación al microscopio de epifluorescencia. Además, siguiendo la metodología de la sección 2.4.3 se determinó el área promedio de las partículas, su radio y volumen mostrados en la Tabla

3, para determinar el área total disponible para la adherencia de las bacterias al mineral que corresponde a $2,6 \cdot 10^{11} \mu\text{m}^2$, para 0,5 g de calcopirita (Tabla 4).

Tabla 3: Área, radio y volumen de la partícula de calcopirita

| Partícula promedio | | Unidad |
|---------------------------|-------|-----------------|
| Área círculo | 6,62 | μm^2 |
| Radio esfera | 1,45 | μm |
| Volumen esfera | 12,82 | μm^3 |
| Área esfera | 26,48 | μm^2 |

Tabla 4: Propiedades y área disponible de calcopirita

| Mineral | | Unidad |
|----------------|----------------------|------------------------|
| Masa | 0,5 | g |
| Densidad | 3,93 | g/cm^3 |
| Área total | $2,63 \cdot 10^{11}$ | μm^2 |

Este experimento se realizó con el fin de determinar el comportamiento de las bacterias al adherirse al mineral y su posible acción lixivante mediante por el mecanismo de contacto.

3.2.1.1 *Cuantificación de A. ferrooxidans*

a) *Bacterias Planktónicas.*

En la Figura 22 se muestra la evolución de *A. ferrooxidans* en solución. Se observa que las bacterias totales en el tiempo cero era de $9,7 \cdot 10^8$, que equivale a una concentración inicial de $9,7 \cdot 10^6$ bacterias/mL. En el transcurso del tiempo se aprecia un crecimiento hasta las 432 horas. Cabe destacar que no se consideró la cuantificación de la hora 336 debido a que su valor se desvía considerablemente de la tendencia mostrada durante todo el experimento. Luego del punto de la hora 432 se ve una disminución de la tasa de crecimiento hasta el final del experimento.

b) *Bacterias adheridas a la superficie del mineral.*

En la Figura 23 se observa la evolución de las bacterias adheridas sobre el concentrado de calcopirita. En ella se aprecia una disminución desde $1,3 \cdot 10^{12}$ a $7,3 \cdot 10^{11}$ bacterias totales.

Cabe destacar que esta disminución se debe principalmente a lo complejo de realizar el conteo dado la precipitación de hidróxido férrico o jarositas que se observaba sobre el mineral. El mineral de calcopirita al ser expuesto a la luz ultravioleta resplandece, sin embargo, esto no sucedió al existir precipitado sobre el mineral observándose de color negro, por lo que se podría suponer que las bacterias se encontrarían bajo esta capa pasivante.

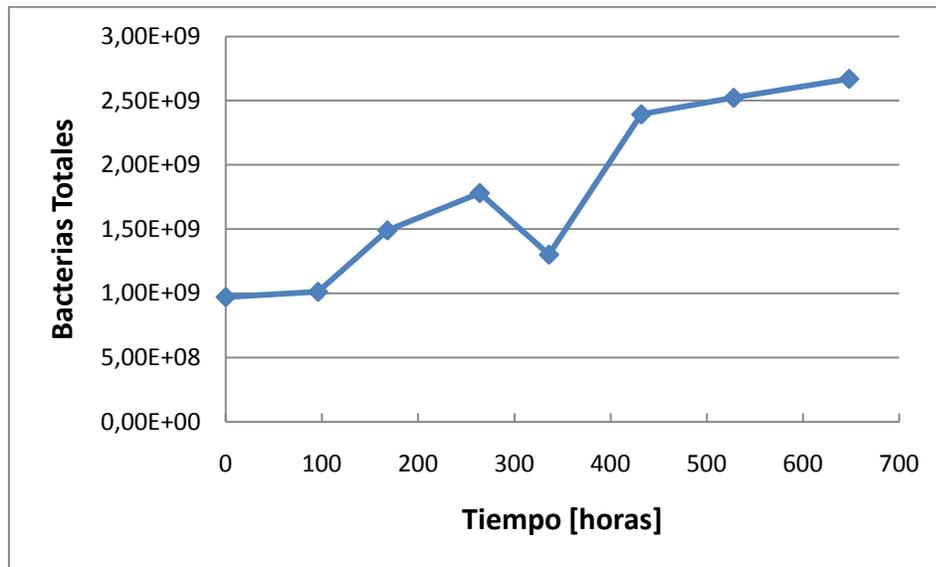


Figura 22: Evolución en el tiempo de bacterias *A. ferrooxidans* en la solución lixiviante.

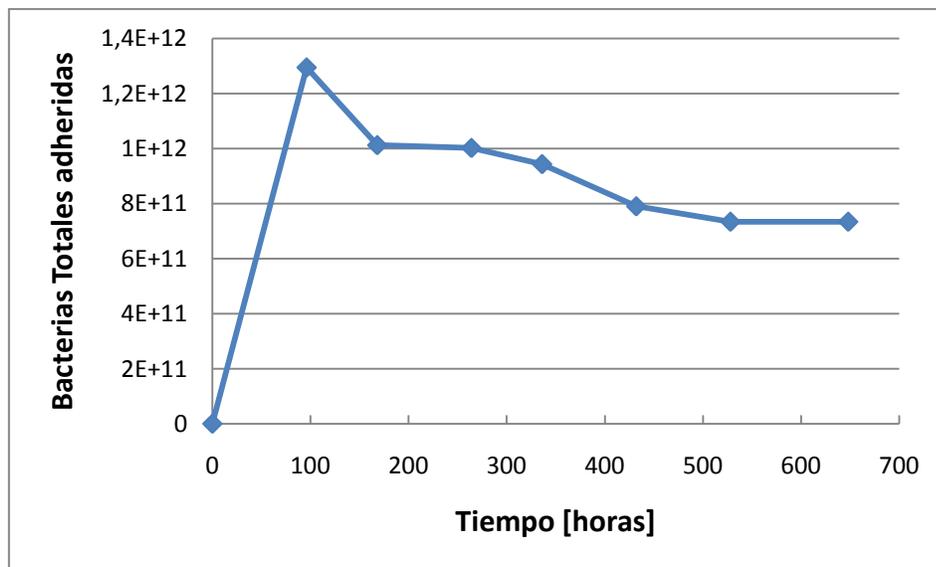


Figura 23: Evolución en el tiempo de bacterias *A. ferrooxidans* en la superficie del mineral.

3.2.1.2 Cuantificación de *S. acidophilus*

a) Bacterias Planktónicas

En la Figura 24 se muestra la evolución de *S. acidophilus* en la solución lixiviante del mineral calcopirita. En ella se aprecia que las bacterias totales inicial es de $6 \cdot 10^{10}$, con lo que se tiene una concentración inicialmente era de $6 \cdot 10^8$ [bacterias/mL]. Luego se observa una disminución de la población total de bacterias en la solución hasta un valor de $1 \cdot 10^{10}$ bacterias a las 264 horas, manteniéndose relativamente constante en torno a este valor hasta el final de la experiencia. Debido a esta disminución de la población no es posible determinar la velocidad de crecimiento máxima pues claramente no se observó crecimiento.

b) Bacterias adheridas a la superficie del mineral.

En la Figura 25 se muestra la evolución de la población adherida de *S. acidophilus* sobre la superficie del mineral. Se aprecia en la gráfica una disminución desde $8,8 \cdot 10^{11}$ a $6,0 \cdot 10^{11}$ bacterias adheridas al mineral hasta las 432 horas, pues luego de este tiempo no se observó bacterias en las muestras.

Como se mencionó para el caso de *A. ferrooxidans*, en este caso el precipitado de hidróxido de hierro impidió observar con claridad el mineral y también las bacterias adheridas a él. Lo anterior se ve más claramente reflejado en el caso de *S. acidophilus* en las mediciones realizadas en las últimas horas del experimento donde no se visualizaron bacterias.

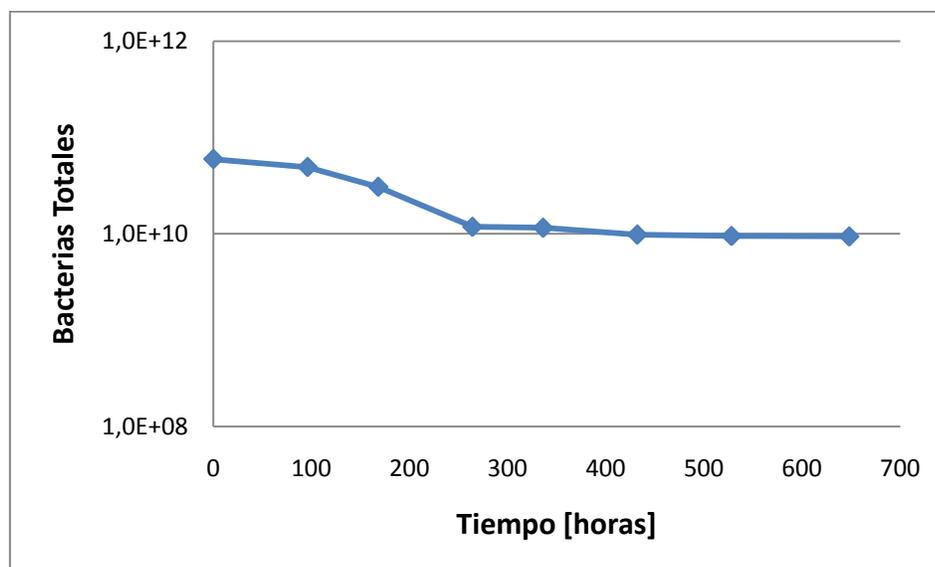


Figura 24: Evolución en el tiempo de bacterias *S. acidophilus* en la solución lixiviante.

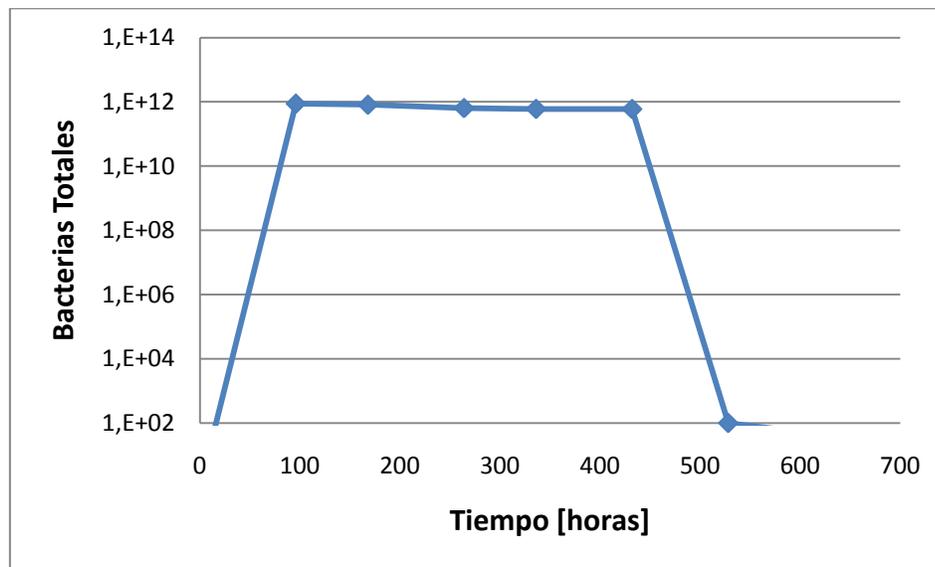


Figura 25: Evolución en el tiempo de bacterias *S. acidophilus* en la superficie del mineral.

3.2.2 MODELO DEL NÚCLEO SIN REACCIONAR

Para determinar la velocidad de reacción y la etapa limitante en este proceso, se aplicó el método del núcleo sin reaccionar mediante el análisis del cobre extraído como conversión de la reacción de biolixiviación. Cabe destacar, que se restó la concentración de cobre del tiempo cero a todas las concentraciones de los tiempos de lixiviación.

En las Figuras 26 y 27 se muestran las gráficas de los modelos para las cepas de *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus*. En la cual se aprecia que la etapa controlante para ambos casos es el control por la difusión ya que son las curvas que presentaron un coeficiente de correlación (R^2) más cercano a 1, obteniéndose un tiempo de disolución total del sólido (τ) de 500.000 y 166.667 horas respectivamente.

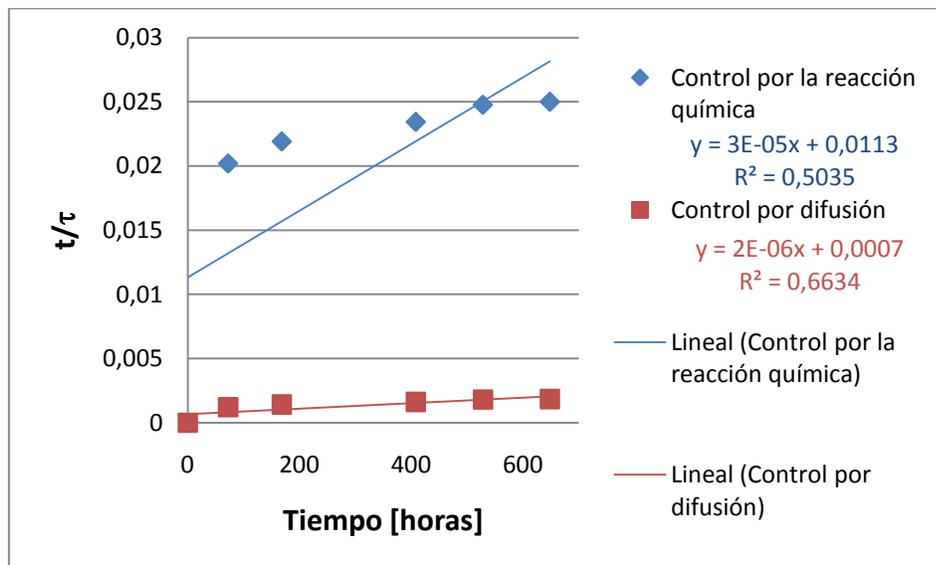


Figura 26: Modelo núcleo sin reaccionar para la biolixiviación de calcopirita por *A. ferrooxidans* a 30 °C

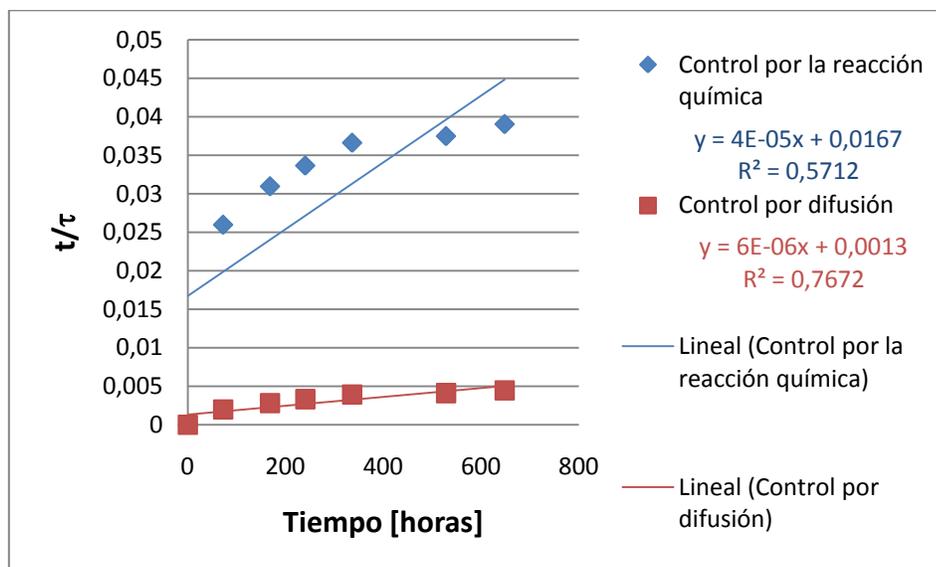


Figura 27: Modelo núcleo sin reaccionar para la biolixiviación de calcopirita por *S. acidophilus* a 45 °C

CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN

4.1 ADHERENCIA BACTERIANA SOBRE CALCOPIRITA

La capacidad de adherencia de los microorganismos inoculados con *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus*, que se muestra en la Figura 7, alcanza para ambos microorganismos un porcentaje cercano al 84%, lo que representa la alta capacidad que tendrían estas bacterias para la lixiviación por el método de contacto. Este método de lixiviación permitiría el contacto entre el mineral y las bacterias y por consiguiente la oxidación de los sulfuros en la superficie del mineral, debido a la capacidad azufre-oxidante que poseen ambas cepas. Lo anterior, evitaría una posible pasivación de la calcopirita y por ende una mejor disolución del mineral aumentando así la recuperación de cobre.

4.2 BIOLIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA POR *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*

La tasa de lixiviación de cobre desde calcopirita no mostró una diferencia significativa entre el cultivo inoculado con *A. ferrooxidans* y el experimento control, según lo mostrado en la Figura 9. El porcentaje de recuperación de cobre al final de la experiencia corresponde a un 7% en ambos experimentos. En experimentos realizados por Sasaki et al. (2009), se obtuvo un porcentaje cercano al 2% en la recuperación de cobre desde calcopirita para el experimento no inoculado, por lo que se esperaría un porcentaje similar. Lo anterior debido a que el experimento control presentó contaminación con microorganismo lo que se ve apoyado por el comportamiento de Eh, pH y fierro en solución.

En la Figura 14 se observa un incremento Eh del experimento control por sobre 450 [mV vs Ag/AgCl] a las 336 horas, para luego igualar el potencial del cultivo con microorganismos. Esto último se explicaría por la contaminación del cultivo, pues en condiciones estériles el potencial debería mantenerse en torno a los 400mV (Bevilaqua et al. 2002; Sasaki et al. 2009). Mientras, en el cultivo inoculado con *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se observa un aumento de Eh desde 350 hasta 600 [mV vs Ag/AgCl], según lo mostrado en la Figura 14, lo que indicaría que la mayor parte del ión ferroso se oxidó al estado de Fe^{+3} .

Con respecto a la evolución del pH, mostrado en la Figura 15, durante las primeras 96 horas se incrementó desde 1,7 hasta 2,1 en el cultivo inoculado, esto mostraría la acción fierro-oxidante de *A. ferrooxidans*, que oxida tanto Fe^{+2} como S^0 , y que probablemente utilizó el ión ferroso que era la fuente de energía más accesible, y

cuya reacción consume H^+ aumentando así el pH. No ocurre así con el azufre, debido a que este no se encuentra inicialmente disponible y que conlleva generación de H^+ . Sin embargo, pasadas las 264 horas se aprecia que la generación de protones es mayor que el consumo lo que se traduce en la disminución del pH, lo que se podría deber a la acción azufre-oxidante de *A. ferrooxidans* al estar disponibles compuestos reducidos de azufre de la oxidación de la calcopirita y/o a la generación de precipitados de jarositas (según la ecuación 18).

En la Figura 16 se muestra el hierro en solución, donde se aprecia un aumento del ión férrico en el cultivo inoculado durante las primeras horas del experimento, mientras que el ión ferroso disminuye hasta concentraciones bajo los 100 ppm, lo que confirmaría el comportamiento de Eh y pH descritos anteriormente. La oxidación del ión ferroso da cuenta de la actividad hierro-oxidante del inóculo de *A. ferrooxidans*. Mientras que en las primeras horas del experimento control mostrado en la Figura 17, donde no habría contaminación, el ión férrico se encuentra en torno a las 20 ppm, sin embargo a las 400 horas alcanza una concentración de 1500 [mg/L].

Durante la experiencia no se observó un aumento en el fierro total en solución determinado por el método de la o-fenantrolina para ambos experimentos, si no por el contrario, se vio una disminución de éste. De igual manera se apreció una decaimiento del fierro total, cuando se analizó por el método de la digestión con ácido clorhídrico, lo que debería disolver el fierro precipitado, lo cual no ocurrió pues se observó un alto nivel de precipitado en el matraz que no pudo ser disuelto por el HCl. Por lo tanto, fue necesario determinar el fierro total teórico lixiviado a partir del cobre lixiviado, que es liberado en forma de ión ferroso. Con este dato fue posible determinar que el precipitado fue de aproximadamente 1000 mg/L, que corresponde al 40% del fierro total teórico lixiviado, tanto en la lixiviación química como la biológica. Esto último es coherente con la contaminación del experimento control.

La jarosita precipitada sobre la superficie del mineral interrumpiría la biolixiviación de calcopirita (Sasaki et al. (2009)). Cabe destacar, que se han reportado análisis a los residuos de la biolixiviación de calcopirita con *A. ferrooxidans* por difracción de rayos X detectándose que la composición correspondía a patrones de potasio jarosita, amonio jarosita y azufre elemental (Bevilaqua et al. (2002)) (Sasaki et al. (2009)). Sin embargo, no se puede afirmar que estos residuos sean los que se presentaron en este experimento de biolixiviación, ya que la composición de las jarositas depende de las condiciones experimentales (Sasaki et al. (2009)).

Cabe destacar, que al evaluar los parámetros fisicoquímicos y las concentraciones de fierro en solución del experimento control, se podría deducir que las bacterias se encontraban en una baja concentración al inicio del experimento, y dado que se contaba con las concentraciones de ión ferroso necesario para el crecimiento de la población bacteriana, fue posible el aumento del número de bacterias capaces de oxidar el ión ferroso y elevar el valor de Eh a 570 [mV vs Ag/AgCl].

4.3 BIOLIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA CON MICROORGANISMO *SULFOBACILLUS ACIDOPHILUS*

La disolución de calcopirita para los cultivos incubados a 45°C, mostrado en la Figura 9, presentan un comportamiento similar hasta las 336 horas, alcanzando para ambos experimentos un porcentaje de recuperación de cobre de un 10%. A partir de este tiempo, en el cultivo inoculado disminuye la velocidad de disolución de cobre de 0,169 a 0,0378 [mg·L⁻¹hr⁻¹] (Figura 10) alcanzando al final de la experiencia un porcentaje de recuperación de 11%, mientras que el experimento abiótico mantuvo su tasa de recuperación de cobre (0,1315 [mg·L⁻¹hr⁻¹], Figura 10) alcanzando un 13% de recuperación. Cabe destacar que en este experimento control no hubo indicios de contaminación dado que los valores de Eh mostrados en la Figura 18 se mantuvieron en torno a los 420 mV, mientras que el cultivo inoculado con *Sulfobacillus acidophilus*, alcanza los 630 [mV vs Ag/AgCl], manteniéndose en este último caso, la condición de máximo estado de oxidación del hierro durante el transcurso de la biolixiviación de calcopirita.

Por lo cual, una de las posibles razones de la mayor tasa de recuperación de cobre del experimento control sobre el cultivo con *S. acidophilus* es que la disolución de calcopirita se favorecería a bajo potencial electroquímico, lo que corresponde a una apropiada razón de Fe⁺³/Fe⁺² que se logra con una concentración de ferroso alta (Hiroyoshi et al. (2001)) (Xia et al. (2010)), lo cual es alcanzado por el experimento control (420 [mV vs Ag/AgCl]) no así por el cultivo con *S. acidophilus* (620 [mV vs Ag/AgCl]). Lo anterior demostraría que a potenciales bajos la lixiviación de calcopirita es favorecida, mediante el mecanismo descrito en las ecuaciones 13 y 14, mientras que a potenciales mayores la velocidad de recuperación de cobre es más lenta y es descrita por la oxidación férrica mostrada en la ecuación 5. Se podría inferir entonces, que el mecanismo de lixiviación podría depender del potencial redox del sistema.

Otra explicación para lo sucedido, podría deberse a la mayor formación de precipitados, que se puede evidenciar por el comportamiento del pH. En la Figura 19 se observa el aumento de pH de 1,6 a 1,76 en el cultivo inoculado, lo que se debería a la oxidación de ión ferroso a ión férrico por la capacidad hierro-oxidante de *S. acidophilus*. Sin embargo, la tendencia del pH cambia, comenzando el descenso hasta alcanzar un valor de 1,6 al final de la experiencia, lo que indicaría que a partir de las 200 horas, la generación de protones es mayor que su consumo. Esto podría deberse tanto a la capacidad azufre-oxidante de *S. acidophilus* (ecuación 10) como a la generación de precipitados que estarían pasivando el mineral (ecuación 18). En el experimento control, al igual que en el cultivo inoculado, el pH se ajustó a 1,6; por lo tanto, el aumento observado durante las primeras 168 horas se debe a la oxidación química del ión ferroso mediado por oxígeno disuelto y también a una posible oxidación de calcopirita. Sin embargo, el cultivo control cambia su tendencia a las 408 horas, lo que indica que el consumo de protones, es mayor que la generación lo que se debería a

una oxidación química de la calcopirita por acción del oxígeno disuelto o por el mecanismo del polisulfuro (ecuación 6, 11 respectivamente) y de la temperatura de operación utilizada de 45°C.

En la Figura 20, se muestra el comportamiento del hierro en solución y en ella se ve una tendencia clara de precipitación de hierro, que correspondería a jarositas (Ding et al. 2007), debido a esto no se observó aumento en el hierro total por disolución de calcopirita. En la Tabla 2 se muestra los valores de precipitado de hierro observándose que el cultivo con *S. acidophilus* es 1,7 veces mayor que el experimento control. Lo que se ve respaldado por lo reportado, en que el ión ferroso juega un papel importante en el proceso, mediante el equilibrio de la composición de la solución lixivante, y actuaría retrasando la precipitación de iones férrico como jarosita, la nucleación de la superficie del mineral y por último la pasivación del mineral (Córdova et al. (2008)). Con respecto al hierro en solución del experimento control (Figura 21) se aprecia un aumento del ión férrico en torno a las 500 ppm, que se podría explicar por el mecanismo de reacción a potenciales electroquímicos bajos (<450 mV) donde la calcopirita se reduce por acción del ión ferroso formando calcosina (Cu_2S) e ión férrico. Este último puede oxidar tanto a la Cu_2S como a la calcopirita, lo que explicaría su posterior disminución (Hiroyoshi et al. (2001)).

La acción hierro-oxidante de *S. acidophilus* logró una alta velocidad de oxidación del ión ferroso a ión férrico, lo que provocó el alto valor de Eh en la solución. Lo que permitiría inferir que en este caso la lixiviación de calcopirita ocurriría por el mecanismo indirecto. Sin embargo, este experimento alcanzó valores más bajos de recuperación de cobre que el experimento control, por esto se podría inferir que en ambos experimentos ocurrió oxidación química de la calcopirita, pero debido a que en el experimento inoculado las bacterias actuaron como núcleo de precipitación del ión férrico se generó finalmente una menor tasa de recuperación de cobre comparada con el experimento abiótico.

Por otra parte, Watling et al. (2008) reportaron que *S. acidophilus* es una especie particularmente sensible a cobre, tolerando concentraciones no mayores a los 300 [mg/L], sin embargo, dicha concentración es superada en el experimento a partir de las 336 horas (Figura 8), por lo que se podría suponer que la bacteria deja de cumplir su función catalítica. No obstante, en los experimentos realizados se ve observa que la cepa utilizada se encuentra activa al estar oxidando el ión ferroso a ión férrico, que se refleja tanto en el potencial electroquímico como en el comportamiento del hierro en solución. Por lo cual, para confirmar su tolerancia al cobre, se realizó la medición del Eh a diferentes concentraciones de cobre que se muestran en la Figura 11 y que permite inferir que esta cepa se encuentra activa incluso en concentraciones de 400 [mg/L] de cobre, al ser capaz de elevar el Eh sobre los 600 [mV vs Ag/AgCl].

Con respecto a recuperación de cobre para las distintas concentraciones de ión ferroso inicial se mostró un aumento similar en las primeras 192 horas alcanzando un

porcentaje de recuperación de un 9% para los tres casos estudiados; sin embargo, a partir de este punto se ve un incremento de la recuperación de cobre al aumentar la concentración de ión ferroso inicial desde 0, 1 y 2 [g/L] con porcentajes de recuperación de 11,7%; 12, 3% y 12, 8% respectivamente. Por lo cual se observa un efecto positivo el aumento de la concentración de ión ferroso inicial.

Por otra parte, la mayor velocidad de lixiviación que presentan los cultivos incubados a 45°C sobre los cultivos a 30°C, se debería principalmente a dos razones: la primera es la dependencia de Arrhenius en la velocidad de reacción con respecto a la temperatura y la segunda corresponde al mayor porcentaje de precipitación que presenta el cultivo incubado a 30°C sobre el cultivo a 45 °C, correspondiendo a un 40% del hierro total teórico versus un 37% respectivamente. Esto último se debería a que el pH del cultivo de *A. ferrooxidans* en las primeras 96 horas se eleva a 2,1 favoreciendo la formación de precipitación de hierro en forma de hidróxido de hierro o jarositas, mientras que en los experimentos incubados a 45 °C el pH permaneció bajo 1,75.

Con respecto al comportamiento de la extracción de azufre con los microorganismos estudiados, mostrado en la Figura 13, se aprecia un aumento durante las primeras 168 horas de operación, para luego disminuir hasta los 120 [mg] en el caso de *S. acidophilus* mientras que con *A. ferrooxidans* se ve un decaimiento hasta los 80 [mg]. Esta diferencia en el comportamiento podría tener dos posibles explicaciones: una de ellas se debería al hecho que el método utilizado para medir el azufre extraído corresponde al azufre en estado de sulfato y no a estados de oxidación intermedios como los sería S_8 , S_n^{-2} , que podrían formarse según el mecanismo de polisulfuro propuesto por Sand (2001). Otra explicación, tiene relación con la composición química de la capa de pasivación formada en la superficie del mineral como la jarosita, que contiene sulfato. Como se mencionó anteriormente el precipitado del cultivo mesófilo fue mayor que en el cultivo termófilo moderado por lo cual se explicaría el mayor descenso del azufre extraído que fue detectado. Por último, una explicación para que el azufre extraído no haya aumentado, sería la baja capacidad azufre-oxidante de las cepas estudiadas, produciéndose la acumulación del azufre en la superficie del mineral, lo que conllevaría a un capa pasivante que impediría la lixiviación del mineral.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS EN LA SOLUCIÓN LIXIVIANTE Y EN LA SUPERFICIE DEL MINERAL

El comportamiento de la población bacteriana en el cultivo inoculado con *A. ferrooxidans*, mostrado en la Figura 22, presenta un aumento en la solución lixivianante durante las primeras 246 horas, lo que se debería a la capacidad hierro-oxidante del microorganismo debido a las condiciones iniciales impuestas. Por otra parte, el aumento de las bacterias adheridas al mineral, según lo mostrado en la Figura 23, desde un valor

inicial cercano a cero a un valor de $1,2 \cdot 10^{12}$ en las primeras 96 horas de experimento demostraría la capacidad de adherencia que presenta esta cepa. Sin embargo, durante el transcurso de la experiencia se ve una disminución de esta, lo cual se debería a que las células quedan tapadas por la precipitación de fierro como hidróxido férrico o jarositas, lo que impedía la visualización del mineral en su totalidad por medio de la tinción con DAPI.

Por otra parte, en el caso del cultivo con *S. acidophilus* no se aprecia un crecimiento de la población bacteriana en la solución lixivante (Figura 24), a pesar de la capacidad fierro-oxidante de este microorganismo. Esto se refleja en el comportamiento del fierro en solución descrito anteriormente. Al igual que la cepa anterior, el recuento de la población adherida al mineral disminuyó en el tiempo (Figura 25).

Si bien los experimentos para determinar las bacterias adheridas al mineral durante el transcurso del proceso de biolixiviación no permitieron determinar el número exacto de bacterias, si permitió corroborar la existencia de este precipitado lo que es concordante con la coloración amarilla observada desde la primera muestra tomada a las 72 horas. Esta precipitación imposibilitaba la difusión de iones desde la solución lixivante al mineral y desde el mineral a la solución lixivante.

El análisis del modelo de núcleo sin reaccionar al proceso de biolixiviación de calcopirita tanto al cultivo inoculado con *A. ferrooxidans* como con *S. acidophilus*, mostrados en la Figura 26 y 27 respectivamente, dio como resultado que la etapa controlante es probablemente la difusión de los productos de la reacción o cenizas. El modelo que mejor se ajusta al caso del cultivo mesófilo, es el control difusional, sin embargo, no se puede concluir pues el valor del coeficiente de correlación no alcanza un valor alto de representatividad con solo un R^2 de 0,66 por sobre un R^2 de 0,5 para el caso de control por la reacción química. Por otra parte, para el caso del cultivo termófilo moderado probablemente también la etapa controlante corresponde al control difusional, pese a que no se alcanza un valor cercano a 1 en el coeficiente de correlación, pero que al repetir el proceso se obtuvo un valor de R^2 mayor a 0,9, lo que da indicios de que la etapa controlante probablemente correspondería a la difusión en la ceniza, cabe destacar que debido a que la representatividad del control por la reacción química es menor que 0,8 no se puede afirmar que el modelo correspondería a un control mixto de la reacción.

El tiempo requerido para la disolución total de la calcopirita es de 20.833 y 6.944 días para el cultivo inoculado con *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus* respectivamente. Por lo que se deduciría que la biolixiviación se ve favorecida por la inoculación de éste microorganismo termófilo moderado; sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la biolixiviación fue menos efectiva que la lixivación química, a pesar de que estos organismos se encontraban activos realizando su acción catalítica sobre el ión ferroso, producto de la alta precipitación de jarosita sobre el mineral impidiendo el intercambio de los reactivos lixivantes al mineral. Sin embargo, lo anterior permitiría concluir que la

alta temperatura de la biolixiviación es la causante de la mejoría en la recuperación de cobre desde calcopirita y no *S. acidophilus* al incrementar la temperatura desde los 30 hasta los 45 °C.

4.5 CONSIDERACIONES FINALES

La biolixiviación de calcopirita por microorganismos termófilos moderado presenta un rendimiento mayor por sobre los microorganismos mesófilos estudiados, en cuanto al tiempo de disolución total del mineral (τ) y al porcentaje de recuperación de cobre. El τ obtenido de la aplicación del modelo de núcleo sin reaccionar para las cepas estudiadas fue de 20.833 y 6.944 días para *A. ferrooxidans* y *S. acidophilus* respectivamente. Además, con ambas cepas la etapa controlante fue la difusión en las cenizas o productos de la reacción. Con respecto al porcentaje de recuperación de cobre, *A. ferrooxidans* alcanzó un porcentaje de 7,3%, lo cual es concordante con resultados obtenidos por Sasaki (2009), mientras que el porcentaje correspondiente a *S. acidophilus* fue de 11,3%. Estos valores se diferencian considerablemente de los obtenidos por Marhual (2008), quienes lograron obtener porcentajes de recuperación en el orden de 40 y 80% con un consorcio de microorganismos mesófilos y *con Sulfobacillus* respectivamente.

Por otra parte, el porcentaje de recuperación de cobre mediado por *S. acidophilus*, alcanzó una recuperación menor que el 13,3% obtenido en el experimento control que no fue inoculado con microorganismos. El aumento del valor de Eh sobre los 600 [mv vs Ag/AgCl] daría cuenta que dicha cepa pudo ejercer su capacidad ferroxidante, oxidando el ión ferroso disponible por las condiciones iniciales impuestas. Sin embargo, la alta precipitación de ión férrico como hidróxido férrico y/o jarositas desde las primeras horas monitoreadas, hasta alcanzar una concentración de 950 [mg/L] al final de la experiencia, estaría pasivando el mineral. Esto impediría el intercambio iónico entre la superficie del mineral y la solución lixiviante, no permitiendo la disolución de la calcopirita por acción de *S. acidophilus*. Además los valores de azufre obtenidos mostrarían que la capacidad azufre-oxidante estaría siendo atenuada, por lo que los polisulfuros y azufre elemental que serían generados según el mecanismo de polisulfuro (Sand, W. (2001)) no fueron oxidados por *S. acidophilus*, y se depositan sobre el mineral generando una posible capa de azufre elemental sobre la superficie de la calcopirita. El experimento control presenta una menor precipitación de hierro, del orden de las 570 [mg/L], por lo cual el mineral se encontraría más accesible para ser lixiviado.

Sin embargo, para verificar el efecto que generó la precipitación del ión férrico como hidróxido de férrico y/o jarositas, se realizó un experimento adicional en el laboratorio de biohidrometalurgia (resultados no mostrados en la presente memoria),

donde se ajustó el valor del pH durante todo el monitoreo con el fin de evitar la precipitación de hierro que pasive el mineral. Los resultados obtenidos mostraron una precipitación de hierro cercana a las 300 ppm. A pesar del bajo nivel de precipitación, el porcentaje de cobre obtenido fue de un 12%, porcentaje similar al obtenido en el experimento donde solo se ajustó el pH inicial. Esto daría cuenta que el efecto pasivante no fue un factor tan relevante en la capacidad oxidativa de *S. acidophilus* sobre la calcopirita.

Estos resultados también se pueden explicar por el mecanismo de reacción propuesto por Hiroyoshi et al. (2000), que sugirió que la disolución de calcopirita consta de dos pasos. En el primer paso, la calcopirita se reduce por iones ferrosos y cobre para formar calcocita (Cu_2S) (ecuación 13), y el segundo paso, la calcocita es oxidada por el oxígeno disuelto y/o por iones férricos para liberar cobre (ecuación 14). Cabe destacar que la suma de ambas ecuaciones da como resultado la ecuación de lixiviación de calcopirita por acción de ión férrico (ecuación 5). En este mecanismo el ión cúprico es un catalizador de la reacción por lo que su aparición promovería mayores tasas de disolución de calcopirita.

La disolución de calcopirita por este mecanismo de reacción podría verse favorecida a valores de Eh debajo de un valor crítico (<450 mV), es decir, a una apropiada tasa de $[\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}]$ (Hiroyoshi et al., 2001). Sin embargo, el sólo supuesto de un valor de Eh por debajo del valor crítico no implica un mayor rendimiento de la lixiviación, además se requiere de cantidades suficientes de ión ferroso y la disponibilidad de ión férrico. El ión ferroso reduce la calcopirita a productos intermedios que son más fáciles de oxidar que la calcopirita (Hiroyoshi et al., 2001) (Vilcáez et al. 2009) (Xia et al., 2010). Mientras que en ausencia de ión férrico para oxidar los compuestos intermedios, no es posible la liberación de cobre.

El mecanismo de reacción de dos pasos propuesto por Hiroyoshi et al. (2000) y que aumentaría la eficiencia de recuperación de cobre, es válido sólo cuando el potencial redox es lo suficientemente bajo para la formación de calcocita y lo suficientemente alto para su posterior oxidación. Sin embargo, en el experimento con *S. acidophilus* realizado se alcanzó un Eh de 600 [mV vs Ag/AgCl], que corresponde a una alta concentración de ión férrico que oxidaría a la calcopirita (ecuación 5), y una baja concentración de ión ferroso por lo que el modelo propuesto no se llevaría a cabo. Por otra parte, el experimento control a 45 °C alcanzó un potencial electroquímico de 430 [mV] y una concentración de ión férrico de 500 [mg/L] lo que permitiría la lixiviación química según el mecanismo de dos pasos propuesto por Hiroyoshi et al. (2000). Cabe destacar que el Eh corresponde a un parámetro fisicoquímico de difícil control en operaciones industriales.

Con respecto a la tolerancia a concentraciones de cobre menor a los 300 [mg/L] en el caso de *S. acidophilus* (Watling et al. 2008), este valor es superado a las 240 horas de operación, por lo que se podría inferir que el cobre inhibiría la acción catalítica

de este microorganismo, sin embargo, esto no ocurrió pues durante todo el experimento la bacteria oxidó el ión ferroso a ión férrico, lo que se puede ver tanto en el potencial electroquímico alcanzado como en las concentraciones de hierro en solución. Además se comprobó que esta cepa se encontraría activa incluso a concentraciones de 400 [mg/L] de cobre.

Cabe destacar que las cepas estudiadas presentaron una alta capacidad de adherencia (85% aproximadamente), lo que indicaría que la biolixiviación podría ocurrir tanto por el mecanismo por contacto como por el mecanismo indirecto. Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos de la cuantificación de las bacterias adheridas al mineral por el método de tinción con DAPI, se aprecia claramente una tendencia decreciente de la población bacteriana, la cual se debería al impedimento de los microorganismos a actuar sobre los sulfuros, debido a la generación de hidróxido férrico y/o jarosita que se depositó sobre el mineral.

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES

La cinética de biolixiviación de calcopirita por acción de *Sulfobacillus acidophilus*, microorganismo clasificado como termófilo moderado, descrito en este trabajo, se encuentra controlada por la difusión de los productos de la reacción o ceniza, obteniéndose un porcentaje de recuperación de cobre de un 11,3% y requiriendo de 6.944 días para la disolución total del sólido disponible.

Por otra parte, la cinética de biolixiviación del mineral estudiado por acción de microorganismos mesófilos, particularmente *Acidithiobacillus ferrooxidans*, descrito en este trabajo, también se encuentra controlada por la resistencia difusional de los productos de la reacción o ceniza y presentó un menor porcentaje de recuperación de cobre y un mayor tiempo de disolución total del mineral disponible, con un valor de 7,6% y 20.833 días respectivamente.

A pesar de que en la biolixiviación con microorganismos termófilo moderado obtuvo un rendimiento superior de disolución de cobre que el cultivo mesófilo, se concluye que la cepa *S. acidophilus* no ejerció su acción catalítica sobre la calcopirita, esto debido a que el porcentaje de recuperación de cobre obtenido en el experimento control (13,3%) fue mayor al obtenido con el cultivo inoculado (11,25%).

Una de las explicaciones que afectó la acción de *S. acidophilus* sobre la calcopirita sería la alta precipitación del ión férrico como jarositas sobre el mineral, lo que impide el intercambio iónico entre la solución lixivante y el mineral. Esta precipitación se hizo evidente tanto en las mediciones de fierro, observándose que el precipitando de hidróxido férrico fue 1,7 veces más que el experimento control, como al observar el mineral a través del microscopio en las tinciones con DAPI. Con esta última técnica, se observó una tendencia decreciente en la población bacteriana, tanto en la solución lixivante como en la superficie del mineral, llegando a ser imposible el conteo de bacterias sobre la calcopirita en las horas finales del experimento.

Estos resultados darían cuenta que los experimentos con *S. acidophilus* corresponderían a una lixiviación química y el aumento de éste rendimiento se atribuye al aumento de la temperatura de 30 a 45°C, lo que aceleraría la reacción química.

CAPÍTULO 6 BIBLIOGRAFÍA

Bevilaqua, D., Leite, A.L.L.C., Garcia, O., Tuovinen, O.H., (2002), «Oxidation of chalcopryrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks.» *Process Biochemistry* 38: 587-592.

Cancho, L., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., Muñoz, J.A., (2007), «Bioleaching of a chalcopryrite concentrate with moderate thermophilic microorganisms in a continuous reactor system.» *Hydrometallurgy* 87: 100-111.

Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., (2008), «Leaching of chalcopryrite with ferric ion. Part I: General aspects.» *Hydrometallurgy* 93: 81-87.

Ding, J., Gao, J., Wu, X., Zhang, C., Wang, D., Qiu, G., (2007), «Jarosite-type precipitates mediated by YN22, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, and their influences on strain.» *Transactions Nonferrous Metals Society of China* 17: 1038-1044.

He, H., Xia, J., Yang, Y., Jiang, H., Xia, C., Zheng, L., Ma, C., Zhao, Y., Qiu, G., (2009), «Sulfur speciation on the surface of chalcopryrite leached by *Acidianus manzaensis*.» *Hydrometallurgy*, nº 99: 45-50.

Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., (2000), «A model for ferrous-promoted chalcopryrite leaching.» *Hydrometallurgy* 57: 31-38.

Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., (2001), «Enhancement of chalcopryrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions.» *Hydrometallurgy* 60: 185-197.

Levenspiel, O. *Ingeniería de las reacciones químicas*. México: Reverté Ediciones S.A, 1993.

Marhual, N.P., Pradhan, N., Kar, R.N., Sukla, L.B., Mishra, B.K., (2008), «Differential bioleaching of copper by mesophilic and moderately thermophilic acidophilic consortium enriched from same copper mine water sample.» *Bioresource Technology* 99: 8331-8336.

Mora, A., (2010), «*Estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas en procesos de biolixiviación mediante CARD-FISH*», Memoria de Ingeniería Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.

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

Olson, G.J., Clark, T. R., (2004), «Fundamentals of metal sulfide biooxidation.» *Mining Engineering* 56: 40-46.

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

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

Sasaki, K., Nakamuta, Y., Hirajima, T., Tuovinen, O.H., (2009), «Raman characterization of secondary minerals formed during chalcopyrite leaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans*.» *Hydrometallurgy* 95: 153-158.

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

Valdez, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J., Holmes, D., (2008), «*Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications.» *BMC Genomics* 9: 1471-2164.

Vilcáez, J., Yamada, R., Inoue, C., (2009), «Effect of pH reduction and ferric ion addition on the leaching of chalcopyrite at thermophilic temperatures. » *Hidrometallurgy* 96: 62-71.

Watling, H. R., Perrot, F.A., Shiers, D.W., (2008), «Comparison of selected characteristics of *Sulfobacillus* species and review of their occurrence in acidic and bioleaching environments.» *Hidrometallurgy* 93: 57-63.

Xia, J., Yang, Y., He, H., Liang, C., Zhao, X., Zheng, L., Ma, C., Zhao, Y., Nie, Z., Qiu, G., (2010), «Investigation of the sulfur speciation during chalcopyrite leaching by moderate thermophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*.» *International Journal of Mineral Processing* 94: 52-57.

Zhou, H., Zeng, W., Yang, Z., Xie, Y., Qiu, G., (2009), «Bioleaching of chalcopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor.» *Bioresource Technology* 100: 515-520.