



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"BIOLIXIVIACIÓN DE UN CONCENTRADO MINERAL CONSTITUIDO
BÁSICAMENTE DE CALCOPIRITA A 35 °C"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
INGENIERO QUÍMICO METALÚRGICO
P R E S E N T A :
VENTURA | BECERRIL REYES



México, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado Asignado

Presidente: Dra. ROSA ELVA RIVERA SANTILLÁN.

Vocal: Dr. JOSÉ LUZ GONZÁLEZ CHÁVEZ.

Secretario: M. en C. MARÍA ISABEL GRACIA MORA.

1er. Suplente: M. en C. ANTONIO HUERTA CERDÁN.

2do. Suplente: M. en C. MARCO ANTONIO TALAVERA ROSALES.

Sitio donde se desarrolló el tema:

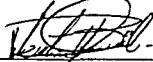
Universidad Nacional Autónoma de México.
Facultad de Química:
Departamento de Ingeniería Metalúrgica.
Laboratorio de Metalurgia Extractiva. Edificio D.



Asesor: Dra. Rosa Elva Rivera Santillán.



Supervisor técnico: M. en C. Alfonso López Juárez.



Sustentante: Ventura Becerril Reyes.

Dedicatorias.

A Ixhel Alicia Alvarado Jiménez. Porque gracias a tu apoyo incondicional , a tu amor que sin dudar me has entregado y por todo el sacrificio que has realizado he logrado hoy culminar esta etapa tan importante de mi vida, que sin tu apoyo hubiera sido imposible realizar. quiero expresarte mi mas profundo agradecimiento. por estar conmigo y por ser para mí la mejor compañera.

Te Amo.

A mi hijo, porque su presencia ha sido y será siempre el motivo más grande que me ha impulsado a lograr culminar esta meta.

A mis padres ,hoy es un gran día. hoy termina una larga jornada de sacrificios y desvelos, hoy quiero que sepan que mi principal motivación a lo largo de todo este tiempo han sido ustedes que confiaron en mí y me alentaron a seguir adelante, muchas gracias por su apoyo y por ser unos padres maravillosos.

A mis hermanos. quiero expresarles un profundo agradecimiento ya que con su ayuda apoyo y comprensión me alentaron a lograr alcanzar esta meta.

Al señor Félix Atta Jiménez, por ser mi amigo y por los buenos consejos que sin esperar nada a cambio me ha dado, aparte de brindarme su apoyo incondicional en algunos momentos difíciles de mi vida, gracias Félix.

Agradecimientos

A la Dra. **Rosa Elva Rivera Santillán**. Por su valiosa y acertada dirección en el desarrollo de este proyecto y por todo el apoyo recibido durante la realización del mismo.

Al Dr. **José Luz González Chávez** Por su amable colaboración en la corrección y revisión de este trabajo.

A la Dra. **Isabel Gracia mora**. Por el tiempo dedicado a la revisión y corrección de este trabajo.

Al M en C. **Alfonso López Juárez**. Por sus valiosos comentarios y aportaciones a este proyecto de tesis.

Esperando no omitir a alguna persona:

A todos mis compañeros de la carrera , Verónica Martínez, Luis Soto, Juan Luis Alcántara, Vicente Álvarez. Arturo Chong, Luis Darío Escobar, Ariane Hidalgo, Lizbeth Pérez, Carlos Suárez, Carlos Alberto Cortés, Baudelio Ramírez, Jorge Téllez, Lázaro, Carlos Rodríguez, Héctor Vergara, Eric, claudia, Israel, por su amistad y apoyo incondicional.

A mis compañeros y amigos del grupo de Metalurgia Extractiva especialmente a mis compañeros del grupo de investigación en **Biohidrometalurgia**, Maria Dolores Gerónimo Santiago, Yazmin Contla. José Luis Alarcón, Israel Gómez, Olga y Tonahuac, por los momentos que compartimos en nuestro lugar de trabajo.

A mis compañeros de generación , Darío Bazan, Sergio Villa, Jorge Bretón, Rosa linda Cano, Karina Rojas. Adriana Cruz, Juana, Roberto, sin olvidar a mi entrañable amigo Mario López Bello (Q.E.P.D) por todos los momentos de alegría y sufrimiento que compartimos, gracias por ser grandes amigos.

A lo buenos amigos y a la vez vecinos del laboratorio de corrosión, Celia , Carmen, Fernanda, José Trinidad, Sandra .Cholula, José Luis Villalobos, Carlos. sin olvidar al Dr. Francisco y al Prof. Carlitos. por su amistad incondicional.

A mi gran amigo y compañero de toda la carrera Edgar Onofre Bustamante, gracias por todo compadre.

ÍNDICE GENERAL

Prefacio.....	i
Objetivos.....	ii
Resumen.....	iii
1. Generalidades.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Bacterias.....	3
1.2.1 Terminología.....	5
1.2.2 Clasificación.....	6
1.2.3 Estructura.....	8
1.2.4 Reproducción y crecimiento.....	9
1.3 Oxidación de minerales.....	10
1.4 Mecanismos de actuación de microorganismos.....	13
1.4.1 Mecanismo directo (<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>).....	15
1.4.2 Organismos Termófilos (<i>Sulfolobus...</i>) y otros (<i>Pseudomonas</i>).....	15
1.4.3 Mecanismo indirecto (<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>).....	16
1.5 Microorganismos útiles en biolixiviación.....	17
1.5.1 <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	17
1.5.2 <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	20
1.5.3 Organismos termófilos (<i>sulfolobus...</i>) y otros.....	20
1.6 Aplicaciones.....	21
1.6.1 Reseña histórica.....	21
1.6.2 Biolixiviación de menas de cobre.....	22
1.6.3 Biolixiviación de minerales refractarios que contienen metales preciosos.....	27
1.6.4 Biolixiviación de menas de uranio.....	29
1.6.5 Biodesulfuración de carbones.....	30
1.6.5.1 Biolixiviación de azufre pírítico.....	31
1.6.5.2 Biolixiviación de azufre orgánico.....	32
1.7 Ventajas y desventajas de la biolixiviación.....	33
1.8 Perspectivas.....	35
2. Desarrollo experimental.....	37
2.1 Reactivos, material y equipos.....	37
2.2 Mineral.....	38
2.3 Caracterización de la muestra.....	38
2.4 Selección de cepas.....	38
2.5 Selección del medio de cultivo.....	39
2.6 Preparación y reactivación de cultivos.....	40
2.7 Seguimiento y control de parámetros.....	41
2.7.1 Medición y control del pH.....	41
2.7.2 Medición y seguimiento del potencial de óxido-reducción.....	41

2.7.3 Determinación de la concentración del ion ferroso en la solución.....	42
2.7.4 Inspección visual de la apariencia de los cultivos.....	42
2.8 Estudios de biolixiviación del mineral en incubadora.....	42
2.9 Estudio de biolixiviación del mineral en reactor con agitación mecánica con la cepa Noche buena.....	45
3. Resultados y discusión.....	46
3.1 Caracterización de la muestra.....	46
3.1.1 Caracterización química.....	46
3.1.2 Estudio de fluorescencia de rayos X (FRX) y de difracción de rayos X (DRX).....	46
3.1.3 Caracterización mineragráfica.....	47
3.2 Reactivación de cepas.....	49
3.2.1 Comportamiento del potencial de óxido-reducción (ORP).....	50
3.2.2 Comportamiento de la concentración de los iones Fe (II).....	52
3.2.3 Comportamiento del pH.....	52
3.2.4 Cepa Nochebuena.....	57
3.3 Estudios de biolixiviación del mineral en incubadora.....	60
3.3.1 Potencial de óxido-reducción (ORP).....	60
3.3.2 Comportamiento del pH.....	62
3.3.3 Crecimiento celular.....	63
3.3.4 Extracción de Cu.....	64
3.3.5 Disolución de Fe.....	65
3.3.6 Concentración de Fe (II).....	66
3.3.7 Biolixiviación del mineral con la cepa Nochebuena.....	67
3.3.7.1 pH.....	67
3.3.7.2 Crecimiento celular.....	67
3.3.7.3 Potencial de óxido-reducción (ORP) y extracción de Cu.....	69
3.3.7.4 Disolución de Fe y concentración de Fe total, Fe (II) y Fe (III).....	70
3.3.7.5 Sistemas estériles.....	71
3.3.7.6 Etapas de disolución de cobre.....	73
3.4 Estudio de biolixiviación del mineral en reactor con agitación mecánica con la cepa Nochebuena.....	76
3.4.1 pH.....	77
3.4.2 Crecimiento celular.....	77
3.4.3 Evolución del potencial de óxido-reducción (ORP) y de la extracción de cobre.....	78
3.4.4 Concentraciones de Fe(T), Fe (II) y Fe (III).....	78
3.4.5 Efecto de la agitación mecánica en el desarrollo de la población de bacterias.....	79
4. Conclusiones.....	81
5. Bibliografía.....	83

Prefacio.

Durante los últimos años, la industria de la extracción de metales está sufriendo una aguda crisis cuyo origen inmediato son los crecientes costos del proceso, los precios de los metales cada vez más bajos, los problemas de contaminación atmosférica, los minerales cada vez más pobres, los problemas energéticos y el agotamiento de reservas. Ante esta difícil situación, la biolixiviación se presenta en algunos casos concretos, como una alternativa a los procesos hidrometalúrgicos clásicos.

La importancia del cobre en la economía actual, así como el progresivo avance tecnológico de la industria minera, ha hecho posible la explotación de menas de cobre con leyes cada vez menores. Así a principios del siglo XX, la ley más baja con interés económico era de 2-2.5 % Cu, en 1935 de 1.5 % Cu y durante el decenio de los setentas y en la actualidad se han llegado a explotar leyes tan bajas como 0.3 % Cu. Esto ha sido posible como resultado de la mejora de las técnicas mineras, los métodos de concentración y las técnicas hidrometalúrgicas. Dentro de las últimas merece especial atención la etapa de lixiviación, dado que es en la que el elemento de interés de una mena se disuelve de la forma más selectiva y económica⁽¹⁾.

Actualmente la calcopirita se procesa pirometalúrgicamente ya que ésta es recalcitrante a la lixiviación química en un medio ácido, sin embargo la presencia de microorganismos acelera notablemente este proceso.

Si bien existen varias bacterias capaces de intervenir en la lixiviación de menas de cobre, la principal en condiciones de temperatura ambiente es *Thiobacillus ferrooxidans*. Esta es una bacteria acidófila, caracterizada por su capacidad para oxidar el ion ferroso a férrico y los compuestos reducidos de azufre, de donde obtiene la energía necesaria para realizar su actividad metabólica.

El presente trabajo es un estudio de lixiviación de un concentrado de sulfuros de cobre, con la particularidad de que en ella se hacen intervenir elementos biológicos (bacterias), por lo que utilizaremos el término ampliamente difundido **biolixiviación**.

Objetivo general:

Lograr la biolixiviación de un concentrado mineral constituido básicamente de Calcopirita con bacterias mesófilas (principalmente *Thiobacillus ferrooxidans*) a una temperatura de 35 °C.

Objetivos particulares:

1.- Reactivar cultivos de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* obtenidos a partir de las aguas de mina de los siguientes complejos mineros: Cananca, Nochebuena, Candameña y Tayahua.

2.- Optimizar el monitoreo de parámetros durante la obtención de cepas.

3.- Obtener una cepa autóctona del mineral.

4.- Adaptar las bacterias reactivadas y autóctonas a la muestra mineral.

5.- Realizar estudios de biolixiviación del mineral en reactor en incubador orbital en presencia de las diferentes cepas.

6.- Realizar estudios de biolixiviación en reactor agitado mecánicamente con la cepa que haya mostrado la mejor extracción de cobre, con vistas a una posible aplicación industrial

Resumen.

El uso de la hidrometalurgia en la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley ha tenido gran importancia en las últimas décadas.

Los procesos hidrometalúrgicos se basan fundamentalmente en la solubilización de metales o minerales y en la recuperación posterior de los elementos deseados a partir de esta solución por métodos adecuados. Si la actividad de microorganismos está involucrada en la solubilización, la técnica se conoce como Biolixiviación. Biohidrometalurgia, Lixiviación microbiana, Lixiviación bacteriológica, Oxidación bacteriana y recientemente designada también como Biotecnología de minerales.

La biolixiviación es, por definición, un proceso de oxidación bioquímica catalizado por organismos vivos, en el cual un mineral insoluble es oxidado a una forma soluble. La biolixiviación como medio para extraer metales de yacimientos sulfurados se ha utilizado desde hace miles de años.

En el presente trabajo se estudia la cinética de biolixiviación de un concentrado de flotación de sulfuros de cobre, utilizando bacterias del género *Thiobacillus ferrooxidans* a una temperatura de trabajo de 35 °C.

La primera parte del trabajo consistió en la reactivación de cultivos de 4 diferentes cepas así como la selección del medio de cultivo adecuado para obtener sólo bacterias *Thiobacillus ferrooxidans*, cuidando y controlando los parámetros de interés para lograr una optimización de éstos para las siguientes etapas del trabajo.

En la segunda parte del trabajo se llevó a cabo la adaptación de las bacterias al concentrado de flotación, nuevamente controlando y cuidando los parámetros correspondientes para optimizar el proceso, y finalmente se realizaron estudios de biolixiviación del mineral en reactor en incubador orbital y en reactor mecánicamente agitado.

En el capítulo 1 se resume la situación actual de la biolixiviación, se describen los principales microorganismos utilizados y los mecanismos, tanto directos como indirectos, a través de los cuales se producen las reacciones. Entre estos microorganismos destacan los del género *Thiobacillus*. Después de mencionar algunas ventajas y desventajas de estos procesos se revisan sus aplicaciones industriales más importantes.

En el capítulo 2 se describe la metodología usada para desarrollar el presente trabajo, en el capítulo 3 se describen y discuten los resultados obtenidos, en el capítulo 4 se enumeran las conclusiones del trabajo y, finalmente en el capítulo 5 se enlista la bibliografía consultada.

CAPÍTULO I

I Generalidades.

I.1 Introducción.

Durante los últimos años, la industria minera se ha tenido que enfrentar con problemas cada vez más importantes. Algunos de ellos se concretan en costos de minería y de proceso extractivo que continuamente se han ido incrementando, precios de los metales muy inestables y bajos en los mercados internacionales, y una preocupación social creciente en relación con la contaminación producida por las plantas de tratamiento de materias primas, sobre todo sulfuros y carbones con demasiado azufre. Esta situación empeora al considerar otros factores, como la ley cada vez más baja de las menas minerales, el aumento de los costos de amortización, de la energía y el agotamiento de las reservas. La industria está haciendo importantes esfuerzos para reducir costos y recuperar la rentabilidad, así como para cumplir con las cada vez más estrictas limitaciones en cuanto a emisiones gaseosas a la atmósfera. El desarrollo de métodos que utilicen microorganismos podría ser uno de los factores que pudiesen ayudar a modificar la situación actual de la Metalurgia Extractiva⁽²⁻⁹⁾. De forma general, la Biotecnología está recibiendo, tanto a nivel social como de los gobiernos e investigadores, una atención especial. Es cierto también, que estos esfuerzos se han desarrollado sobre todo en los campos farmacéutico y alimentario, de la Química orgánica y de las enzimas, sin prestar especial atención al campo de los metales. Sin embargo la mayoría de los elementos de la tabla periódica y, por supuesto los metales, son transformados *microbiológicamente* de manera que estos procesos pueden ser aplicables a escala biotecnológica. La tabla I⁽²⁾ resume la participación de los elementos en reacciones que se producen en la interfase biotecnología/materiales, es decir, en procesos de biogénesis, biolixiviación, biocorrosión y bioacumulación, y todo ello a través de oxidaciones, reducciones, alquilaciones, solubilizaciones, precipitaciones, etc.

Tabla 1. Participación de los elementos en reacciones que se producen en la interfase biotecnología/materiales, es decir en procesos de biogénesis, biolixiviación, biocorrosión y bioacumulación.

El potencial biotecnológico de las transformaciones de metales por microorganismos, todavía no ha sido promocionado y apoyado de una forma tan clara como las otras partes de esta moderna ciencia multidisciplinaria. Esto puede deberse a dos razones. Una está en relación con el número relativamente reducido de investigadores dedicados a estos temas y la otra con el hecho de que el conocimiento de los mecanismos de todos estos procesos es incompleto y elemental. Además se trata de sistemas muy heterogéneos, con diseño, ingeniería y control difíciles. A pesar de estas dificultades, la biotecnología aplicada a la obtención de los metales está siendo utilizada para la extracción de cobre, uranio y cobalto y se están haciendo esfuerzos importantes para conseguir su implantación a escala industrial en el tratamiento de otros minerales. En cualquier caso, los nuevos desarrollos deben pasar siempre por un esfuerzo conjunto entre metalurgistas y microbiólogos, con el fin de conseguir sistemas biológicos más eficientes y velocidades y

costos de proceso competitivos con los métodos extractivos actualmente implantados. Este último factor será, obviamente, el que en definitiva indicará la posibilidad de utilización futura de estos nuevos procesos, bien como un fin en sí mismos o bien insertados en diagramas de flujo más o menos complejos^(9, 11-13).

1.2 Bacterias.

Las bacterias junto con las cianobacterias (algas verde azuladas), son protistos unicelulares inferiores conocidos como procariontes. Las células procariontas no tienen un núcleo verdadero, sino que el ADN de la bacteria está presente como una molécula simple en el interior de la célula.

Cuando en 1676, Antonie Van Leeuwenhoek describió por primera vez lo que se interpretó como una bacteria en una infusión de granos de pimienta examinada con un ingenioso y sencillísimo microscopio, poco sospechó o poco sospecharon aquellos a los que reveló su descubrimiento, que otras diminutas criaturas, distintas de las que él observó eran capaces de extraer metales de menas minerales.

De hecho las bacterias no fueron reconocidas como grupo único de organismos hasta que en 1875 Ferdinand Cohn las clasificó como plantas y finalmente, en la década de los sesentas se les asignó un grupo especial de organismos, distintos del de las plantas y del de los animales, los *procariontas*, basándose en su organización unicelular. Sin embargo, no fue hasta 1977 cuando Carl Woese estableció que las *bacterias procariontas* podían dividirse en dos grupos, las *eubacterias* y las *arqueobacterias*. Ambas contienen miembros de especial importancia en *biohidrometalurgia*⁽¹⁰⁾.

Una característica que define a la mayoría de los microorganismos que intervienen en las transformaciones de metales es su alta resistencia para evolucionar en ambientes

extremos con condiciones de vida muy agresivas. Estos ambientes pueden diferenciarse entre sí en función de su temperatura, nutrientes o pH. pero sin embargo, un hecho común en todos ellos es su alto contenido en metales pesados y en compuestos de estos metales.

El área más importante dentro del procesado biotecnológico de metales es la oxidación de sulfuros metálicos por medio de microorganismos. Estos viven asociados normalmente a ambientes acuosos característicos de las explotaciones mineras, con un bajo pH, altas concentraciones de metales pesados y en algunos casos elevadas temperaturas, lo cual resulta sorprendente, pues en estas circunstancias viven y se reproducen con extraordinaria facilidad. La energía necesaria para la actividad vital de estos organismos la suelen obtener de la oxidación de las distintas formas reducidas del azufre y de diferentes metales. El resultado es que como consecuencia de esta actividad metabólica, se solubilizan distintos metales contenidos en los sólidos de la mina.

En la tabla 2 se reseñan algunos de los microorganismos asociados con los fenómenos que estamos comentando, así como sus características metabólicas⁽³⁾.

Entre todos los microorganismos que intervienen en fenómenos de biolixiviación, las bacterias del género *Thiobacillus* son las más conocidas y utilizadas. Son capaces de oxidar las especies reducidas del azufre y prácticamente aparecen en todas las aguas de mina en donde se benefician o aparecen compuestos sulfurados.

Organismos	Fuente de energía	Temperatura de crecimiento	Fuente primaria de crecimiento
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Fe ²⁺ , U ⁴⁺	20-40 °C (Mesófilo)	CO ₂
<i>Lepstopirillum ferrooxidans</i>	Fe ²⁺	20-40 °C (Mesófilo)	CO ₂
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S ⁰	20-40 °C (Mesófilo)	CO ₂
Género <i>Sulfolobus</i>	S ⁰ , Fe ²⁺	45-50 °C (Termófilas moderadas)	CO ₂ , C org.
<i>Acidophilium crytum</i>	C org.	20-40 °C (Mesófilo)	C org.
<i>Bacterias similares a Thiobacillus</i>	Fe ²⁺ , C org.	45-50 °C (Termófilas moderadas)	CO ₂ , C org.

Tabla 2. Algunas bacterias *acidófilas* que crecen en los ambientes de lixiviación de menas minerales.

1.2.1 Terminología.

Para comprender por completo el fenómeno de la oxidación bacteriana es necesario familiarizarse con términos tales como *quimiolitóautótrofos* obligados y autótrofos facultativos, en combinación con el sistema que clasifica a las bacterias en: *mesófilas*, *termófilas moderadas* y *termófilas extremas*. Sin embargo, para fines más prácticos es suficiente conocer que algunos organismos obtienen su energía mediante la oxidación de materiales inorgánicos tales como minerales (los *quimiolitótrofos*) y algunos utilizan el bióxido de carbono del aire como única fuente de carbono (los autótrofos). En efecto, algunos organismos, los *quimiolitóautótrofos*, solamente pueden vivir de este modo (están obligados a hacerlo así). Por otra parte, las bacterias heterotróficas utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Hay otras bacterias que aunque pueden obtener su carbono por metabolización de compuestos orgánicos, tienen la facultad de ser autotróficas en determinadas condiciones (autótrofas facultativas) ⁽¹⁴⁾.

1.2.2 Clasificación.

Existen diferentes clasificaciones para las bacterias. una de ellas las define como⁽¹⁵⁾:

Autotróficos: Son aquellos microorganismos que obtienen por sí mismos sus requerimientos de energía y ciclo reproductivo a partir de materiales inorgánicos.

Heterotróficos: Son aquellos microorganismos que requieren de la presencia de materia orgánica para completar su ciclo de vida.

Los microorganismos pueden clasificarse también como:

Aeróbicos:

Microorganismos que necesitan oxígeno y llevan a cabo reacciones de oxidación.

Anaeróbicos:

Microorganismos que obtienen su oxígeno por la reducción de compuestos que los contienen, tales como sulfatos.

De acuerdo con su forma las bacterias se pueden ordenar en tres clases:

Cocos : Microorganismos que tienen formas esféricas.

Bacilos: Microorganismos que tienen forma de bastón recto.

Espirillas: microorganismos que tienen forma de bastones curvos o espirales.

Los cocos pueden presentarse aislados, en grupos de dos, en racimos o en cadenas largas y los espirales pueden tener pocas o muchas espiras.

Hay especies de bacterias que se desarrollan mejor en determinados intervalos característicos de temperatura. Algunas, *criófilas*, en frío (menos de 20 °C). Las *mesófilas*, en caliente (20-40 °C); otras, las *termófilas moderadas*, en un medio más caliente (40-55 °C) y algunas, las *termófilas extremas*, necesitan un ambiente muy caliente (más de 55 °C). Ninguna de las bacterias *criófilas* participan en la oxidación de minerales⁽¹⁵⁾.

Los microorganismos importantes en biohidrometalurgia pueden clasificarse en cuatro grupos:

- 1.- *Mesófilos* de los géneros *Thiobacillus* y *Leptospirillum*.
- 2.- *Termófilos moderados* del género *Sulfobacillus*.
- 3.- *Termófilos extremos* de los géneros *Sulfolobus*, *Acidanus*, *Metallosphaera* y *Sulfurococcus*.
- 4.- *Microorganismos heterotróficos*.

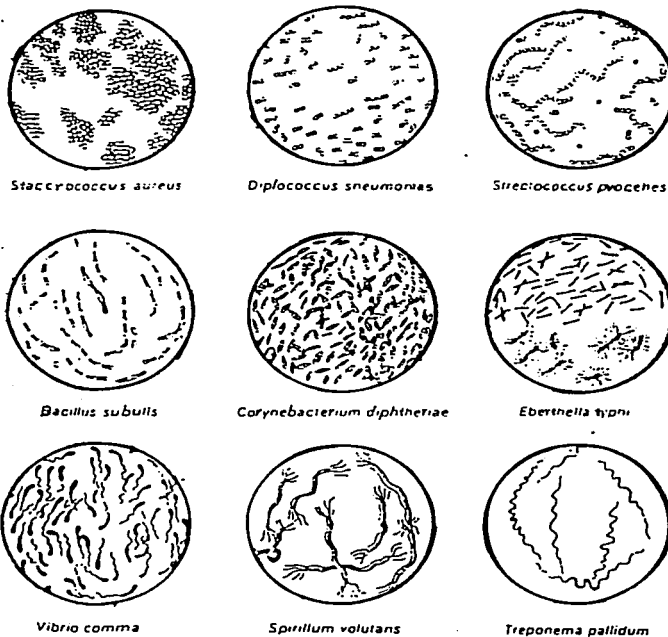


Figura 1. Algunas bacterias representativas. *Arriba*: Formas esféricas. *Centro*: Formas en bastones. *Abajo*: Formas espirales.

1.2.3 Estructura.

La célula bacteriana posee membrana celular y está cubierta por una pared rígida que contiene ácido diaminopimélico (sólo se encuentra en bacterias y algas verdeazules) y un derivado de la glucosa, el ácido murámico. Casi todas las bacterias están cubiertas fuera de la pared celular de una cápsula viscosa formada por polisacáridos, la cual representa una capa protectora adicional.

El citoplasma contiene gránulos de glucógeno, proteínas y grasas, carece de mitocondria y retículo endoplasmático. Los ribosomas se encuentran libres en el citoplasma (no están unidos a las membranas). Existe ADN en una región determinada del núcleo pero no existe membrana nuclear, los cocos tienen un núcleo por célula, los bacilos dos o más. Muchas bacterias se desplazan por prolongaciones celulares en forma de látigos llamadas flagelos, formados de una sola fibrilla. La mayor parte de espirales y bacilos tienen flagelos que suelen faltar en los cocos.

Las bacterias sólo se mueven en los líquidos (2000 veces su longitud en una hora), aunque pueden recorrer grandes distancias en el aire fijándose a las partículas de polvo o a las gotas de agua. Su tamaño varía de 0.5 a 2.0 micras.

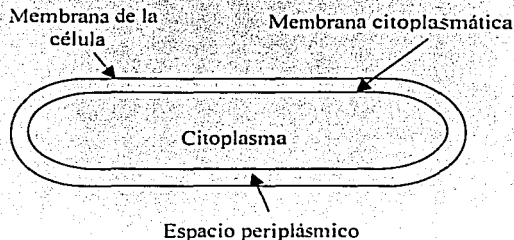


Figura 2. Estructura de una célula bacteriana.

1.2.4 Reproducción y crecimiento.

Su reproducción se lleva a cabo por fisión binaria a una velocidad máxima promedio de 20 minutos, a esta velocidad si no hubiera factores adversos, una sola bacteria daría origen a 250,000 en seis horas. Sin embargo, éstas no pueden seguir este ritmo de reproducción durante mucho tiempo, pues pronto les faltaría el alimento o serían inhibidas por acumulación de productos de desecho.

En estudios de laboratorio, cuando la bacteria se inocula en un medio de cultivo, se observan los siguientes periodos de crecimiento:

- 1).- Fase inicial o Fase Lag: En esta fase se presenta muy poca actividad bacterial, debido a que las bacterias están en un periodo de adaptación al medio antes de presentarse la división celular.
- 2).- Fase Logarítmica: Aquí, las bacterias se están reproduciendo a su velocidad máxima incrementándose por progresión geométrica como resultado de la reproducción por fisión. En este periodo, si se grafica el logaritmo del número de bacterias presentes contra el tiempo, se obtendrá una línea recta.
- 3).- Fase Estacionaria: En esta fase, las bacterias están muriendo a la misma velocidad a la que se están formando.
- 4).- Fase de Muerte: Generalmente, después de 18 ó 24 horas, la producción logarítmica de células viables de reproducción a las no viables es menor cada vez, debido a diferentes factores como el agotamiento de los nutrientes, falta de oxígeno, acumulación de los productos tóxicos y la falta de espacio.

La capacidad de estos microorganismos para crecer y realizar su función específica está limitada por la disponibilidad del alimento para cubrir sus requerimientos energéticos

y los cambios en el medio. El medio nutriente utilizado debe contener los nutrientes necesarios para la realización de la actividad bacterial.

Curva de crecimiento celular

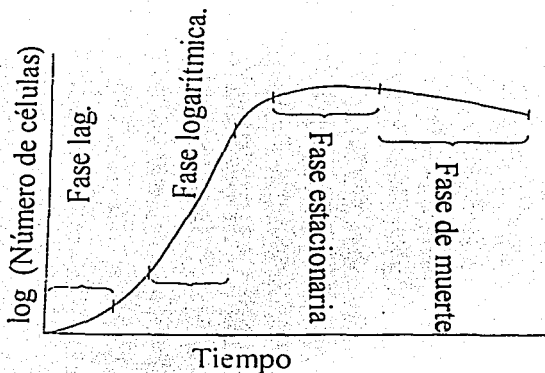


Figura 3. Ciclo de vida de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*⁽¹⁴⁾

1.3 Oxidación de minerales.

El uso de la hidrometalurgia en la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley ha tenido gran importancia en las últimas décadas⁽¹⁷⁾.

Los procesos hidrometalúrgicos se basan fundamentalmente en la solubilización de metales o minerales y en la recuperación posterior de los elementos deseados a partir de la solución por métodos adecuados. Si la selectividad de microorganismos está involucrada en la solubilización, la técnica es conocida como **Biolixiviación**, **Biohidrometalurgia**,

Lixiviación microbiana, Lixiviación bacteriológica, Oxidación bacteriana o Biotecnología de minerales⁽¹⁸⁾.

La Biohidrometalurgia como medio para extraer metales de yacimientos sulfurados se ha utilizado desde hace miles de años.

La Biohidrometalurgia es, por definición, un proceso de oxidación bioquímica catalizado por organismos vivos, en el cual un mineral insoluble es oxidado a una forma soluble. En el caso de los sulfuros metálicos, el proceso puede ser representado en forma simplificada por la siguiente reacción⁽¹⁹⁾:



En el transcurso de las últimas dos décadas se ha visto un desarrollo interesante en el campo de la biohidrometalurgia, y un crecimiento lento pero estable, tanto a nivel de su aplicación como en la sofisticación de nuevas tecnologías. Hoy, la biohidrometalurgia es aplicada a una escala sin precedentes a través del mundo en la recuperación de metales a partir de materiales de baja ley, tales como minerales de desecho⁽²⁰⁾.

Además de la aplicación de la lixiviación bacteriana en minerales de baja ley, puede aplicarse también de manera efectiva, en la lixiviación de minerales de alta ley y en concentrados por flotación convencional. Así mismo, la lixiviación bacteriana de concentrados puede estar acompañada de extracción con solventes o algún otro proceso de extracción^(22, 23, 24). En investigaciones recientes, se ha contemplado la posibilidad de que minerales sulfurados complejos puedan ser tratados también por este método^(25, 26).

Existen diversos factores que influyen en la lixiviación microbiana, siendo los más importantes.

a) Tamaño de partícula. El tamaño de partícula es un parámetro crítico en la biolixiviación debido a que influye en la velocidad del proceso y en los costos asociados con la reducción de la partícula⁽²⁷⁾.

Bajo condiciones normales de aeración, la velocidad de lixiviación está limitada por la disponibilidad de área superficial del sustrato sólido por unidad de volumen del licor lixivante.

En el caso de los sustratos sólidos tales como los sulfuros metálicos, la concentración de sustrato es sinónimo de tamaño de partícula, y por lo tanto del área superficial, ya que el sustrato está disponible solamente en la superficie. El del interior sólo lo estará cuando el material del exterior se haya disuelto o cuando haya disminuido su tamaño⁽²⁸⁾.

b) Concentración de pulpa. A concentraciones de sustrato menores del 8%, la velocidad de extracción, y por lo tanto el crecimiento bacteriano, están limitados por el sustrato disponible. A concentraciones de sustrato mayores de un 20% se presentan otros factores que también le son limitantes al microorganismo como la transferencia de oxígeno y de dióxido de carbono⁽²⁹⁾. Estos inconvenientes pueden eliminarse si se incrementa la aireación y la agitación del medio⁽³⁰⁾, ya que esta declinación de la velocidad de extracción puede deberse a la interferencia de los sólidos en la transferencia de los gases: O₂ y CO₂, al microorganismo⁽³¹⁾.

c) Concentración de oxígeno. Debe ser alta ya que los procesos realizados por las bacterias son oxidativos, y bajas concentraciones de éste, limitan el crecimiento⁽³²⁾.

d) *Concentración de CO₂*. Debido a la baja solubilidad del CO₂ en soluciones ácidas⁽³³⁾, es necesario enriquecer el aire para no estar limitado por dicho compuesto, que es indispensable en el metabolismo de cepas de origen mineral⁽³⁴⁾, comúnmente usadas en biolixiviación.

e) *Interacción sólido-líquido*. La importancia de la aireación y la agitación en procesos de fermentación aeróbica es bien conocida. El objetivo principal es proveer el oxígeno necesario a los microorganismos, para que éstos lleven a cabo sus actividades metabólicas. Una función secundaria de la aireación y la agitación es mantener a los microorganismos en suspensión⁽³⁵⁾. Sin embargo, sólo una pequeña fracción del total de la agitación es requerida para esto. En estudios de laboratorio, la aireación y la agitación se efectúan por la rotación de los matraces en agitadores. En fermentadores a escala semi-piloto y escala industrial, el oxígeno es alimentado generalmente por compresores de aire y la agitación se efectúa mecánicamente⁽³⁶⁾.

1.4 Mecanismos de actuación de Microorganismos.

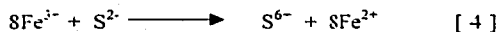
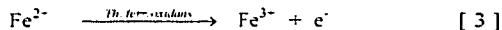
La biolixiviación es un proceso en el cual ciertos microorganismos, como el *Thiobacillus ferrooxidans*, catalizan la oxidación a sulfatos tanto de sulfuros metálicos como de otros compuestos reducidos del azufre, así como, del ion ferroso a férrico. De forma general la biolixiviación engloba a todos aquellos procesos donde se produce la solubilización de compuestos minerales debido a la acción de microorganismos.

Los mecanismos a través de los cuales los microorganismos oxidan minerales sulfurados son complejos y no están completamente establecidos. Sin embargo, se han identificado dos mecanismos básicos: oxidación directa e indirecta⁽²¹⁾.

-Oxidación directa

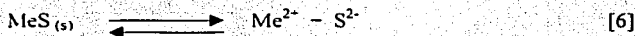


-Oxidación Indirecta



La bacteria oxida al ion ferroso de la solución, reacción 3, y el proceso continúa de forma cíclica de acuerdo con las reacciones 4 y 5.

Con respecto a estos mecanismos hay opiniones divergentes en cuanto a las condiciones en que se producen. Mientras Bruynesteyn⁽³⁷⁾ afirma que se trata de un proceso único en el que la bacteria actúa sobre el sólido, Torma⁽³⁸⁾ sostiene que, previo a la actuación bacteriana, el equilibrio:



produce iones en solución, y que la acción bacteriana se produce en las inmediaciones de la superficie del sólido a medida que los iones S^{2-} son liberados, demostrando que los productos de solubilidad de distintos sulfuros metálicos tienen una relación directa con las velocidades de oxidación en presencia de bacterias. Ello equivale a decir que en la medida en que el sistema estuviera suficientemente agitado para asegurar una difusión rápida de los iones, la mayor o menor adherencia de las bacterias sobre el sulfuro metálico no debería tener influencia en el proceso.

Por otra parte, en varias publicaciones se ha afirmado que la presencia de determinados sólidos, inertes o activos, capaces de sufrir el proceso de biolixiviación, interfiere en el proceso de oxidación bacteriana del ion ferroso, probablemente debido a la adherencia de las bacterias a la superficie de dichos sólidos, disminuyendo el número de microorganismos en suspensión, o a efectos tóxicos producidos por la disolución parcial de los sólidos^(39,40).

1.4.1 Mecanismo directo:

Thiobacillus Ferrooxidans.

La reacción química de disolución por oxidación de un sulfuro, reacción (2), puede ser catalizada por la acción directa de distintas bacterias aeróbicas sobre los sulfuros minerales. Hay distintos ejemplos que ilustran este hecho con referencia a los sulfuros de hierro, cobre, zinc, níquel, plomo y cobalto, e incluso, a mezclas de estos sulfuros. Se ha demostrado, por ejemplo, que la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* se retiene sobre la superficie de los sulfuros metálicos provocando picaduras y agujeros allí donde se ha comprobado el contacto físico. Este fenómeno ha sido observado por Bennett y Col⁽⁴¹⁾, al estudiar el efecto del ataque de estas bacterias sobre la pirita. Sin embargo, se desconoce el mecanismo a través del cual los átomos de hierro o azufre son retirados por la bacteria desde la superficie del mineral.

1.4.2 Organismos termófilos (*Sulfolobus...*) y otros (*Pseudomonas*).

En el caso de organismos *termófilos* como los *Sulfolobus*, la microscopía electrónica de transmisión ha permitido demostrar la fijación de dichos microorganismos a partículas de azufre elemental. Esta unión se produce a través de cilios adhesivos de forma irregular y

resistentes a los ácidos y al calor⁽⁵⁾. Estos puentes entre el organismo y su fuente de energía -el mineral- aseguran una fuerte interacción en ambientes tan agresivos, en cuanto a temperatura y demás condiciones. La unión a través de los pilis provoca un contacto directo para la lixiviación bacteriana, ayuda a aumentar el área superficial para un mejor contacto y puede contener los sistemas captadores de energía que aceleran la biolixiviación de sustrato.

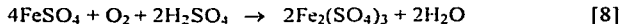
En el caso de otros organismos como las *Pseudomonas*, bacterias implicadas en la recuperación del uranio, se indica que la fijación inicial del microorganismo al mineral se produce a través de distintos polímeros. La fijación inicial del microorganismo al sustrato se debe a la producción de un polisacárido primario, a continuación se forma otro polisacárido secundario que origina una especie de tela de araña entre las células y las une entre sí. El incremento en la producción de estos compuestos secundarios está en relación directa con la mayor efectividad en la biolixiviación. Sin embargo estos son algunos ejemplos que indican la importancia de las interacciones microorganismo-mineral, es necesario abordar dicho conocimiento, con el fin de conseguir mejores rendimientos.

1.4.3 Mecanismo indirecto.

Thiobacillus ferrooxidans.

Frente al mecanismo directo que se ha comentado en los párrafos anteriores, la acción indirecta de las bacterias sobre los minerales puede llegar a ser tan o más importante que la directa. en el caso de los *Thiobacillus ferrooxidans*, esta acción se puede concretar en la oxidación del azufre y del hierro ferroso por las reacciones:





que producen ácido sulfúrico y hierro férrico cuya presencia conjunta hace de ellos eficaces agentes lixiviantes de distintos sulfuros metálicos. De esta manera, los metabolitos producidos por la acción vital bacteriana pueden ser, de manera indirecta, los responsables del proceso de disolución. Por ejemplo, la oxidación del sulfuro de zinc por el sulfato de férrico transcurre según la reacción:



El sulfato ferroso y el azufre elemental serán oxidados por la bacteria a sulfato férrico y ácido sulfúrico mediante las reacciones (7) y (8), contribuyendo a la regeneración del agente lixiviante y además de una forma mucho más rápida que si el medio fuese estéril. No olvidemos que las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* catalizan el paso ferroso a férrico multiplicando la velocidad del proceso por un factor del orden de 10^5 - 10^6 .

1.5 Microorganismos útiles en biolixiviación.

1.5.1 *Thiobacillus ferrooxidans*.

Dentro del género *Thiobacillus*, la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* es la más importante, tanto por los estudios realizados sobre ella, como por ser la más aplicada a nivel práctico, bien a escala de laboratorio, piloto o industrial. En la tabla 3 se resumen las principales características de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* y en la tabla 4⁽⁴²⁾ se resumen los principales sulfuros minerales que pueden ser oxidados por estos microorganismos, los cuales tienen forma cilíndrica y dimensiones de aproximadamente 2 x 0.5 μm . Son Gram negativos y quimioautótrofos, es decir, oxidan sustancias inorgánicas para obtener su energía (hierro ferroso y especies reducidas del azufre) y obtienen su

carbono celular fijando dióxido de carbono del aire a través de un mecanismo similar al de las plantas verdes. Son también *acidófilos*, y crecen a un pH óptimo comprendido entre 2.0 y 3.0, a temperatura moderada (25-35 °C), por lo que se les denomina *mesófilos*.

<p style="text-align: center;">Thiobacillus Ferrooxidans Temple y Colmer, 1951</p> <p>Forma: bacilos cortos, con terminaciones redondeadas, individuales o en pares.</p> <p>Tamaño: 0.5 x 1.0 micras.</p> <p>Movilidad: móvil.</p> <p>Colonias: pequeñas (0.5-1.0 mm).</p> <p>Temperatura óptima: 30-35 °C: mesófila.</p> <p>Rango de crecimiento (10-37 °C).</p> <p>pH óptimo: aprox. 2.5 (ácidofila).</p> <p>Rango de crecimiento: 1.3-4.5.</p> <p>Tinción Gram: negativa.</p> <p>% mol G - C del DNA: 58-59.</p> <p>Nutrición: quimiolitotrófica obligada.</p> <p style="padding-left: 2em;">Autótrofa (consume Fe²⁺ y S⁰).</p> <p>Respiración: aeróbica estricta.</p> <p>Reproducción: fisión binaria o división transversal (asexual).</p> <p>Distribución: amplia con sulfuros minerales y azufre, en las aguas ácidas de las minas con sulfuros, en suelos que contienen piritita o marcacita, en las aguas de las minas de carbón.</p> <p>Datos basados en: Bergeys Manual of systematic Bacteriology, 1989, vol 3, Sec. 20.</p>

Tabla 3. Características principales de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*⁽¹⁴⁾

Al encontrarse en ambientes asociados a los depósitos sulfurados, se le considera como uno de los principales responsables de la aparición de aguas ácidas en estos lugares y por tanto, como un productor activo de soluciones oxidantes de sulfato férrico, consecuencia de la biotransformación de pirititas y marcacitas contenidas en las minas. En el caso de sulfuros que no contienen hierro, su fuente de energía es la oxidación sobre todo del azufre, aunque el cobre⁽⁴³⁾, el estaño⁽⁴⁴⁾ y el uranio⁽⁴⁵⁾ han sido mencionados también como alguna de sus posibles fuentes energéticas.

En el caso de la bacteria que nos ocupa, la oxidación del hierro no está perfectamente bien determinada a nivel de mecanismo. Se ha propuesto que la etapa inicial ocurre fuera de la membrana celular, en donde los iones Fe^{2+} donan electrones a un aceptor inicial de los mismos. Este aceptor es una proteína que contiene cobre (la rusticianina), la cual constituye alrededor del 5% de la proteína celular del microorganismo y es reducible directamente por el ion ferroso⁽⁴⁶⁾. En la etapa siguiente, esta proteína reduce un citocromo oxidasa terminal⁽⁴⁷⁾. Contradicen este mecanismo ciertas investigaciones en las que se ha encontrado que la reacción entre el Fe^{2+} y la proteína es demasiado lenta en comparación con la rápida oxidación del ion por parte de las bacterias⁽⁴⁸⁾. Como se ve, este es un campo extraordinariamente abierto y un reto importante a nivel bioquímico y microbiológico, pues uno de los principales problemas en la siempre deseable mejora de los procesos en que toman parte este tipo de microorganismos, es que se desconocen los mecanismos a través de los cuales realizan su actividad metabólica, lo cual limita la aplicabilidad de los mismos.

Arsenopirita	$\text{FeS}_2 \cdot \text{FeAs}_2$
Bornita	Cu_3FeS_4
Calcosina	Cu_2S
Calcopirita	CuFeS_2
Covelita	CuS
Engarita	$3\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{As}_2\text{S}_5$
Galena	PbS
Marcacita	FeS_2
Millerita	NiS
Molibdenita	MoS_2
Oropimente	As_2S_3
Pirita	FeS_2
Esfalerita	ZnS
Tetraedrita	$\text{Cu}_8\text{Sb}_2\text{S}_7$

Tabla 4. Algunos de los sulfuros minerales que son oxidados por microorganismos del género *Thiobacillus*.

1.5.2 *Thiobacillus thiooxidans*.

Otra bacteria conocida dentro del género *Thiobacillus* es la *Thiobacillus thiooxidans*, la cual se encuentra a menudo asociada a la *Thiobacillus ferrooxidans*. Las características de ambas son similares, aunque difieren en que la *Thiobacillus thiooxidans* no es capaz de utilizar como fuente energética los compuestos oxidados de hierro. Esta especie oxida también al azufre hasta ácido sulfúrico y es, quizás, el organismo más tolerante a los medios ácidos, pues es capaz de vivir y reproducirse a pH cercanos a cero.

En los ambientes naturales es posible encontrarlos asociados con los del género *Thiobacillus*, también *acidofilos*, pero heterótrofos (que asimilan carbono orgánico). Sin embargo, la atención prestada a estas bacterias ha sido muy reducida, aunque actualmente se tiene la certeza de que el conocimiento de las interacciones entre organismos autótrofos y heterótrofos, en los ambientes de lixiviación, es muy importante en el momento de determinar los factores que condicionan la solubilidad de los metales. El papel de estos organismos heterótrofos es incierto cuando actúan en presencia de *Thiobacillus*, pero se ha discutido⁽⁴⁹⁾ su importancia, aunque indirecta, en la destrucción de ciertos compuestos orgánicos perjudiciales para el desarrollo de los autótrofos.

1.5.3 Organismos termófilos (*sulfolobus...*) y otros.

Durante los últimos años ha habido gran interés en relación con una gran variedad de organismos termófilos, bien que vivan a temperaturas moderadas (hasta 50-55 °C) o bien a temperaturas altas (por encima de 60 °C). Estos microorganismos han sido descubiertos en ambientes relacionados con algunos sistemas de lixiviación o en fuentes termales. Entre ellos se encuentran los del género *Sulfolobus*, los cuales fueron aislados por primera vez en fuentes termales del parque nacional de Yellowstone (EE.UU.). Estos microorganismos

catalogados dentro de las denominadas arqueobacterias, que oxidan al hierro, azufre y compuestos orgánicos como fuente de energía y a temperaturas de hasta 85 °C, son también acidófilos y crecen a pH cercanos a 2.0^(50, 51).

Las investigaciones en este campo han llevado, en los últimos años, al aislamiento de numerosos organismos moderadamente termófilos, muchos de ellos todavía sin ni siquiera nombre^(52, 53). Estos descubrimientos y el estudio y descripción de estas bacterias termófilas además de tener un interés en sí mismos por las transformaciones que provocan sobre el mineral, tienen también un excepcional interés en el sentido de que a las temperaturas a las que crecen, las reacciones químicas provocadas por los productos de su metabolismo transcurren más fácil y rápido. Es éste, por tanto, un campo con un extraordinario futuro y al que vale la pena dedicar mayores esfuerzos en los próximos años.

1.6 Aplicaciones.

1.6.1 Reseña histórica.

La actividad bioquímica sobre la Tierra comenzó con la aparición de vida sobre ella, como una consecuencia de la evolución y la interacción de la biosfera, de la atmósfera, de la hidrosfera y de la litosfera. Desde entonces, se produce tanto la génesis, como la degradación biológica de los minerales. En este sentido, aunque equivocadamente, la presencia de ácido sulfúrico en las aguas de las minas de carbón y la aparición de hierro y de cobre en las aguas de las minas de éste, ha sido considerada como resultado único de procesos de la química convencional.

La biolixiviación ha sido practicada por el hombre desde el siglo XVIII, hasta 1947 se aisló, de las aguas de una mina de carbones bituminosos⁽⁵⁴⁾ el primer y más importante organismo responsable de este tipo de fenómenos, la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*.

Aunque el primer trabajo sobre biolixiviación de cobre a partir de minerales marginales que lo contenían, se publicó en 1943⁽⁵⁵⁾, la presencia de *Thiobacillus ferrooxidans* en las aguas de estas minas se confirmó hasta 1963⁽⁵⁶⁾.

La Biolixiviación o lixiviación bacteriana a pesar de ser una tecnología relativamente nueva, es un fenómeno conocido desde la antigüedad⁽⁵⁸⁾. Básicamente, consiste en la extracción de metales contenidos en diferentes tipos de minerales por la acción de ciertos microorganismos⁽¹²⁾. Este proceso surge como una alternativa de los procesos químicos habituales, sobre todo para ser aplicado en minerales de baja ley o en los desechos resultantes de la extracción convencional de minerales con alto contenido del metal⁽⁵⁹⁾.

En la actualidad, la biolixiviación se aplica a nivel industrial para la recuperación de cobre⁽⁶⁰⁾ y uranio⁽⁶¹⁾, principalmente en Estados Unidos, Canadá, Japón y Chile.

Los microorganismos aceleran el proceso de disolución, en este caso oxidativa, su papel se considera similar al de un catalizador. El principal microorganismo involucrado en este proceso es el *Thiobacillus ferrooxidans*⁽⁶²⁾, el cual cataliza la oxidación de sulfuros inorgánicos de difícil disolución a sulfatos inorgánicos solubles, así como la de otros compuestos reducidos del azufre y la del ion ferroso a férrico. La bacteria utiliza la energía puesta en juego en las reacciones de oxidación para cubrir sus necesidades metabólicas.

1.6.2 Biolixiviación de menas de cobre.

La importancia del cobre en la economía actual, así como el progresivo avance tecnológico de la industria minera, han hecho posible la explotación de menas de cobre con leyes cada vez menores. Así, a principios del siglo pasado, la ley más baja con interés económico era de 2-2.5 % de Cu⁽⁷⁶⁾ y durante el decenio de los setenta y en la actualidad, se

han llegado a explotar leyes tan bajas como 0.3 % de Cu. Esto ha sido posible como resultado de la mejora de las técnicas mineras, métodos de concentración y técnicas hidrometalúrgicas.

El tratamiento hidrometalúrgico de minerales marginales de cobre, con contenidos relativamente bajos del metal (0.3-0.5 %), es una práctica mundialmente extendida. La ley de estos minerales es demasiado baja para tratarlos pirometalúrgicamente y lo suficientemente alta para desaconsejar su no-tratamiento y considerarles como productos estériles. El método más comúnmente utilizado para su tratamiento es la lixiviación en montones (figura 4). El mineral, como el propio nombre del proceso lo indica, es apilado en montones constituidos en algunos casos por hasta cientos de miles de toneladas, con un tamaño de partícula variable, pero casi nunca inferior a 10 centímetros. A continuación y durante un periodo de tiempo variable, medido en años, el sólido se riega con una solución ácida que se mueve a través del montón por gravedad. La solución, con una cierta cantidad de cobre se recoge en la parte inferior del montón, el cual se construyó sobre un suelo natural o artificialmente impermeabilizado. Más tarde, el metal se precipita a partir de la solución mediante cementación con chatarra de hierro y la solución resultante se recicla para continuar lixivando el mineral amontonado.

Durante muchos años se pensó que este proceso respondía a un mecanismo puramente químico, hasta que se identificaron diferentes organismos, de entre ellos destaca la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*.

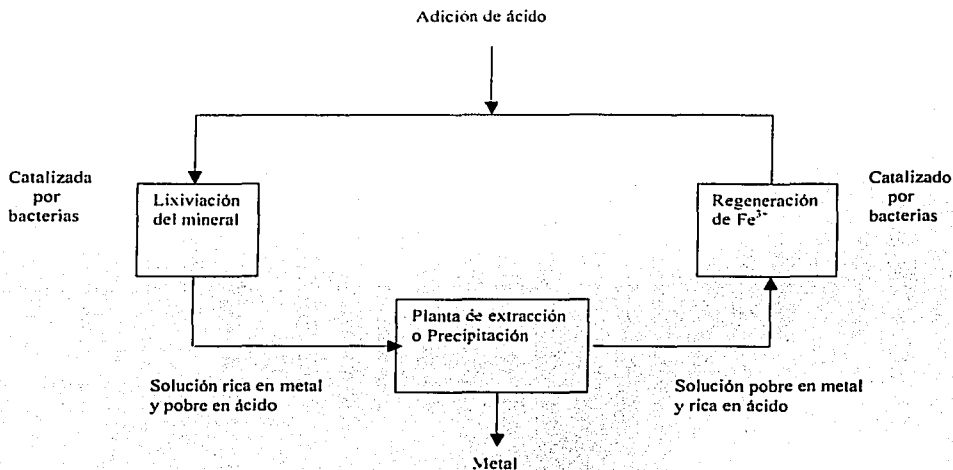


Figura 4. Esquema de un proceso de lixiviación en montones.

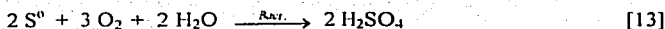
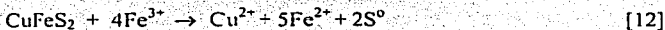
La importancia de la contribución microbiana a la solubilización de cobre es muy difícil de evaluar. Sin embargo podemos decir que las bacterias actúan tanto directamente sobre los sulfuros, mayormente pirita y calcopirita, como indirectamente en la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} que a su vez actúa como un efectivo oxidante de los distintos sulfuros minerales. Paralelamente a esta última acción, la acidez de la solución resultante se regenera por reacciones de oxidación del azufre sulfurado a ácido sulfúrico.

En la tabla 5 se presentan varios ejemplos, que muestran cómo mediante la lixiviación en montones con la participación de las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* se obtienen tonelajes importantes de cobre.

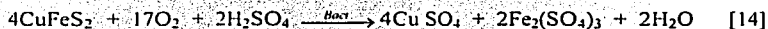
Actualmente existen distintos proyectos para implantar la lixiviación en montones asistida por microorganismos, en algunos países productores de cobre con importantes

acumulaciones de minerales marginales. En este sentido es necesario mencionar a distintos países sudamericanos y más concretamente a Perú, Brasil y sobre todo, Chile. En la actualidad Chile produce del orden de 10^6 t/año de cobre⁽⁶⁾ y sus reservas se estiman en 15×10^7 t, aunque, aproximadamente el 30 % de ellas están formadas por minerales de baja ley cuyo beneficio por los métodos convencionales no es posible. Adicionalmente, durante los últimos 40 ó 50 años se han acumulado miles y miles de toneladas de residuos, lo que unido a la cada vez más baja ley de los minerales, está induciendo a realizar el tratamiento de estas escombreras mal agotadas. Esta situación ha estimulado un importante número de investigaciones y desarrollos que han permitido la puesta a punto de procesos, bien a escala piloto o con implantación industrial.

Si bien existen varias bacterias capaces de intervenir en la biolixiviación de menas de cobre, la más importante en condiciones *mesófilas* (temperaturas ambientales) es, *Thiobacillus ferrooxidans*. En lo que se refiere a los mecanismos que intervienen en la biolixiviación de la calcopirita, desde un principio se han mantenido dos posturas. Para algunos investigadores la bacteria sólo actúa como catalizador en las transformación ferroso a férrico, siendo el ion férrico generado el que interacciona con el mineral y extrae el cobre. A este mecanismo se le ha denominado de "ataque indirecto"⁽⁷⁶⁾.



La reacción [12] ha sido confirmada por Dutrizac y MacDonald trabajando con calcopirita sintética. Otros investigadores proponen como principal la acción de la bacteria sobre el mineral, llegando algún autor a citar como perjudicial la presencia del ion férrico en la solución. A este mecanismo se le denominó "ataque directo". Para Razzell y Trussell⁽⁷⁷⁾, la reacción del ataque directo sobre la calcopirita sería:



En la actualidad se tiende a explicar las reacciones de biolixiviación, tanto en la calcopirita como en otros sulfuros, como fruto de un mecanismo directo de la bacteria sobre la superficie del mineral y de la acción del ion férrico en solución. Se dan, por lo tanto, los dos mecanismos ya clásicos en la biolixiviación. Se han observado también los fenómenos galvánicos entre minerales de diferente potencial de electrodo, los cuales desempeñan un papel importante en estos procesos⁽⁷⁶⁾.

Mina (País)	Tipo de lixiviación	Ley (%)	Bacteria	Producción (t/año)
Duval, Copper Basin. (EE.UU.)	Montones	0.31	Desconocida.	2.3
Duval, Esperanza min. (EE.UU.)	Montones	0.17	Tf.	2.5
Bluebird min. Miami (EE.UU.)	Montones	0.50	Desconocida.	6.8
Degtyansky (U.R.S.S.)	Montones In situ	-	Tf.	900
Kosaka Mine (Japón)	In situ	0.20	Tf.	800
Río tinto (España)	Montones	Var.	Tf.	8
Cananea (México)	Montones In situ	Var.	Tf.	9
Santo Domingo (Portugal)	In situ	-	Tf.	670

Tabla 5. Ejemplos de operaciones comerciales que utilizan la biolixiviación de minerales pobres de cobre para la extracción del metal

1.6.3 Biolixiviación de minerales refractarios que contienen metales preciosos.

El agotamiento de las reservas convencionales de oro y plata ha hecho que aumente considerablemente la investigación en los campos de exploración y metalurgia de estos metales. Así, masas minerales cuya explotación y procesamiento fueron en un tiempo rechazadas, han pasado hoy a tener un interés desde el punto de vista económico.

Una mena refractaria de oro es aquella cuyo nivel de extracción de este metal por el proceso convencional de cianuración no supera el 80 %, incluso después de una fina molienda, lo que no permite la recuperación económica del metal⁽⁶⁹⁾.

Uno de los casos más frecuentes en la naturaleza es cuando el oro se encuentra ocluido o finamente diseminado en una matriz de sulfuros, generalmente pirita y/o arsenopirita⁽⁷⁰⁾. En estos casos, ni siquiera una molienda muy fina hace posible la liberación del metal para su cianuración. Esta refractariedad de naturaleza física o primaria⁽⁷¹⁾ se debe a la imposibilidad de acceso de los iones cianuro a las partículas submicroscópicas de oro que están en el interior de la red cristalina de los sulfuros.

Aún en estos casos en los que se podría aplicar una fina molienda, existe un problema adicional: la presencia de sulfuros que se descomponen, originando especies que consumen cianuro, o compuestos de azufre que promueven la precipitación del oro ya disuelto, siendo el resultado global un elevado consumo de cianuro y de álcali y una baja recuperación del metal⁽⁷²⁾. En estos casos, y también cuando existen especies en el mineral que consumen oxígeno, se trata de una refractariedad química.

Si la refractariedad puede asociarse a la presencia de minerales conductores tales como la pirita⁽⁷³⁾, se considera que la refractariedad es de tipo electroquímico.

En todos estos casos, se requiere un pretratamiento que disuelva el sulfuro para dejar el oro disponible para una cianuración posterior. Se han propuesto y aplicado algunos

métodos de la oxidación química (tanto a presión atmosférica como a presión elevada) y de oxidación biológica. La elección del proceso a aplicar depende de la naturaleza de la refractariedad, el tipo de mineral y la ley del mineral.

El método tradicional para el pretratamiento de estos minerales y concentrados es la tostación de los sulfuros^(74,75). En el proceso de tostación se oxidan el arsénico y el azufre, y las partículas de oro quedan en el residuo. El objetivo de este método es la transformación de los sulfuros de hierro en óxidos de hierro de gran porosidad, para que los iones cianuro puedan penetrar por el calcinado y así aumentar la extracción de oro.

El proceso de tostación es caro y tiene consecuencias negativas para el medio ambiente, puesto que genera gases que contienen azufre, arsénico, antimonio y mercurio, y cuando el control no es adecuado, que es el caso más general, se producen pérdidas de plata. Para reducir estos problemas, muchos investigadores se han inclinado por los tratamientos hidrometalúrgicos.

El uso de la hidrometalurgia en la recuperación de metales de minerales refractarios de baja ley ha tenido gran importancia en las últimas décadas⁽¹⁷⁾.

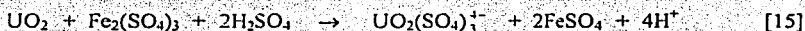
Los procesos hidrometalúrgicos se basan fundamentalmente en la solubilización de metales o minerales y la recuperación posterior de los elementos deseados desde la solución por métodos adecuados. Si la actividad de microorganismos está involucrada en la solubilización, la técnica es conocida como Biohidrometalurgia, Lixiviación microbiana, Biotecnología de minerales, o simplemente Biolixiviación.

La biooxidación⁽⁷⁶⁾ es un pretratamiento biológico en el que los sulfuros metálicos son oxidados metabólicamente por microorganismos, liberando paralelamente los metales preciosos atrapados en su interior. La aplicación de la biooxidación al tratamiento de las menas refractarias es un concepto relativamente nuevo, en comparación con la tostación y

la oxidación química, la cual mediante ensayos comparativos ya ha demostrado su viabilidad en términos de recuperación del metal y de la economía del proceso.

1.6.4 Biolixiviación de menas de uranio.

En un gran número de plantas en las que se obtiene uranio, el metal se extrae del mineral solubilizándolo con ácido sulfúrico. Sin embargo, de esta manera sólo es posible pasar a la solución el uranio hexavalente no el tetravalente, el cual también aparece en los minerales en cantidades importantes. El U(IV) puede ser oxidado por el sulfato férrico según la reacción:



Dado que la acción bacteriana es un método simple y barato de catalizar el paso de ferroso a férrico y suministrar así el oxidante necesario para el proceso, el consumo de sulfato férrico, factor importante en relación con el costo de extracción del uranio, puede reducirse generando este Fe^{3+} mediante biolixiviación de una materia prima tan barata como la pirita.

Los resultados de diversos experimentos de laboratorio y cálculos de rentabilidad del proceso muestran que la recuperación del uranio biorregenerando el Fe^{3+} es más económica que si se utiliza Fe^{3+} generado por métodos químicos convencionales. El proceso biológico tiene además, la ventaja de obtener soluciones más concentradas de Fe^{3+} gracias a la formación adicional de ácido sulfúrico como otro producto de la actividad bacteriana, ya que éste evita la precipitación del oxidante, la cual ocurre cuando se genera químicamente, y permite menores consumos globales de ácido.

Canadá es el país donde se han realizado más estudios en relación con la recuperación de uranio por lixiviación ácida y donde la implantación comercial de estos procesos con participación de microorganismos ha tenido más éxito. Los estudios se realizaron en la provincia de Ontario y más concretamente en Elliot Lake⁽⁸⁾, donde se encuentran las plantas industriales. La observación, en el comienzo de la década de los años 60, de concentraciones importantes de uranio y de hierro férrico en las aguas de las minas, condujo a la determinación de las mejores condiciones para la actuación de las bacterias y para la óptima preparación del mineral en cuanto a su trituración y forma de amontonamiento. Esta información, que inicialmente fue utilizada para un nuevo tratamiento sobre menas ya tratadas químicamente, permitió el desarrollo de una tecnología de lixiviación asistida por microorganismos como única técnica para la disolución del uranio. Estimaciones recientes⁽⁶³⁾ cifran entre el 10 y el 20% la producción del uranio canadiense via proceso de biolixiviación. Algunos datos al respecto^(3,8) indican que por ejemplo, en Agnew Lake Mines, durante un periodo de explotación de 5 años (1978 a 1983), hubo algunos meses en que se produjeron unas 7 t de uranio utilizando únicamente un proceso con microorganismos y generando el Fe^{3+} por oxidación microbiana de pirita.

En otro caso (Denison Min), una mina subterránea, produjo durante el año 1985, 225 t del metal a partir del drenaje de las aguas de mina.

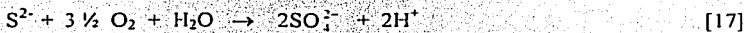
1.6.5 Biodesulfuración de carbones.

Casi todos los carbones contienen azufre en cantidades más o menos grandes que pueden llegar en casos extremos al 8 %, e incluso al 10 %. La mayoría de este azufre se encuentra en forma piritica, habiéndose depositado durante el periodo de formación del carbón. No obstante y de forma general el azufre puede aparecer en tres formas:

- a) Azufre pirítico en forma de piritas y marcasitas, con igual composición química, FeS_2 , pero diferente estructura cristalográfica.
- b) Azufre sulfato. Este porcentaje de azufre en carbones no oxidados suele ser muy bajo y prácticamente no merece ser considerado.
- c) Azufre orgánico, que se encuentra ligado al carbón en forma de sulfuros ($\text{R}_1\text{-S-R}_2$), de disulfuros ($\text{R}_1\text{-S-S-R}_2$), de tioles (R-SH) y de tiofenos (con estructuras orgánicas cíclicas complejas). No obstante, estos últimos y más concretamente los benzotiofenos son los más abundantes y refractarios a su eliminación.

1.6.5.1 Biolixiviación de azufre pirítico.

El caso del azufre pirítico, es una de las posibilidades de eliminación de azufre en fase acuosa de distintos procesos, en donde el elemento queda en solución en forma oxidada; es decir, como SO_4^{2-} . De esta forma, exponiendo el FeS_2 a un medio acuoso oxidante se produce sulfato férrico a través de una serie de reacciones químicas, más o menos complejas que se resumen a continuación:



La suma de estas dos reacciones conduce a esta otra:



Posteriormente, el ion férrico puede precipitar en medio acuoso a través de la reacción:



Precisamente. las dos primeras reacciones, y como consecuencia la tercera, son catalizadas de forma apreciable por una serie de microorganismos capaces de desarrollarse en las aguas de las minas de carbón y cuyo más significativo representante es nuevamente la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. capaz de acelerar y facilitar la extracción del azufre piritico de distintos carbonos que lo contienen en exceso⁽⁶⁾.

En general, los datos disponibles indican que en tiempos de residencia del orden de una semana, es posible recuperar el 90% de este azufre. Estos son todavía periodos de tiempo largos, y es necesario hacer esfuerzos para aplicar nuevos organismos, sobre todo termófilos que desarrollan su actividad por encima de 50-60 °C, para recuperar o eliminar más rápida y eficazmente el azufre piritico.

1.6.5.2 Bioloxiación de azufre orgánico.

El problema es mucho más complejo en el caso del azufre orgánico, pues su recuperación requiere un cierto grado de molienda al estar muy diseminado en la matriz carbonosa. Además, también se requiere el uso de cultivos, puros o mixtos, de organismos capaces de oxidar varios tipos de azufre orgánico. Desde el punto de vista microbiológico se tiene la creencia, aunque no la certeza, de que las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans* son capaces de recuperar este tipo de azufre, sin embargo últimamente se están utilizando microorganismos termófilos para la eliminación de ambos tipos de azufre. Ejemplos de microorganismos de este tipo son el *Sulfolobus brierleyi* y el *Sulfolobus acidocaldarius*^(64,65).

Con este último se ha diseñado un diagrama de flujo en dos etapas que permite recuperar casi todo el azufre piritico y un 40% del orgánico, con un costo de 17 dólares/t de carbón, en una planta que trate 120 t/h^(66, 67).

Junto a este tipo de microorganismos, también se han utilizado microorganismos heterótrofos; es decir que crecen en medios orgánicos⁽⁹⁾. Actualmente, muchos esfuerzos siguen esta línea.

Las futuras orientaciones de trabajo, a nivel mundial, apuntan tanto hacia una perfecta caracterización del azufre orgánico en los distintos tipos de carbones, como al aislamiento, identificación y utilización de microorganismos y mezclas adecuadas de microorganismos capaces de oxidar por sí solos a los distintos tipos de azufres orgánicos, para después poder aplicarlas en la biolixiviación del carbón.

1.7 Ventajas y desventajas de la biolixiviación.

Decker⁽²⁾ resume muy acertadamente estos aspectos a partir de la experiencia conseguida en plantas en funcionamiento y de distintos desarrollos a nivel de laboratorio.

Las ventajas de este tipo de procesos se concretan en:

- Consumos energéticos reducidos, como consecuencia de que no es preciso secar los minerales y de que los procesos tienen lugar a temperaturas por debajo de los 100 °C. En el caso concreto de las aplicaciones comerciales más comunes esta temperatura es la ambiente.
- Ausencia de contaminación por anhídrido sulfuroso, lo cual es común también a los procesos hidrometalúrgicos.
- Bajo consumo de reactivos, sobre todo de ácido sulfúrico, como consecuencia de que dicho ácido lo producen las propias bacterias.
- Bajos costos de operación, que en el caso del cobre pueden llegar a ser hasta la mitad de los necesarios para obtener el metal por vía seca.

- Posibilidad de tratamiento de minerales pobres y productos residuales que de otra forma no podrían beneficiarse.
- Flexibilidad en las instalaciones, que permite hacerlas rentables, incluso trabajando a escalas reducidas.
- Fácil separación del hierro de los residuos, ya que precipita en forma de jarositas que se pueden recuperar como una fase cristalina.

Estos procesos tienen también desventajas que propician una aplicación mucho menor de la que potencialmente se podría esperar, dentro de ellas destacan:

- Velocidades lentas, que en muchos casos hacen inviable la utilización de los procesos. Aunque en este sentido se están realizando importantes estudios, todavía no se está en disposición de hacer estos procesos competitivos con relación a otros de la hidrometalurgia clásica, que aunque menos convenientes por su concepción, son mucho más rápidos.
- Se producen soluciones que en algunos casos son demasiado diluidas para utilizarse en las plantas convencionales de precipitación electrolítica, para realizar una extracción fácil y rentable de los metales contenidos.
- Efluentes ácidos que deben tratarse antes de su vertido, al igual que en los procesos hidrometalúrgicos.
- La situación económica actual de las empresas dedicadas a la extracción de minerales, fuertemente deprimidas y altamente capitalizadas, no permite una reindustrialización mediante la adopción de nuevos procesos, lo cual reduce mucho la posible aplicabilidad de nuevos procesos, entre ellos los procesos de biolixiviación.

1.8 Perspectivas.

En la actualidad, existen diversas tendencias en la investigación y desarrollo a escala industrial de estos procesos^(2,7-9), las cuales pueden concretarse en los siguientes puntos:

- Uso de mezclas de microorganismos, que mediante fenómenos simbióticos puedan acelerar las reacciones y conseguir soluciones de lixiviación más ricas.
- Uso de organismos termófilos que permitiendo trabajar a temperaturas cercanas a los 100 °C, incrementen las velocidades de biolixiviación y potencien los mecanismos de ataque, tanto directos como indirectos.
- Desarrollo de la ingeniería de reactores que permita una mejor cinética de biolixiviación.
- A nivel microbiológico, desarrollo de métodos más eficientes para aislar organismos de medios naturales y de los cuales, actualmente no se conocen sus posibilidades como biolixivantes.
- Estudio más profundo, mediante la genética, de los mecanismos últimos que permiten la biolixiviación, así como poder establecer qué compuestos intracelulares dominan y modifican las distintas actuaciones de los microorganismos en su medio de crecimiento.
- En el campo de la desulfuración de carbones debe hacerse un gran esfuerzo en la caracterización de los distintos tipos de azufre orgánico que pueden aparecer en estas materias primas. para así poder aislar, identificar y utilizar los microorganismos que puedan solubilizar este azufre.

Por último, es necesario agregar que en la actualidad y en un futuro inmediato, el potencial de aplicación directa de la biolixiviación parece encontrarse en el tratamiento de menas y concentrados a los cuales no son aplicables los criterios convencionales por

razones de ley, accesibilidad o mineralogía compleja. En estos momentos, por tanto, las posibilidades de la biolixiviación son muy limitadas si se considera como una alternativa económicamente competitiva con los procesos convencionales, pirometalúrgicos e hidrometalúrgicos. Éste es precisamente el reto para quienes nos encontramos trabajando con este tipo de sistemas.

CAPÍTULO II

2 Desarrollo experimental.

2.1 Reactivos, material, y equipo.

-Reactivos

KMnO_4 (Permanganato de potasio).

H_2SO_4 (Ácido sulfúrico).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sulfato de amonio).

K_2HPO_4 (Fosfato monoácido de potasio).

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de magnesio).

KCl (Cloruro de potasio).

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Nitrato de calcio).

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato ferroso).

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Acetato sódico).

CH_3COOH (Ácido acético glacial).

$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClIN}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Clorhidrato de ortofenantrolina).

NaF (Fluoruro de sodio).

$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (Clorhidrato de hidroxilamina).

Disolución patrón de 1 $\mu\text{g/L}$ de Fe.

Concentrado de flotación (Sulfuros de cobre).

-Material

Matraces erlenmeyer de 250 ml.

Material común de laboratorio.

- Equipo

Incubadora con agitación orbital .

Microscopio de contraste de fases.

Espectrofotómetro UV-visible.

Espectrómetro de absorción atómica.

Reactor agitado mecánicamente.

2.2. Mineral.

El concentrado de flotación que se utilizó para la realización de este trabajo fue proporcionado por la Cia. Mexicana Minera de Avino S.A. de C.V.

La muestra es un concentrado global con tamaño de partícula de 70-150 μm con mineralización de sulfuros (enriquecimiento secundario), de alto interés comercial, que contiene cantidades importantes de Plata (6479 g/t), Oro (32.12 g/t) y Cobre (29.5 %), presentes como Plata nativa Ag, Argentita Ag_2S , Oro nativo Au, Calcopirita CuFeS_2 , Calcosita Cu_2S , Covelita CuS , Digenita Cu_9S_5 y Bornita Fe_3CuS_4 , principalmente.

2.3 Caracterización de la muestra.

La caracterización de la muestra consistió en el análisis químico cuantitativo, por vía húmeda para determinar las cantidades de Cu y Zn (fluorescencia de rayos X, (FRX)) y por ensayo al fuego (copelación), para la determinación de Ag y Au. Se realizó también un análisis mineralógico utilizando la técnica de minerografía, en un microscopio óptico de luz reflejada con sistema de polarización, para identificar las fases minerales presentes, así como sus interrelaciones. Se realizaron también análisis por difracción de rayos X.

2.4 Selección de cepas.

Para realizar el presente trabajo se utilizaron 4 cepas diferentes de *Thiobacillus ferrooxidans* proporcionadas por el Centro Experimental del Noroeste (Chihuahua) del CRM (Consejo de Recursos Minerales), las cuales fueron obtenidas a partir de las aguas de los complejos mineros: Cananea, Nochebuena, Candameña y Tayahua.

2.5 Selección del medio de cultivo.

Para la preparación y reactivación de estos cultivos (cepas) se utilizó el medio salino basal de nombre 10-fold-9K, al que comúnmente se le llama 9K, enriquecido con una solución de Fe(II). Para su preparación, los nutrientes se disolvieron en 600 ml de agua destilada, ajustándose el pH a un valor de 2.0. Por otro lado el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se disolvió en 200 ml de agua destilada, ajustándose también el valor de pH a 2.0. Una vez preparadas las dos soluciones se mezclaron y se completó el volumen a casi 1L con agua destilada ajustándose nuevamente el pH al valor ya indicado y se aforó a 1L (a esta mezcla le llamaremos medio 9K-Fe (II)).

Para la adaptación de los microorganismos a la muestra de mineral y para los ensayos de biolixiviación se utilizó el medio salino basal 10-fold-9K libre de Fe(II).

Medio 9K- Fe (II)		Medio 9K	
Composición	g/L	Composición	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.0
K_2HPO_4	3.0	K_2HPO_4	3.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
KCl	0.1	KCl	0.1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.01	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0.01
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44.22		

Tabla 6. Composición química del medio 9K-Fe (II) y del medio 9K.

2.6 Preparación y reactivación de cultivos.

Las cepas anteriormente mencionadas (Cananea, Nochebuena, Candameña y Tayahua), se conservan en stock a 4 °C por lo que se reactivaron de la siguiente manera.

En un matraz erlenmeyer de 250 mL se inoculó el medio de cultivo 9K-Fe(II), con un 10% en volumen de cultivo stock. Esto se realizó para cada cepa por lo que al final de este primer paso se tuvieron 4 cultivos.

Simultáneamente se preparó un sistema control (testigo) conteniendo medio 9K-Fe(II) sin inóculo para observar el comportamiento del Fe (II) sin bacterias.

Una vez preparados los cultivos (figura 5), se procedió a colocar los reactores dentro de una incubadora con agitación orbital de la marca Lab-line modelo 3527-5 a una temperatura de 32 °C y 160 rpm durante todo el experimento. Para evitar la evaporación y contaminación de los cultivos, los matraces se cubrieron con torundas de algodón, cuidando que éstas permitieran la entrada de aire.

Las cepas fueron reactivadas mediante 5 pases sucesivos, en cada uno de los cuales se utilizó como inóculo el cultivo obtenido en el pase anterior.

Cabe mencionar que los pases sucesivos se hicieron con el objetivo de asegurarnos que las bacterias estuvieran mejor adaptadas a las condiciones de trabajo:

- Agitación orbital
- Medio de cultivo
- Temperatura
- pH

para poderlas utilizar en los estudios de biolixiviación del mineral así como para generar un banco de bacterias.

2.7 Seguimiento y control de parámetros.

Una vez que estuvieron preparados los cultivos se colocaron en la incubadora, dejando pasar una hora en las condiciones mencionadas y posteriormente se realizaron en cada sistema las siguientes determinaciones:

- i).- pH.
- ii).- Potencial de óxido-reducción.
- iii).- Cuantificación de la concentración del ion ferroso.
- iv).- Inspección visual de la apariencia de las muestras.

El monitoreo de estos parámetros se realizó cada 24 horas hasta el consumo total del ion ferroso.

2.7.1 Medición y control del pH.

La lectura del pH se hizo con un potenciómetro de la marca Cole-Parmer modelo 05669-20 utilizando un electrodo combinado para medir pH con referencia interna de Ag/AgCl, ajustando el valor a 2.0 con solución diluida 1: 3 de H₂SO₄, sólo en el caso de que éste fuera mayor.

2.7.2 Medición y seguimiento del potencial de óxido-reducción.

La lectura de este parámetro se realizó con el mismo equipo, utilizando un electrodo de Ag/AgCl como referencia y un electrodo de platino como electrodo de trabajo.

2.7.3 Determinación de la concentración del ion ferroso en la solución.

Para determinar la concentración del ion ferroso en la solución se utilizó la técnica de permanganimetría que consiste en la titulación en medio ácido de una alícuota de solución problema con solución normalizada de KMnO_4 0.01N

2.7.4 Inspección visual de la apariencia de los cultivos.

Aunado a lo anterior, se observó diariamente la apariencia de los cultivos para detectar los cambios en la coloración y en la turbidez, así como la posible formación de precipitados en la solución. Estas observaciones nos indican de alguna manera la actividad bacteriana y por tanto el crecimiento de bacterias.

2.8 Estudios de biolixiviación del mineral en incubadora.

Una vez que las bacterias fueron reactivadas y adaptadas a las variables del sistema (agitación orbital, medio de cultivo, temperatura y pH) se procedió a ponerlas en contacto con el mineral de trabajo para adaptarlas a éste y obtener resultados de la cinética de las bacterias en presencia de mineral.

En matraces erlenmeyer de 250 mL se inoculó una pulpa mineral al 5% en sólidos, preparada en medio salino basal 9K, con 10 % en volumen de las cepas previamente reactivadas.

Se preparó un cultivo bajo las mismas condiciones suprimiendo el inóculo, para obtener las bacterias autóctonas del mineral.

Además se prepararon dos sistemas controles o testigos, equivalentes al sistema autóctono, pero bajo condiciones estériles, campana de flujo laminar, agregando a uno de ellos 5 mL de solución etanólica de timol al 5%. En este caso los matraces, el mineral, el

medio 9K, la solución de H_2SO_4 , la solución de bactericida, el agua destilada y el material necesario se esterilizaron previamente en una autoclave de vapor marca Presto a $120\text{ }^\circ\text{C}$ y 1.10 Kg/cm^2 durante 15 minutos.

El seguimiento y control del pH y potencial de óxido-reducción se realizó de la manera anteriormente descrita (punto 2.7), utilizando para los reactores estériles electrodos nuevos y trabajando bajo condiciones estériles para evitar que éstos se contaminaran con bacterias de los otros reactores, los inoculados y el autóctono.

El seguimiento de la concentración de los iones ferrosos en la solución, se hizo espectrofotométricamente midiendo a 510 nm la absorbancia del complejo de hierro ferroso (Fe^{2+}), formado con la orto-fenantrolina en medio ácido, en un espectrómetro UV-Visible marca GBC modelo Cintra 5.

También se monitoreó el crecimiento de bacterias en los sistemas, esto se hizo debido a la importancia que éstas tienen en el proyecto, ya que dependiendo de la cantidad de bacterias, el proceso se llevará a cabo de una mejor manera y para evaluar el crecimiento y la evolución de éstas de un pase a otro.

El seguimiento del crecimiento de las bacterias de todas las muestras se realizó en una cámara Neubauer de $1/400\text{ mm}^2$ y 0.1 mm de profundidad, cuantificando la concentración de células directamente sobre muestras de los licores de biolixiviación de los sistemas, por conteo directo en un microscopio óptico con sistema de contraste de fases marca Leica modelo DME.

Es importante resaltar que el estudio se hizo para cada una de las diferentes cepas (Cananea, Nochebuena, Candameña y Tayahua), realizando para cada una de ellas 3 pases de adaptación, los dos primeros pases tuvieron una duración de 15 días y el último de 40 días, el cual fue considerado como estudio de biolixiviación para obtener los datos de la

cinética de extracción de las bacterias ya que como se dijo anteriormente con tres pases las bacterias quedaban perfectamente adaptadas.

Para los sistemas que fueron esterilizados y para el sistema autóctono sólo se hizo un pase con una duración de 60 días el cual fue considerado como estudio de biolixiviación.

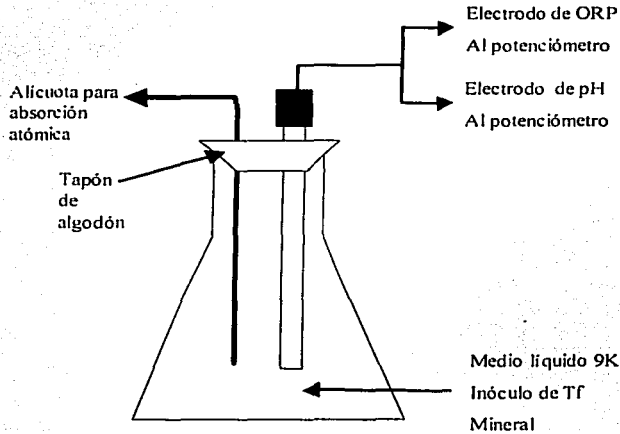


Figura 5. Diagrama de un reactor con agitación orbital.

2.9 Estudio de biolixiviación del mineral en reactor con agitación mecánica con la cepa Nochebuena.

Después de haber adaptado las bacterias de la cepa Nochebuena al mineral, a la agitación orbital y realizado los estudios de biolixiviación de éste se procedió a realizar la lixiviación en un reactor de mayor volumen (figura 6), inoculando 3 litros de una pulpa mineral al 10 % en sólidos, con un 5% de la cepa Nochebuena, del cual se realizaron dos pases para lograr que las bacterias se adaptaran a la agitación mecánica y el tercer pase para obtener los datos de biolixiviación del mineral.

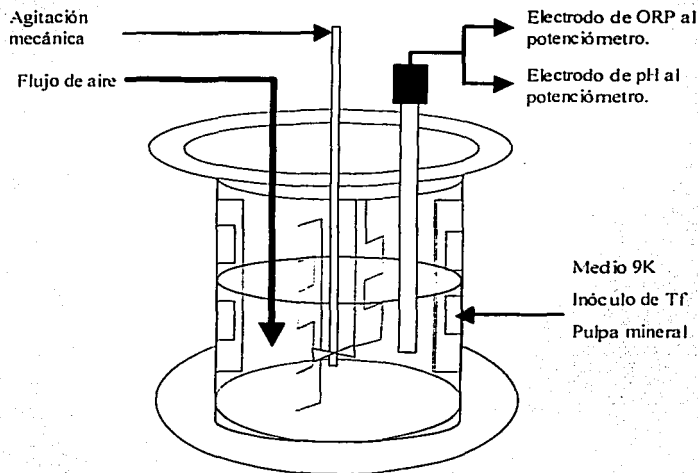


Figura 6. Diagrama del reactor

CAPÍTULO III

3. Resultados y discusión.

3.1 Caracterización de la muestra.

En este trabajo se utilizó una muestra de concentrado de flotación proporcionado por la Cía. Mexicana Minera de Avino S. A. de C. V. La caracterización de la muestra se realizó en el Centro Experimental Tecamachalco (Consejo de Recursos Minerales), mediante el convenio UNAM-CRM.

3.1.1 Caracterización química

La composición química de la muestra fue la siguiente:

Elemento	S (%)	Cu (%)	Fe (%)	Zn (%)	Au (g/t)	Ag (g/t)
Muestra	27.64	29.50	17.11	1.54	32.12	6479

Los elementos anteriores se determinaron mediante la utilización de las siguientes técnicas:

Elemento	S	Cu, Fe, Zn	Au, Ag
Técnica	Gravimetría	Absorción atómica	Ensayo al fuego (copelación)

3.1.2 Estudio de fluorescencia de rayos X (FRX) y de difracción de rayos X (DRX).

Los análisis de FRX realizados nos permiten conocer de forma semicuantitativa la composición elemental de las muestras, y la DRX nos permite identificar las especies minerales presentes en la muestra.

Los elementos y especies minerales cristalinas identificados por estas técnicas, se anotan a continuación:

Fluorescencia de rayos X		Difracción de rayos-X
Elementos químicos detectados.	Proporción estimada (1)	Especies minerales cristalinas determinadas.
S Fe, Cu, Si Pb, Zn, Al, Bi, Ag Ca, Cd, Ti, K, As Ba, Mo	Mayor Mediana Menor Mínima Trazas	Calcopirita, Pirita, Cuarzo, Esfalerita, Galena Digenita, Caolinita

(1) Proporción estimada

Intervalo de concentración

Mayor	Más de	25.0 %
Mediana	10.0 a	25.0 %
Menor	1.0 a	10.0 %
Escaso	0.1 a	1.0 %
Mínimo	0.01 a	0.1 %
Trazas	Menor a	.01 %

Nota: las proporciones reportadas en fluorescencia no aplican en difracción

3.1.3 Caracterización minerográfica.

El análisis al microscopio óptico de luz reflejada se realizó para tener información acerca de la distribución de valores.

La muestra presenta altas cantidades de cobre en una gran variedad de mineralización, también se observa alta cantidad de pirita 5 al 25 %, la cual se encuentra en forma liberada y es reemplazada a través de toda su superficie principalmente por Calcocita. Otros minerales identificados pero en menor proporción son Galena PbS, Esfalerita ZnS, Bismutita Bi₂S₃, Cuprobismutita 3Cu₂S · Bi₂S₃, Cobre nativo Cu y Hematita Fe₂O₃.

Entre los componentes principales se identificaron los siguientes minerales:

Pirita (FeS₂).- Se observan partículas libres (60%), está reemplazada a través de toda su superficie y fisuras por Calcocita (Cu₂S) (38%), en mucho menor proporción se observa asociada a Cuarzo e intercrecida con Calcopirita (CuFeS₂).

Calcopirita (CuFeS₂).- Está presente en partículas liberadas (58%), es reemplazada a través de toda su superficie y fisuras por Bornita (Fe₅CuS₄), Calcocita (Cu₂S) y en menor cantidad Covelita (CuS) (40%), escasamente se encuentra intercrecida con Esfalerita (ZnS) y Pirita (FeS₂).

Galena (PbS).- Es muy escasa y en general se presenta liberada.

Esfalerita (ZnS).- Es tan escasa como la Galena, se encuentra libre e intercrecida con Calcopirita (CuFeS₂), presenta exsoluciones de tipo emulación homogéneamente diseminadas de Calcopirita con tamaños menores a 4 micrómetros.

Bismutita (Bi₂S₃).- Generalmente se encuentra reemplazada a través de toda su superficie por Cuprobismutita (3Cu₂S.Bi₂S₃), también se observó intercrecida con Calcopirita y en forma liberada, está en proporciones similares a la Cuprobismutita.

Cuprobismutita (3Cu₂S.Bi₂S₃).- Reemplaza a través de toda su superficie a la Bismutita (Bi₂S₃), asociada a la Calcopirita (CuFeS₂), es reemplazada por Calcocita (Cu₂S) y Digenita (Cu₉S₅).

Argentita (Ag₂S).- En general se encuentra en forma liberada con tamaños que varían de 6 a 106 μm y está en proporción menor a la Bismutita (Bi₂S₃), también se encuentra en mucho mayor proporción que la Plata nativa.

Plata nativa (Ag).- Además de estar liberada, se encuentra asociada a la Hematina. Se sospecha la presencia de plata en la especie mineral Cuprobismutita 3Cu₂S. Bi₂S₃.

Oro nativo (Au).- Se presenta rellenando huecos en Pirita FeS₂ y liberado con tamaños que varían de 6 a 14 μm.

Cabe resaltar que las concentraciones tanto de Oro como de Plata son muy elevadas y que la Plata fue confirmada mediante el análisis de fluorescencia de rayos X.

Entre los componentes secundarios se identificaron los siguientes:

Calcocita (Cu₂S).- Se encuentra liberada (45%), reemplaza a través de todos sus bordes y fisuras a la Calcopirita (CuFeS₂), a la Pirita (FeS₂) (45%) y en mucho menor proporción a la Bornita (Fe₃CuS₄), es reemplazada por Hematita (Fe₂O₃).

Covelita (CuS).- Se encuentra liberada (60%) y reemplaza a la Calcocita (Cu₂S) y a la Bornita (Fe₃CuS₄) (16%) a través de su superficie.

Bornita (Fe₃CuS₄).- Más escasa que la Covelita (CuS) con tamaños que varían de 2 a 40 μm, se presenta principalmente reemplazando a la Calcopirita a través de sus bordes y es reemplazada por Covelita (CuS) y Calcocita (Cu₂S) por toda su superficie.

Hematita (Fe₂O₃).- Más escasa que la Bornita (Fe₃CuS₄), se encuentra en su mayoría reemplazando a la Calcocita (Cu₂S) a través de toda su superficie, rellena huecos en Cuarzo, algunas veces está liberada, asociada a Cobre (Cu) y Plata (Ag) nativos.

Cobre nativo (Cu).- Es muy escaso, se presenta liberado, asociado a Cuarzo y Hematita (Fe₂O₃) con tamaños que varían de 2 a 40 micrómetros.

Digenita (Cu₉S₄).- Está en proporción menor que la Calcocita (Cu₂S), se presenta liberada y reemplaza a la Pirita (FeS₂) a través de toda su superficie.

3.2 Reactivación de cepas.

A continuación se muestra en las gráficas los resultados obtenidos en los 5 pases sucesivos realizados para la reactivación de cada una de las 4 diferentes cepas

Thiobacillus ferrooxidans utilizadas, comparándolas con el sistema testigo.

En la gráfica 1 se representa la evolución del potencial de óxido-reducción en función del tiempo, en la gráfica 2 la evolución del consumo de Fe (II) y en la gráfica 3 la evolución del pH.

3.2.1 Comportamiento del potencial de óxido-reducción (ORP).

En la gráfica 1 se muestra el comportamiento del potencial de óxido-reducción para cada una de las cepas utilizadas (Cananea, Nochebuena, Candameña y Tayahua) y para las cuales se realizaron 5 pases sucesivos. Las curvas de las gráficas a, b, c, y d muestran la misma tendencia. En el primer pase observamos que el potencial aumenta muy lentamente hasta el día 12 y después de este día aumenta rápidamente. En el pase 2 observamos que en general el potencial aumenta más rápidamente que en el primer pase y después del día tres, el potencial se incrementa rápidamente, para el tercer pase se observa que el potencial empieza a incrementarse desde el primer día, y podemos decir que después de este tercer pase las bacterias ya están perfectamente adaptadas ya que las curvas que representan los pases 3, 4 y 5 son prácticamente iguales.

Es importante observar en estas curvas que el tiempo de reactivación disminuye en cada pase, el primer pase fue de 16 días, el segundo de 8 días y el 3, 4 y 5 sólo de 4 días.

El aumento en el potencial se debe a la oxidación del ion ferroso a férrico, catalizada por la bacterias, es decir, es función de la razón Fe^{3+} / Fe^{2+} que tiende a hacerse mayor.

Utilizando la ecuación de Nernst para explicar esta evolución del potencial y considerando la siguiente reacción:



Tendremos que el potencial del sistema estará definido de la siguiente manera;

$$E = E^0 + \frac{2.303RT}{nF} \text{Log} \left[\frac{Fe^{3+}}{Fe^{2+}} \right]$$

Donde:

E, es el potencial del sistema.

E^0 , es el potencial estándar del par Fe^{3+}/Fe^{2+} .

n, es el número de electrones intercambiados durante la reducción.

F, es la constante de Faraday.

R, constante universal de los gases.

T, es la temperatura absoluta del sistema.

$[Fe^{3+}]$ y $[Fe^{2+}]$, son las concentraciones de los iones férrico y ferroso respectivamente.

Sustituyendo los valores correspondientes obtenemos la ecuación:

$$E = 0.77 + 0.059 \text{Log} \left[\frac{Fe^{3+}}{Fe^{2+}} \right]$$

Con lo que podemos observar claramente que el potencial del sistema es directamente proporcional a la razón $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$, por lo que al disminuir el valor de la concentración de Fe (II) y aumentar el valor del ion Fe(III), aumentará el potencial del sistema.

En la gráfica 1, se observa claramente el efecto catalítico de la bacteria en la oxidación del ion ferroso, ya que comparando los sistemas inoculados con un sistema testigo, se puede observar que el potencial en el sistema testigo prácticamente se mantiene constante alrededor de 350 mV, mientras que en los sistemas inoculados con las diferentes cepas éste aumenta más rápidamente, alcanzando valores cercanos a los 550 mV.

3.2.2 Comportamiento de la concentración de los iones Fe (II).

En la gráfica 2 observamos un aumento en la velocidad con que se consumen estos iones conforme las bacterias se adaptan a las condiciones del sistema (medio nutriente, agitación orbital, temperatura y pH). Estas curvas (gráfica 2), además de representar el consumo del ion ferroso en los sistemas, también son indicativas del crecimiento en la población de bacterias, ya que al aumentar la población de bacterias consumen más Fe^{2+} y la concentración de éste disminuye.

Esto se debe principalmente a que la transformación del ion ferroso a férrico es la principal fuente de energía de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*, por lo que al aumentar el número de bacterias en la solución la demanda del Fe^{2+} , y por tanto su consumo aumenta.

Otro punto importante en la observación de estas gráficas es la remarcada diferencia en la velocidad del consumo de Fe^{2+} de los sistemas inoculados con las diferentes cepas de aguas de mina, respecto al sistema testigo, y de nueva cuenta observamos que mientras más adaptadas estén las bacterias a las condiciones del sistema, el tiempo de consumo total de Fe^{2+} disminuye, por lo que el potencial aumenta rápidamente como se observa en la gráfica 1.

3.2.3 Comportamiento del pH.

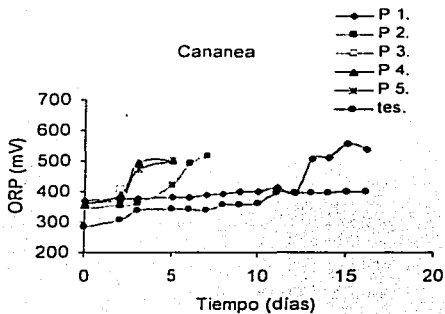
En la gráfica 3 se representa el comportamiento del pH para cada uno de los cultivos respecto al sistema testigo.

Todas las cepas presentan el mismo comportamiento, en los sistemas se observa al inicio un decremento en el valor de pH, seguido de un pequeño aumento y posteriormente un descenso en el valor de nuestra variable, lo cual se explica de la siguiente manera.

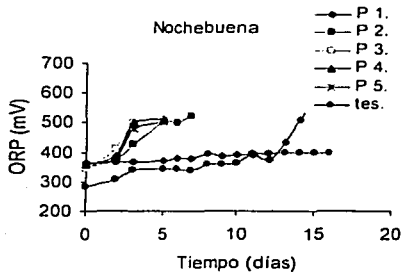
Como se mencionó en la parte experimental, el pH del medio de cultivo se ajustó a un valor de 2.0. finalmente se realizó la inoculación en cada uno de los sistemas. Posteriormente se dejó acondicionando (3 horas) para que el sistema fuera controlado por la acción bacteriana. En todos los sistemas al transcurrir el tiempo de adaptación el valor de pH fue mayor a 2.0, por lo que se tuvo que ajustar a 2.0, hasta que las bacterias controlaran el sistema y generaran H_2SO_4 .

Una vez que las bacterias se adaptaron al medio de cultivo y a las demás condiciones del sistema, comenzó la disminución en el valor de pH ya que como se mencionó anteriormente comienzan a generar H_2SO_4 por sí solas y controlan el sistema, de acuerdo con la siguiente reacción.

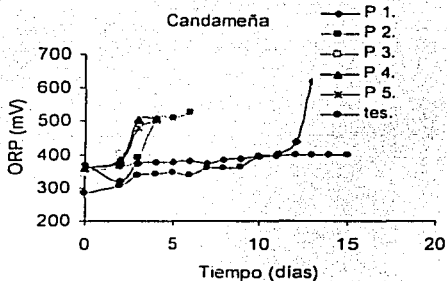




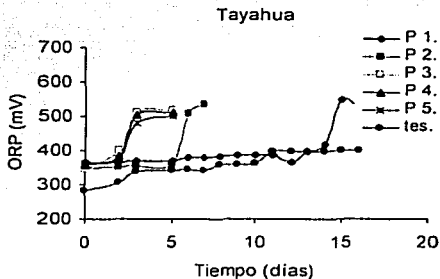
(a)



(b)

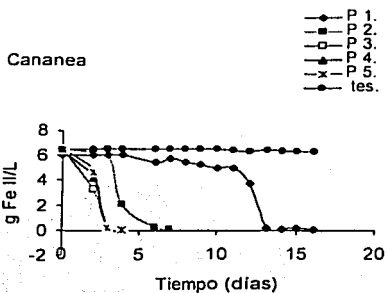


(c)

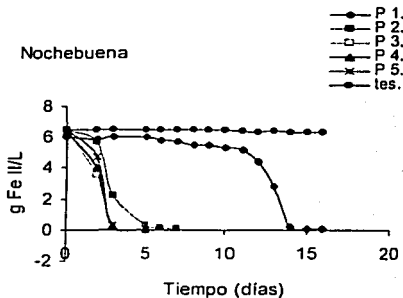


(d)

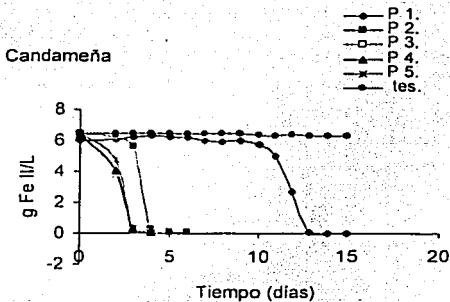
Gráfica 1 (a, b, c, d). Evolución del potencial de óxido-reducción para cada cepa.



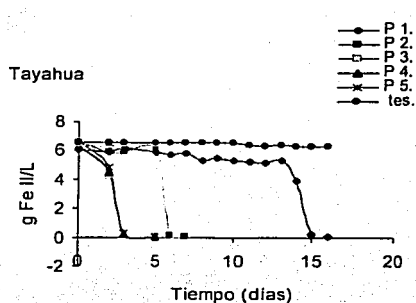
(a)



(b)

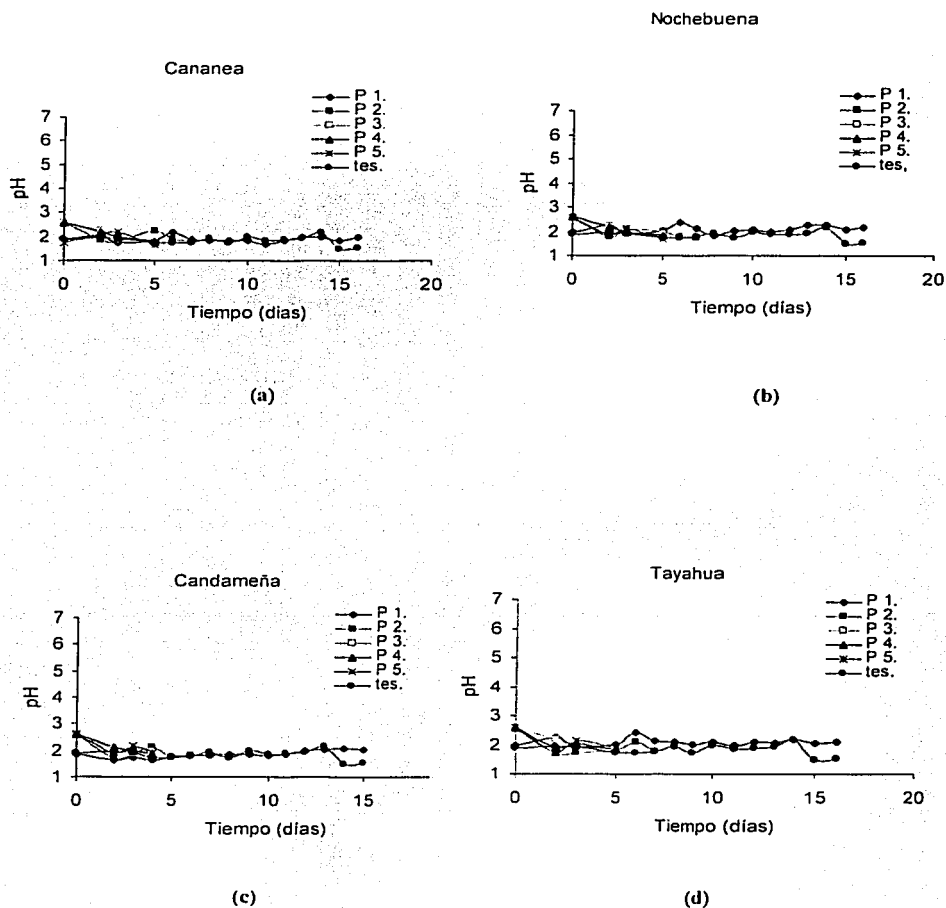


(c)



(d)

Gráfica 2 (a, b, c, d). Evolución del consumo de Fe (II) para cada cepa.



Gráfica 3 (a, b ,c, d). Evolución del pH para cada cepa.

3.2.4 Ceba Nochebuena.

Para poder observar el comportamiento de las variables de control de una mejor manera y reafirmar lo dicho en los puntos anteriores, y tomando en cuenta que los comportamientos de estas variables en las diferentes cepas son similares, en la gráfica 4 se muestran los resultados del tercer pase de adaptación de la cepa Nochebuena comparada con el sistema testigo.

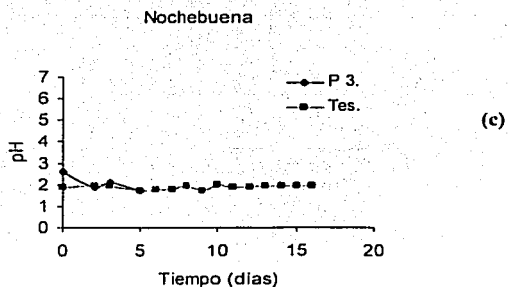
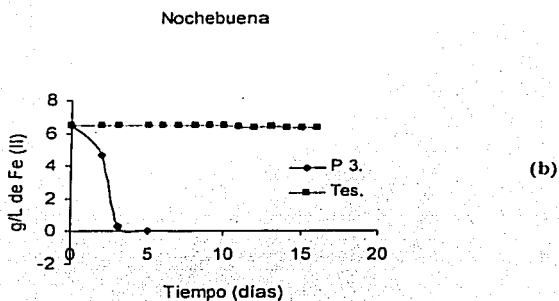
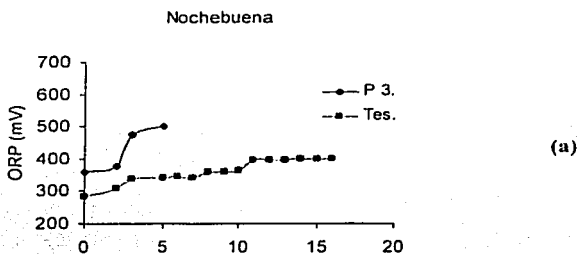
En la gráfica 4 (a) se observa una marcada diferencia en el valor del potencial de los dos sistemas, mientras que en el sistema inoculado, el valor del potencial llega a un valor de 510 mV en 4 días, empezando a incrementarse rápidamente desde el primer día; en el sistema testigo, observamos que desde el inicio el valor del potencial es más bajo comenzando a incrementarse de manera rápida hasta el tercer día, posteriormente el aumento se vuelve más lento, alcanzando un máximo en 380 mV en 16 días. Con lo que se confirma la participación de las bacterias en el proceso, catalizando la oxidación de Fe^{2+} , ya que el potencial depende de la relación $[Fe^{3+}/Fe^{2+}]$.

En la gráfica 4(b) se muestra la variación de la concentración de los iones Fe^{2+} en el sistema inoculado y un sistema testigo. Observamos que en el sistema inoculado el consumo de los iones Fe^{2+} se lleva a cabo rápidamente, lo cual nos confirma dos puntos importantes, el primero es la participación catalítica de las bacterias en el proceso de oxidación de $Fe(II)$, y el segundo es que se tiene una población importante de bacterias, las cuales se encuentran perfectamente adaptadas al sistema. La curva que representa el sistema testigo, sin bacterias, muestra que la concentración de Fe^{2+} permanece prácticamente constante hasta el día que se retiró la muestra, no se observa oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y por tanto se puede observar que no hay actividad bacteriana.

Analizando la gráfica 4(c), observamos que el pH del sistema testigo no presenta variaciones importantes a lo largo de los 16 días que se estudió la muestra, mientras que

en la muestra que fue inoculada se aprecia que el valor de pH en el primer día es mayor de 2.0. por lo cual se tuvo que ajustar de nuevo, lo que nos habla de una actividad bacteriana desde el primer día tomando rápidamente control del sistema, esto también nos indica que las bacterias ya están perfectamente adaptadas.

Comparando los sistemas inoculados con el sistema testigo observamos que para lograr una buena adaptación de los microorganismos a nuestro medio utilizado es suficiente realizar tres pases sucesivos, tardando el último pase no más de 4 días.



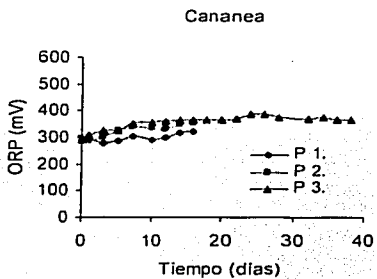
Gráfica 4 (a, b, c). Evolución de los parámetros de biofixiación del pase 3 con la cepa Nochebuena.

3.3 Estudios de biolixiviación del mineral en incubadora.

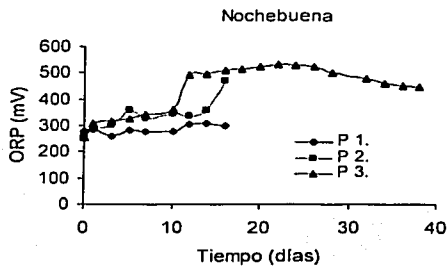
En las gráficas (5-10) se presentan y discuten los resultados de biolixiviación de las 4 cepas y los tres pases sucesivos realizados para cada una de ellas, posteriormente en las gráficas (10-19) se presenta y discute el estudio de biolixiviación con la cepa Nochebuena correspondiente al tercer pase de adaptación.

3.3.1 Potencial de óxido-reducción (ORP).

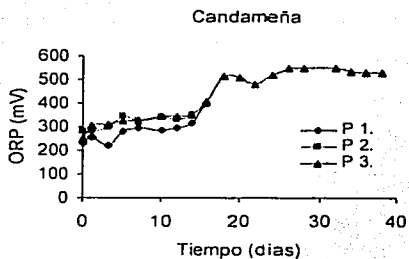
En la gráfica 5 se presentan los resultados del comportamiento del potencial de las diferentes cepas en presencia de mineral, en donde se observa lo siguiente. El valor del potencial aumenta lentamente hasta aproximadamente el día 15 con lo que podemos decir que las bacterias están en un proceso de adaptación o fase lag en estos primeros 15 días, una vez que se adaptaron al medio, el potencial aumenta más rápidamente. Este aumento en el potencial es debido a la disminución de la concentración de Fe^{2+} y la generación de Fe^{3+} catalizada por las bacterias. Es importante resaltar que los valores de potencial al cambiar de un pase a otro son más altos, lo cual también indica la mejor adaptación y el aumento en el número de bacterias.



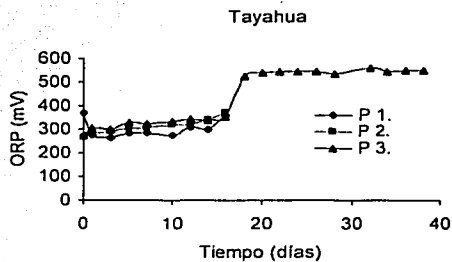
(a)



(b)



(c)

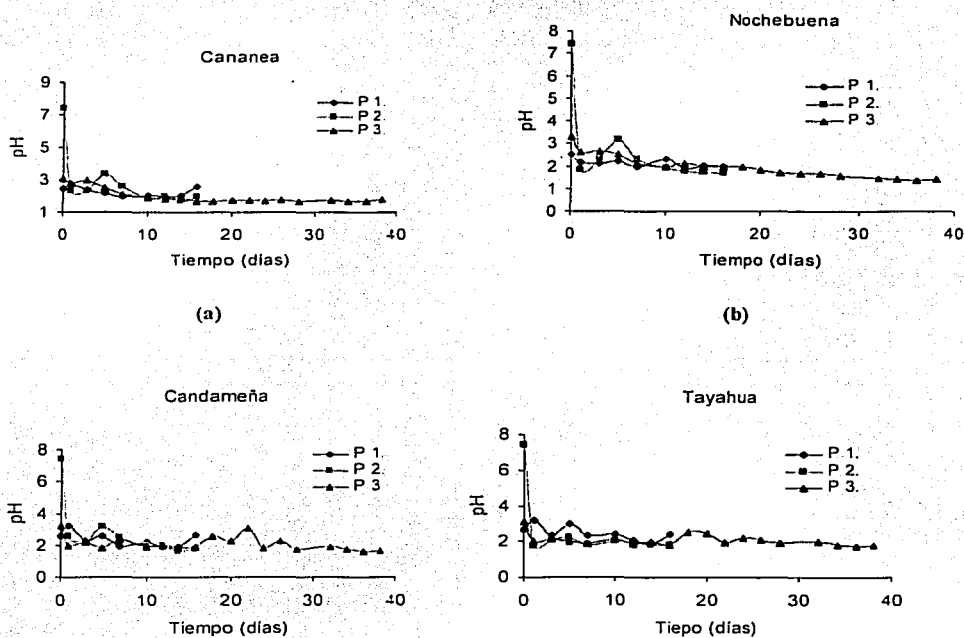


(d)

Gráfica 5 (a, b, c, d). Evolución del ORP para las diferentes cepas en presencia de mineral.

3.3.2 Comportamiento del pH.

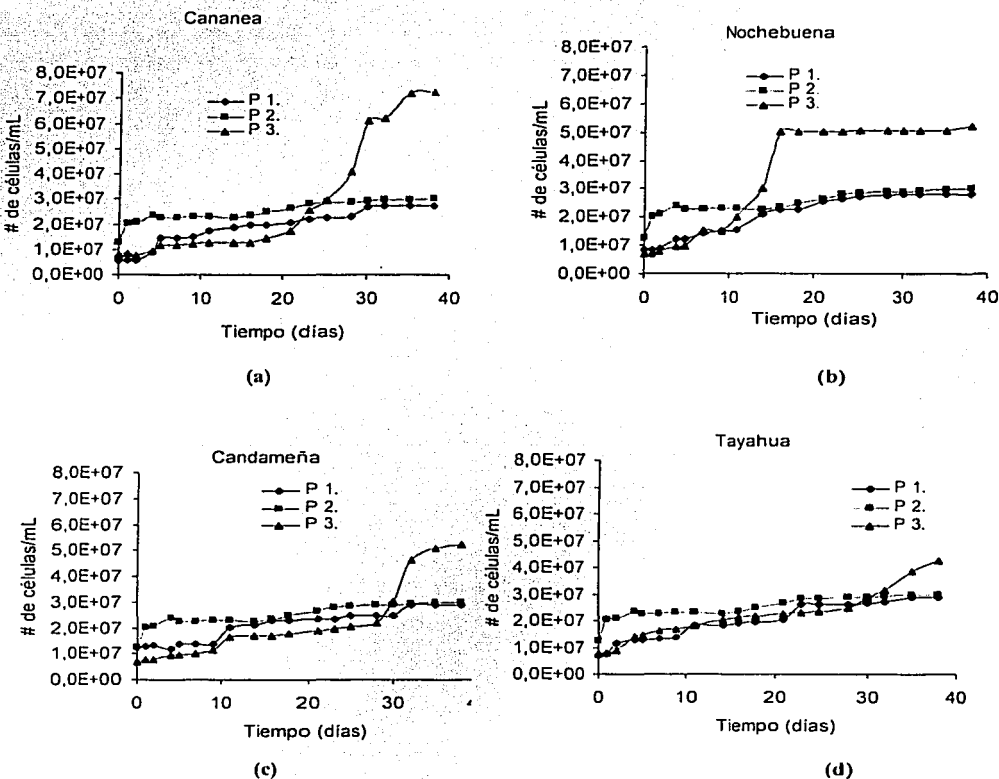
La gráfica 6 muestra el comportamiento del pH, para cada una de las cepas en estudio. En las cuatro gráficas se observa nuevamente la misma tendencia, pequeñas variaciones al inicio del experimento debido al desarrollo de equilibrios de hidrólisis entre el mineral y el medio, pero aproximadamente a partir del día 12 se observa que el pH del sistema comienza a ser controlado por los microorganismos disminuyendo sobre todo en los casos a y b.



Gráfica 6 (a, b, c, d). Evolución del pH para las diferentes cepas en presencia de mineral.

3.3.3 Crecimiento celular.

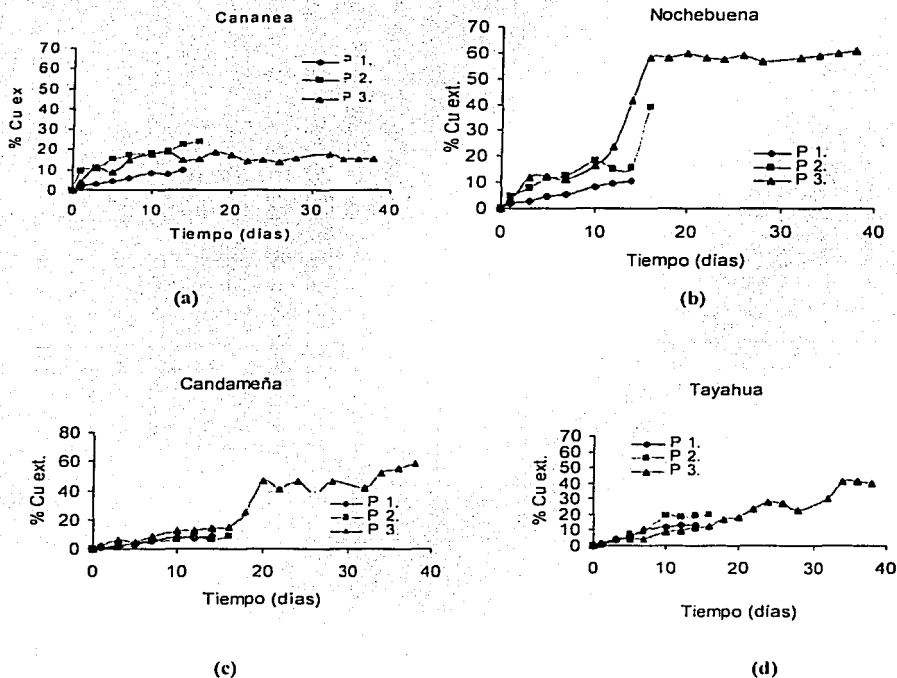
En la gráfica 7 se presentan los resultados del crecimiento en el número de bacterias. En esta se observa para cada una de las cepas la misma tendencia, un aumento en la población de bacterias conforme pasa el tiempo, pero además una mayor velocidad de crecimiento de un pase a otro lo cual confirma que han tenido una adaptación favorable.



Gráfica 7 (a, b, c, d). Evolución del # de células/mL para las cuatro diferentes cepas en presencia de mineral.

3.3.4 Extracción de cobre.

Una vez realizada la adaptación de los microorganismos al mineral se realizaron los estudios cinéticos de biolixiviación de Cu. La gráfica 8 muestra los porcentajes de extracción de cobre para cada una de las cepas y para los tres pases realizados en cada una de éstas, donde se puede observar que de un pase a otro los valores de extracción aumentan, lo cual indica que las bacterias tienen una adaptación favorable, y que las cepas tienen diferente comportamiento en la extracción de cobre

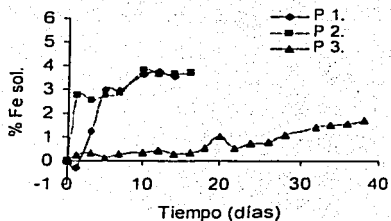


Gráfica 8 (a, b, c, d). Evolución de la extracción de Cu para las cuatro diferentes cepas en presencia de mineral.

3.3.5 Disolución de Fe.

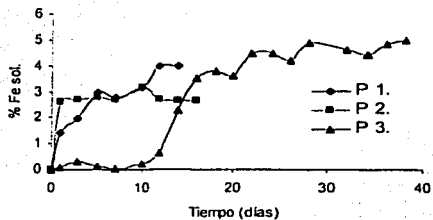
En la gráfica 9 están representados los resultados de la extracción de Fe, en ella se observa que el porcentaje máximo de hierro en solución es del 5 %, para todos los países y para las diferentes cepas.

Cananea



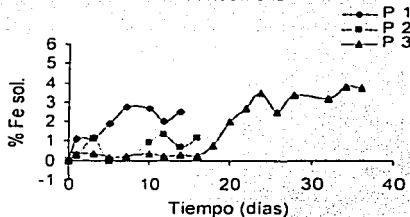
(a)

Nochebuena



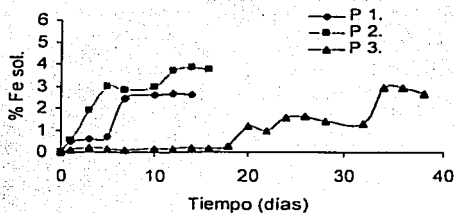
(b)

Candameña



(c)

Tayahua

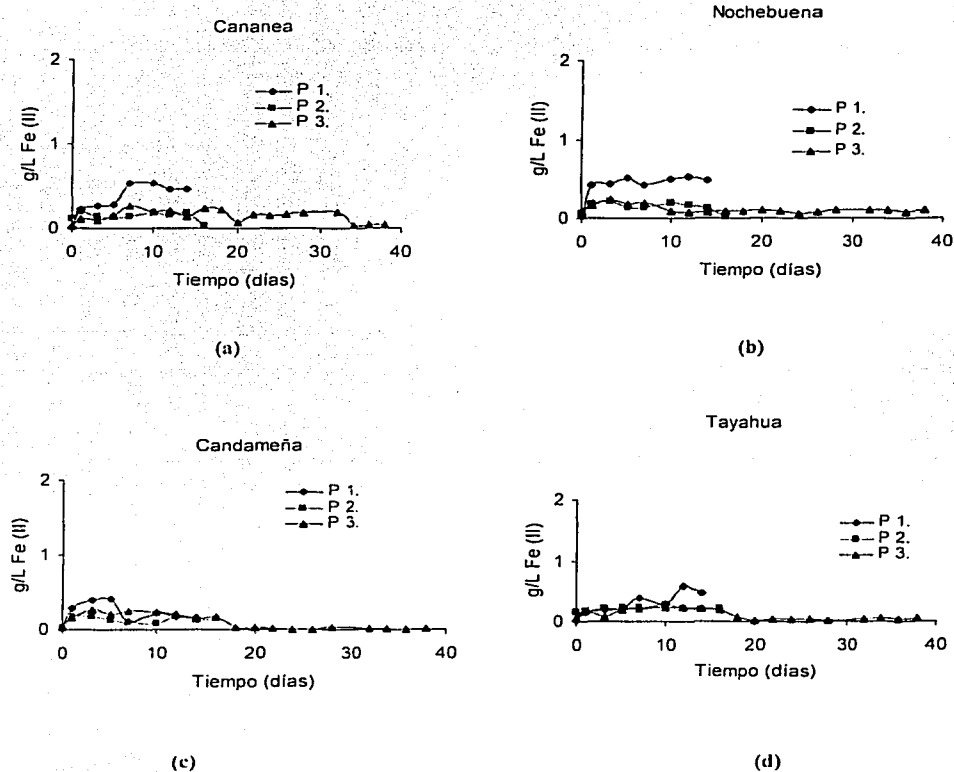


(d)

Gráfica 9 (a, b, c, d). Evolución del % de Fe en solución para las cuatro diferentes cepas en presencia de mineral.

3.3.6 Concentración de Fe (II).

La gráfica 10 muestra los resultados del análisis de Fe (II), obsérvese que de un pase a otro la concentración de Fe (II) presente en la solución disminuye, lo cual indica un aumento en la población de bacterias, y una mejor adaptación de éstas al sistema.



Gráfica 10 (a, b, c, d). Evolución de la concentración de Fe (II) para las cuatro diferentes cepas en presencia de mineral.

3.3.7 Biolixiviación del mineral con la cepa Nochebuena.

En el punto anterior se presentaron los resultados de forma general para las distintas cepas y los tres pases de adaptación al mineral en cada una de ellas, por lo que a continuación se analizan los resultados de la cinética de biolixiviación del mineral correspondiente al tercer pase de la cepa Nochebuena, comparándolos con los de la cepa autóctona del mineral, obtenida por eutrofización de éste con medio 9K, a pH 2.0, así como con los sistemas estériles, uno en presencia de timol (E con T) y otro en ausencia de timol (E sin T).

3.3.7.1 pH.

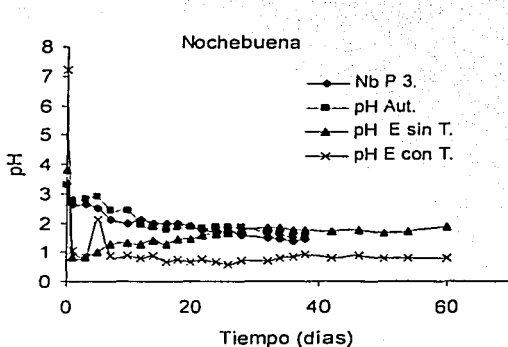
En la gráfica 11 se observa la evolución del pH de los sistemas anteriores, la curva correspondiente a la cepa Nochebuena muestra que a partir del día 6, el pH decrece por lo cual se puede decir que los primeros días fueron de adaptación tanto de las bacterias al mineral como de éste al medio y que después de este tiempo la actividad bacteriana aumenta controlando el pH del sistema.

Analizando la curva que representa al sistema autóctono, se observa la misma tendencia, sin embargo la pequeña diferencia entre los valores de pH indica que las bacterias que controlan este sistema no son las mismas, sino evidentemente una cepa autóctona propia del mineral, por otro lado el pH de los sistemas estériles permanece constante.

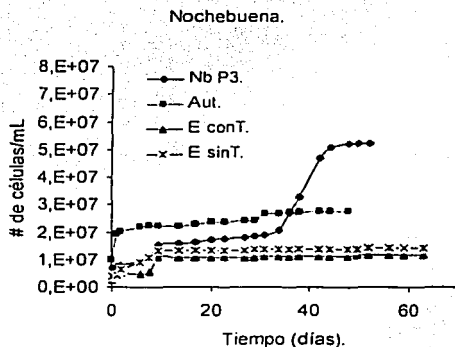
3.3.7.2 Crecimiento celular.

En la gráfica 12 se presentan los resultados del crecimiento bacteriano del tercer pase de la cepa Nochebuena respecto a la cepa autóctona y a los sistemas estériles, observándose que el crecimiento de bacterias es mejor en la cepa Nochebuena que en la

cepa autóctona, lo cual nos confirma que las bacterias de la cepa Nochebuena están bien adaptadas a las condiciones de biolixiviación del sistema, es importante observar que las bacterias autóctonas a pesar de estar presentes en menor cantidad alcanzan la misma efectividad en el proceso de biolixiviación de cobre (% de extracción) aunque en un periodo de tiempo mayor, probablemente por falta de adaptación, ya que en los sistemas inoculados primero se hicieron tres pases de reactivación y posteriormente tres pases de adaptación al mineral, mientras que para el sistema autóctono sólo se realizaron los tres pases con mineral.



(11)



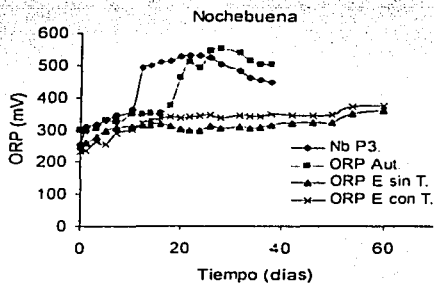
(12)

Gráfica 11. Evolución del pH de las cepas Nochebuena, autóctona (con mineral) y de los sistemas estériles con timol (E con T) y sin timol (E sin T).

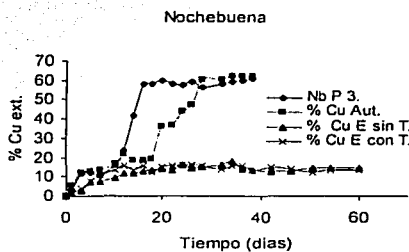
Gráfica 12. Evolución del crecimiento de bacterias de las cepas Nochebuena, autóctona (con mineral) y de los sistemas estériles con timol (E con T) y sin timol (E sin T).

3.3.7.3 Potencial de óxido-reducción (ORP) y extracción de Cu.

La gráfica 13 muestra los resultados del potencial de óxido-reducción y los resultados de la cinética de extracción de cobre con la cepa Nochebuena. Analizando conjuntamente las curvas a y b se puede decir que los primeros días además de la adaptación, existe, en presencia de pocas bacterias un ataque de éstas a los sulfuros secundarios del mineral y al terminar esta etapa de adaptación y de disolución de sulfuros secundarios, los microorganismos comienzan el ataque a la calcopirita. Es importante observar que el tiempo para obtener el mismo porcentaje de extracción de cobre entre los microorganismos adaptados mediante tres pases sucesivos y los autóctonos no adaptados disminuye notablemente con los primeros. También en las gráficas se observa que a partir del día 15 aproximadamente, el porcentaje de extracción y el potencial se mantienen constantes, lo cual podría ser a causa de una recalitrancia en el mineral producida por la precipitación sobre la superficie del mineral de algunos compuestos de hierro o de azufre, lo cual evita que la calcopirita continúe siendo atacada por los microorganismos y el medio ácido, pasivándola⁽¹⁰⁾.



(a)



(b)

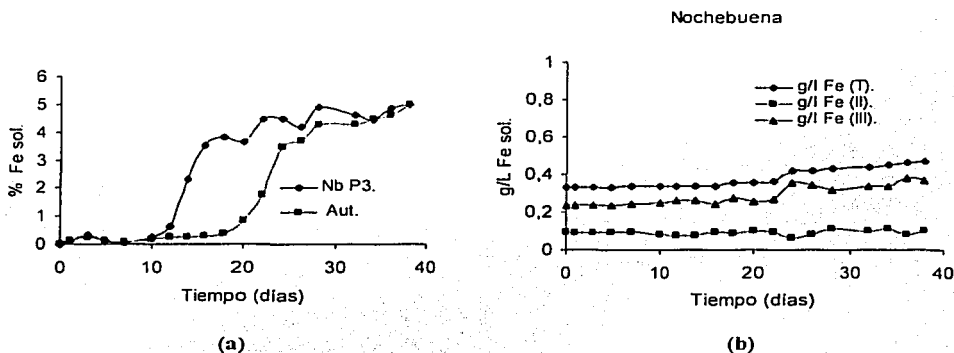
Gráfica 13 (a, b). Evolución del ORP y de la extracción de Cu con las cepas Nochebuena y autóctona (con mineral) y de los sistemas estériles con timol (E con T) y sin timol (E sin T)

3.3.7.4 Disolución de Fe y concentración de Fe total, Fe (II) y Fe (III).

En la gráfica 14 (a) se presentan los resultados del porcentaje de extracción de Fe. En esta gráfica se evidencia la disolución de la calcopirita para los dos sistemas, con la cepa Nochebuena y con la cepa autóctona.

En la gráfica 14(b) se representan las concentraciones en g/L de Fe (T), Fe (II) y Fe (III) de la cepa Nochebuena. Con lo que se puede explicar lo siguiente, hemos hablado en los puntos anteriores de la importancia que tiene en este proceso la relación Fe^{3+}/Fe^{2+} , ya que de ésta depende prácticamente la eficacia del proceso de biolixiviación. Analizando la gráfica 14 (b) se observa que, la concentración de Fe (II) disminuye a medida que el tiempo aumenta, lo cual significa que las bacterias cada vez son más y la demanda de Fe (II) por las bacterias aumenta por lo que se consume más rápido, produciendo Fe (III), por lo que la concentración de éste aumenta como lo muestra la gráfica.

Por otro lado, observando las curvas de Fe (II) y (III), pasando la etapa de lixiviación que es aproximadamente hasta el día 24, las dos curvas se vuelven prácticamente constantes, es decir ya no disminuye ni aumenta respectivamente, con lo que podemos decir que los dos se consumen y forman a la misma velocidad, debido a la recalcitrancia del material ya mencionada.



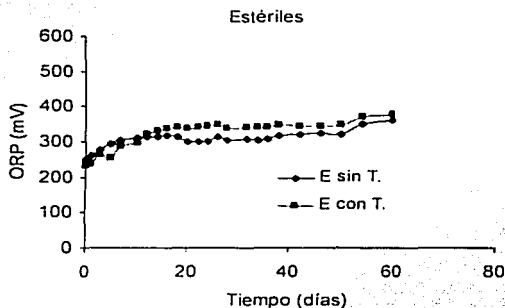
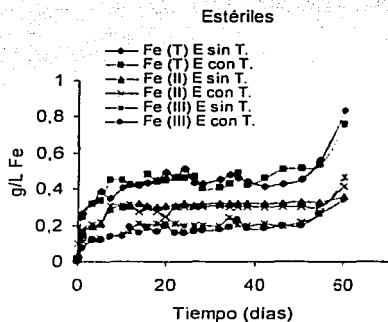
Gráfica 14 (a). Disolución de Fe con las cepas Nochebuena y autóctona (con mineral). Gráfica 14 (b). Concentración de Fe total, Fe (II) y Fe (III) con la cepa Nochebuena (con mineral).

3.3.7.5 Sistemas estériles.

Conjuntamente con las gráficas de resultados de la biolixiviación del mineral con la cepa Nochebuena, se han presentado los resultados de los dos sistemas en condiciones estériles, los cuales se prepararon de la forma ya descrita en la parte experimental (punto 2.7), recordando que a uno de estos sistemas se le agregó timol (bactericida) para eliminar aún mejor las bacterias. Obsérvese en las gráficas 11, 12 y 13, respectivamente que los valores de pH, # de células/mL, ORP y porcentaje de extracción de Cu en los cultivos estériles son siempre más bajos que los de la cepa Nochebuena, lo cual confirma que las bacterias tienen una participación fundamental en el proceso de lixiviación, en este caso, de un mineral de cobre.

Hemos afirmado en puntos anteriores que al existir una cantidad importante de bacterias en el sistema, la demanda de las bacterias por el Fe (II) aumenta, por lo que la concentración de Fe (II) proveniente de las especies minerales que lo contienen,

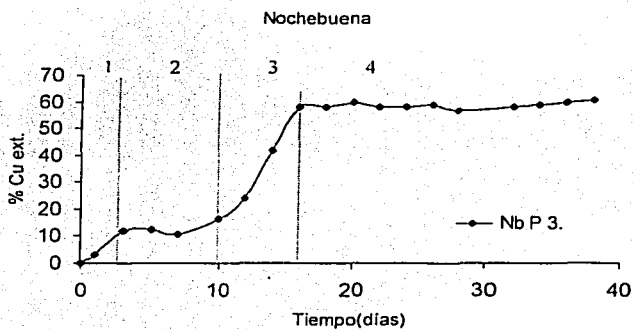
disminuye aumentando la concentración de iones Fe (III) debido a la oxidación biológica de los iones ferrosos a férricos. En la gráfica 15 (a) se muestran los resultados obtenidos de la evolución de la concentración del Fe, Fe (II) y Fe (III) en los sistemas estériles con timol y sin timol. Obsérvese que la concentración de Fe (II) es mayor que la concentración de Fe (III), lo cual explica que la población de bacterias sea muy pequeña por lo que la demanda de Fe (II) al ser también baja, tiene como consecuencia una conversión de Fe (II) a Fe (III) muy pequeña. Esto se puede confirmar observando la gráfica de potencial 15 (b). En el punto (3.5.1) se dijo que el aumento en el potencial se debe principalmente a la oxidación catalizada por las bacterias, del ion ferroso a férrico, es decir el aumento de la razón Fe^{3+}/Fe^{2+} , al no haber una conversión de estos iones, esta razón permanece constante, por lo que el potencial permanece constante como se muestra en la gráfica 15 (b).



Gráfica 15 (a, b). Evolución de las concentraciones de Fe (T), Fe(II), Fe(III) y ORP de los sistemas estériles, en presencia de mineral.

3.3.7.6 Etapas de disolución de cobre.

Considerando los resultados de biolixiviación del mineral con la cepa Nochebuena correspondiente al tercer pase de adaptación, se proponen cuatro etapas de lixiviación de cobre, las cuales se muestran en la gráfica 16.



Gráfica 16. Etapas de biolixiviación de cobre con la cepa Nochebuena pase tres.

Etapa 1.

En esta etapa se lleva a cabo la disolución de sulfuros secundarios de cobre por ataque en medio ácido, mediante la siguiente reacción.



Este ataque se lleva a cabo muy rápidamente habiendo una disolución del 10 % de cobre, en esta etapa no hay Fe presente por lo que el Fe en solución es prácticamente cero, como se observa en la gráfica 17 y por otra parte el potencial que depende de la concentración de Fe (III), al no haber oxidación de Fe (II) debido a la ausencia de bacterias, no hay generación de ion férrico y el potencial permanece constante como se muestra en la primera etapa de las gráficas 17 y 18. En esta primera etapa (latencia) la

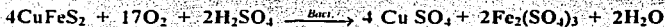
población de bacterias que fueron inoculadas se mantiene constante como se observa en la gráfica 19.

Etapa 2.

Esta segunda etapa, es un período de adaptación de los microorganismos al mineral, por lo que la población de bacterias comienza a crecer lentamente (ver gráfica 19), y al igual que en la etapa 1 en esta segunda etapa no hay Fe (II) disuelto, ya que el Fe sólo puede provenir de la calcopirita (CuFeS_2) y la pirita (FeS_2), que al no ser atacadas aún por los microorganismos éste no ha sido liberado, por lo que el potencial, Fe (T) en solución y la concentración de Fe (III) permanecen prácticamente constantes, como se puede observar en la etapa 2 de las gráficas 17 y 18 respectivamente.

Etapa 3.

En esta tercera etapa da inicio la lixiviación de la calcopirita catalizada por la acción de las bacterias que una vez adaptadas comienzan a atacarla, aumentando la extracción de Cu. Al comenzar el ataque de la calcopirita se comienza a liberar Fe (II) aumentando la concentración de éste en solución de acuerdo con la siguiente reacción.

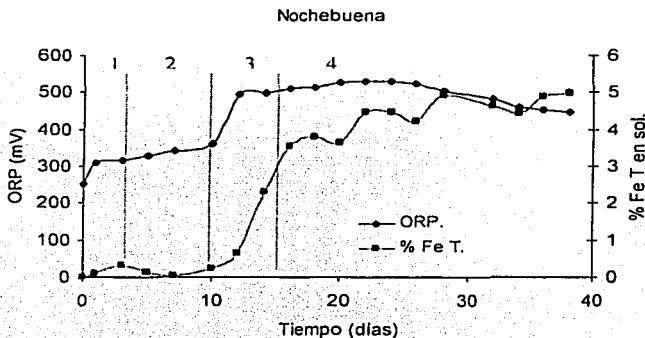


Al comenzar la liberación de Fe (II) y al comenzar la reproducción de las bacterias de manera rápida, empieza una demanda de éstas por el Fe (II) convirtiendo éste a Fe (III), por lo que el potencial del sistema comienza a incrementarse y la concentración de Fe (II) disminuye, como se muestra en la etapa 3 (fase lag o de crecimiento exponencial) de las gráficas 17, 18 y 19.

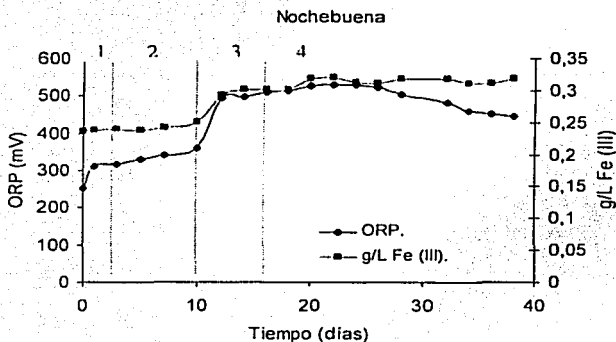
Etapa 4.

En este proceso de lixiviación existe una cuarta etapa, a la cual llamaremos pasivación, es una etapa en la cual, sobre la superficie del mineral, se depositan productos o compuestos de fierro o azufre que impiden que la calcopirita continúe

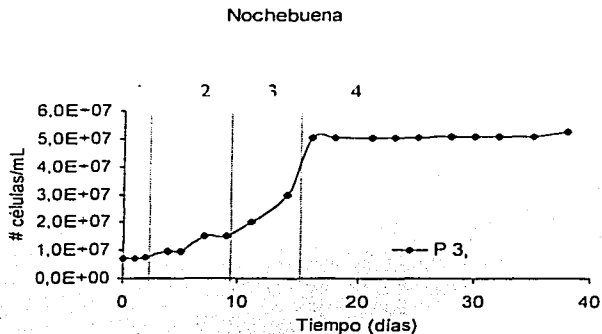
siendo atacada por las bacterias o por el ion férrico, al no ser atacada ya no se libera Fe (II). Por lo que las variables ORP, Fe (T) en solución y Fe(III) permanecen constantes. etapa 4 (etapa de crecimiento estacionario) de las gráficas 16, 17, 18 y 19.



Gráfica 17. Evolución de potencial óxido-reducción y % Fe en solución con la cepa Nochebuena fase tres.



Gráfica 18. Resultados del Potencial óxido-reducción y g/L Fe (III) con la cepa Nochebuena fase tres.



Gráfica 19. Resultados del crecimiento celular con la cepa Nochebuena pase tres.

3.4 Estudio de biolixiviación del mineral en reactor con agitación mecánica con la cepa Noche buena.

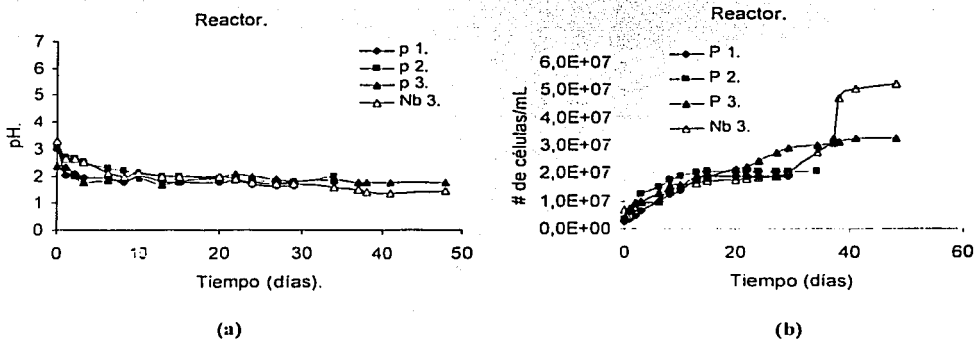
Después de haber realizado la adaptación de las bacterias al concentrado mineral en agitación orbital, a pH 2.0 y temperatura de 35 °C, se procedió a la simulación de un reactor a escala con agitación mecánica, con un volumen 30 veces mayor que los reactores en orbital, manteniendo la relación de 5% de sólidos y 10% de inóculo del cultivo Nochebuena ya que esta cepa fue la que mejores resultados presentó en la etapa anterior, a una temperatura de 35 °C. En esta etapa del trabajo se realizaron también 3 pases sucesivos, siendo el primero de 30 días, el segundo de 35 días y el último de 50 días. Los dos primeros pases se realizaron para adaptar a los microorganismos a la nueva variable (agitación mecánica) y el último para obtener datos del proceso de biolixiviación.

3.4.1 pH.

La gráfica 20 (a) muestra los resultados obtenidos de la evolución del pH del reactor agitado mecánicamente, para los tres pases sucesivos, referidos al tercer pase del cultivo Nochebuena en orbital, se observa que las bacterias estabilizan y controlan rápidamente el sistema, lo cual indica que al cambiar de sistema las bacterias ya estaban bien adaptadas al mineral.

3.4.2 Crecimiento celular.

La gráfica 20 (b) muestra la evolución del crecimiento de bacterias en el reactor, referido al tercer pase del cultivo Nochebuena en agitación orbital. Al igual que en el punto anterior se observa que de un pase a otro los microorganismos se van adaptando mejor a las condiciones del sistema aumentando la población de manera importante.



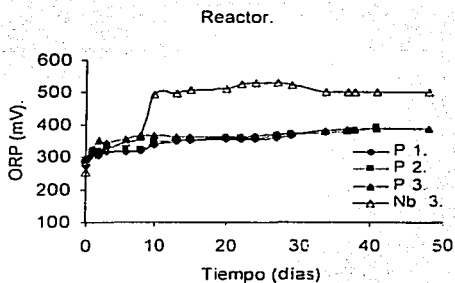
Gráfica 20. (a) Evolución del pH y (b) Evolución del crecimiento celular del reactor (escala).

3.4.3 Evolución del potencial de óxido-reducción (ORP) y de la extracción de cobre.

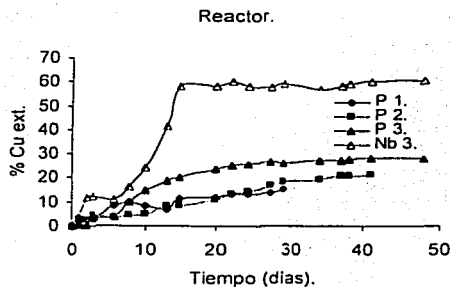
La gráfica 21 (a) muestra el comportamiento del potencial de óxido-reducción en el reactor. Se observa que el potencial no sufre cambios importantes de un pase a otro. Por otro lado, en la gráfica 21(b) se observa al igual que en el punto anterior, que la extracción de Cu si aumenta de manera importante de un pase a otro, aunque no llega a los valores alcanzados en el reactor agitado en orbital.

3.4.4 Concentración de Fe (T), Fe (II) y Fe (III).

En la gráfica 22 (a) se observa el comportamiento que tiene la disolución de Fe en el sistema y la gráfica 22 (b) muestra el comportamiento del Fe (T), Fe (II) y Fe (III) también para el mismo sistema. Se observa que el Fe (III) aumenta su concentración debido al aumento de la demanda de Fe (II) por las bacterias. Esto es indicativo de que la población de bacterias aumenta y de que éstas se adaptan satisfactoriamente al sistema.

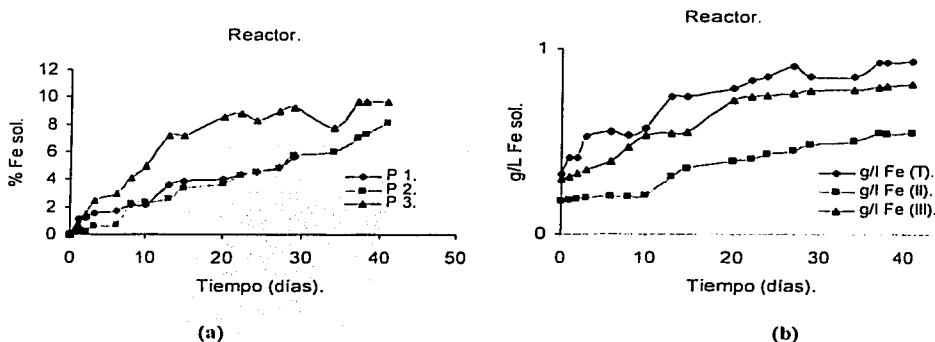


(a)



(b)

Gráfica 21. (a) Evolución del potencial de óxido-reducción y (b) Evolución de la extracción de cobre en el reactor (escala).



Gráfica 22. (a) Evolución de la extracción de Fe y (b) evolución de la concentración de Fe (T), Fe (II) y Fe (III), en el pase 3 del reactor (escala).

3.4.5 Efecto de la agitación mecánica en el desarrollo de la población de bacterias.

En las gráficas 20 (a, b) y 21 (a, b) se presentan los resultados del tercer pase de adaptación de las bacterias de la cepa Nochebuena al concentrado mineral bajo agitación orbital, que refiriéndolos con los del tercer pase de adaptación de las bacterias a la agitación mecánica, los resultados de extracción de Cu, ORP y por tanto de número de células son mucho más bajos, lo cual se podría explicar con lo siguiente. En esta última etapa se trabajó con un mayor volumen de solución a temperatura y pH iguales pero se implementó la agitación mecánica con una propela (impulsor) a una velocidad de 150 rpm. Evidentemente la agitación mecánica es más violenta que la agitación orbital y el impacto de la propela con las bacterias pudo haber eliminado una cantidad importante de éstas.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Es importante mencionar que la velocidad de 150 rpm fue insuficiente para mantener adecuadamente el mineral en suspensión y que ésta no se pudo aumentar debido a los fenómenos de atrición sobre las bacterias.

Este problema puede aminorarse cambiando las dimensiones del impulsor y quizás el diseño del reactor, pues aunque existen varios diseños de biorreactores, no los hay específicamente para biolixiviación, pues además de que la técnica de biolixiviación es relativamente nueva las densidades de los concentrados de flotación son muy altas.

Esta técnica de biolixiviación es nueva en el departamento de metalurgia siendo éste el tercer trabajo que se desarrolla en este tema y el primero que se realiza en reactor escala, por lo que todavía las variables se están poniendo a punto para futuras investigaciones.

CAPÍTULO IV

Conclusiones.

Para lograr la reactivación de los 4 cultivos utilizados es necesario realizar un mínimo de 3 pases de adaptación.

Se pueden obtener cultivos de la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* en un periodo de 3 a 4 días estando éstas perfectamente reactivadas y listas para un proceso de biolixiviación.

El porcentaje de extracción de cobre que se obtuvo con la cepa autóctona fue prácticamente el mismo que se obtuvo con la cepa Nochebuena, pero en un periodo de tiempo mayor, el cual se puede disminuir realizando más pases de adaptación para mejorar la cinética de lixiviación de las bacterias autóctonas.

El tiempo de biolixiviación en incubador orbital del concentrado mineral estudiado fue de 15 a 20 días lográndose extraer el 60 % de cobre.

La implementación de la agitación mecánica en el proceso de biolixiviación tiene un fuerte impacto en el crecimiento de microorganismos, impidiendo el desarrollo favorable de éstos, por lo que es necesario optimizar esta variable para alcanzar una aplicación industrial del proceso de biolixiviación de concentrados.

La acción catalítica que las bacterias ejercen sobre los elementos de interés comercial es fundamental en los procesos de biolixiviación, ya que de ellas depende lograr una eficiente recuperación de éstos.

La recalcitrancia de algunos minerales es un factor importante también en el proceso de biolixiviación, ya que si ésta no existiera, se lograrían extracciones mayores al 90 %.

Los procesos de biolixiviación se están convirtiendo en una fuerte alternativa para el tratamiento de minerales sulfurados, llámese menas o concentrados a los cuales no son aplicables los procesos convencionales de recuperación de metales, debido a la ley, complejidad del mineral, o a la aplicación de estrictas legislaciones ambientales.

CAPÍTULO V

- 1.- A. Ballester, F. González y M. Blázquez. Biolixiviación de menas naturales
Posibilidades actuales de utilización. *Rev. Metal. Madrid*, 24 [2], 91-102 (1988).
- 2.- R. F. Decker. *Met. Trans.*, 17A, 5-30 (1986).
- 3.- G. J. Olson y R. M. Kelly. *Biotech. Prog.*, 2 [1], 1-15 (1986).
- 4.- A. E. Torma e I. G. Banhegyi. *Trends Biotechnol.*, 2 [1], 13-15 (1984).
- 5.- D. Monroe. *Inter. Biotechnol. Lab.*, 3 [1], 19-29 (1995).
- 6.- J. C. Gentina y F. Acevedo. *Trends Biotechnol.*, 3 [1], 85-89 (1985).
- 7.- C. R. Cupp. *Ca. Metal. Quart.*, 24 [2], 109-113 (1985).
- 8.- M. C. Campbell, H. W. Parsons, A. Jongejan, V. Sanmugasunderam y M. Silver.
Can. Metal. Quart., 24 [2], 115-120 (1985).
- 9.- F. Kargi. *Trends Bbiotechnol.*, 4 [1], 293-297 (1986).
- 10.- L. C. Cancho Rodríguez. Biolixiviación con microorganismos Termófilos
moderados en presencia de plata. *Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias
Químicas. Universidad Complutense de Madrid* (1999).
- 11.- A. E. Torma. *Adv. Biochem. Eng.*, 6, 1-37 (1977).
- 12.- A. E. Torma y K. Bosecker. *Prog. Ind. Microbiol.*, 16, 77-118 (1982).
- 13.- K. Bosecker. *Stud. Inorg. Chem.*, 5, 331-348 (1984).
- 14.- P. Castillo. La lixiviación bacteriológica como apoyo al tratamiento de minerales
refractarios de oro. Memorias del IV seminario sobre avances tecnológicos en minería y
metalurgia extractiva. Chihuahua. Chih. Consejo de Recursos Minerales-Japan
International Cooperation Agence-SECOFI. Chihuahua, Chih., octubre (1995).
- 15.- T. Brewis. Extracción de metales por oxidación bacteriana. *Mining*, Abril,
35-46 (1996).

- 16.- E. Flores, H. Pérez, M. Rentería, A. Gámiz, C. Correa, M. R. León, R. Dávila, E. Álvarez, H. Medrano. Eliminación biológica de sulfuro de arsénico en concentrados de mineral de plomo y zinc. Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Química y Bioquímica, Unidad de Biotecnología Industrial. Durango, Dgo.
- 17.- R. E. Gripps. The recovery of metals by microbial leaching. *Biotechnology Letters.*, 2 [5], 255-262 (1980).
- 18.- C. C. Brierli. Bacterial Leaching. *CRC Critical Review in Microbiology*, November., 207-262 (1979).
- 19.- H. L. Ehrlich, and S.I Fox. Environmental effect on bacterial copper extraction from low-grade copper sulfide ores. *Biotechnol. and Bioeng.*, 9, 471-485 (1976).
- 20.- J. A. Brierly. Thermophilic iron oxidizing bacteria found in copper leaching dump. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 523-525 (1978).
- 21.- F. Acevedo, and J. C. Gentina. Process engineering aspects of the bioleaching of copper ores. *Bioprocess Engineering.*, 4, 223-229 (1989).
- 22.- R. Guay, and M. Silver. Uranium biohydrometallurgy. *Process Biochemistry.*, 5, 8-11 (1981).
- 23.- K. Imai, H. Sakaguchi, T. Sogio and T. Tano. On the mechanism of chalcocite oxidation by *thiobacillus ferrooxidans*. *J. Ferment. Technol.*, 51 [12], 865-870 (1973).
- 24.- D. T. Lacey, and F. Lawson. Kinetics of the liquid-phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. and Bioeng.*, 12, 29-50 (1970).
- 25.- B. J. Leggett. Techniques in protein chemistry. 2a. Ed. Elsevier Publishing Co. New York (1967).

- 26.- D. Lundgren, and T. Tano. Structure-function relationships of *Thiobacillus* relative to ferrous iron and sulfide oxidations. *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*. In: L. E. Murr, A.E. Torma, J. E. Brierli, (Eds). Academic Press, New York., 151-166 (1978).
- 27.- E. E. Malouf. The role of microorganisms in Chemical mining. *Mining Eng.*, 23, 43-46 (1971).
- 28.- A.E. Torma, P. R. Ashman, T. M. Olsen and K. Bosecker. *Metall.*, 33, 479-484 (1979).
- 29.- A.E. Torma, and R. Guay. Effect of particle size on the biodegradation of a spheralite concentrate. *Naturaliste Can.*, 103, 133-138 (1976).
- 30.- C. C. Mwaba. Biohydrometallurgy: An extraction technology for the 1990's. *Mining Magazine*, September, 7, 135-140 (1991).
- 31.- A. E. Torma, C. C. Walden, and R. M. Branion. Microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate. *Biotechnol. and bioeng.*, 12, 501-517 (1970).
- 32.- A. E. Torma. The role of *thiobacillus ferrooxidans* in hydrometallurgical processes. *Adv. Biochem. Eng.*, 6, 1-37 (1977).
- 33.- D. I. C. Wang, Ch. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, and M. D. Lilly. *Fermentation and enzyme technology*. John Wiley & Sons (1978).
- 34.- T. Takamori, H. Kakuta, and M. Sumiya. Some properties of *thiobacillus ferrooxidans* and application of the properties to improvement of the rate of sulfide minerals leaching. Recent progress in Biohidrometallurgy. Italy Associazione Mineraria Sarda., 679-691 (1983).
- 35.- H. Sakaguchi, M. Silver, A. E. Torma. Microbiological Leaching of a chalcopyrite concentrates by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. and Bioen.*, 18, 1091-1101 (1976).

- 36.- D. A. Skoog y M. West. Fundamentos de Química Analítica. Zaragoza, España. Editorial Reverte.. 511, 523-528 (1977).
- 37.- A. Bruynesteyn. Bacterial leaching. Its potential impact upon the Canadian Non-Ferrous Metal Industry. CIM Conference, Winnipeg, Manitoba, Canada. 1983.
- 38.- A. E. Torma. *J. Ferment. Technol.*, 5 [3], 173 (1978).
- 39.- O. Tuovinen. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 5, 301 (1978).
- 40.- A. Dispirito, P. Dugan y O. Tuovinen. *Biotechnol. Bioeng.*, XVIII, 2761.(1981).
- 41.- J. C. Bennett y H. Tributsch. *J. Bacteriol.*, 134, 310 (1978).
- 42.- M. P. Silverman y H. L. Ehrlich. *Adv. Appl. Microbiol.*, 6, 153-206 (1964).
- 43.- H. L. Ehrlich. *Geomicrobiol.*, 1, 65 (1978).
- 44.- A. J. Lewis y J. D. A. Mier. *Can. J. Microbiol.*, 23, 319 (1977).
- 45.- A. A. Dispirito y O. H. Tuovinen. *Arch. Microbiol.*, 133, 28 (1982).
- 46.- W. J. Ingledew. *Biochim. Biophys. Acta*, 683, 89 (1982).
- 47.- W. J. Ingledew y J. G. Copley. *Biochim. Biophys. Acta*, 590, 141 (1980).
- 48.- W. J. Ingledew. *Biotechnol. Bioeng.* En prensa.
- 49.- A. P. Harrison. *J. Ann. Rev. Microbiol.*, 338, 265 (1984).
- 50.- J. A. Brierley. Contribution of chemautotrophic bacteria to the acid thermal waters of the geyser spring Group in Yellowstone National Park. Ph. D. Thesis. Montana St. University, Bozeman (EE. UU.) 1996.
- 51.- T.D. Brock, K. M. Brock, R. Belly y R. L. Weiss. *Arch. Microbiol.*, 84 (1972).
- 52.- J. A. Brierley. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 523 (1978).
- 53.- A. P. Wood y D. P. Kelly. *Trends Biotechnol.*, 3, 86 (1985).
- 54.- A. R. Colmer y M. E. Hinkle. *Science*, 106, 253 (1947).

- 55.- J. H. Taylor y P. F. Whelan. *Trans. Inst.* 106, 253 (1947).
- 56.- W. E. Razeell y P. C. Trussell. *J. Bacteriol.*, 85, 595 (1963).
- 57.- S. Porro, J. L. Boiardi y P. H. Tedesco, Bioliliviación de minerales Argentinos de Cobre.. *Rev. Metal. Madrid* 24 [5], 297-302 (1998).
- 58.- L. E. Murr. *Miner. Sci. Eng.* 12 [3], 121-189 (1980).
- 59.- H. G. Ebner. Metal recovery and environmental Protection by bacterial leaching of inorganic waste materials. Metallurgical application of bacterial leaching and related microbiological phenomena. In: L. E. Murr, A. E. Torma, J. A. Brierli. (Eds) Academic Press, New York., 151-166 (1978).
- 60.- T. Imaizumi. Some industrial applications of inorganic microbial oxidation in Japan. Workshop on Biotechnology for the mining. Metal-refining and fossil fuel processing Industries. H. L. Ehrlich y D. S. Holmes (Eds.). John Wiley and sons. New York., 363-371 (1985).
- 61.- R. Manchee. *TIBS*, 77-80 (abril 1979).
- 62.- P. Viscca, P. Valenti y N. Orsi. Studies on *Thiobacillus ferrooxidans*. Recent Progress in Biohidrometallurgy. G. Rossi y A. E. Torma (Eds) Associazione Mineraria. Iglesias. Italia, 97-110 (1983).
- 63.- R. G. L McCready, V. Sanmugasunderam y W. D. Gould. Workshop on Basic microbiology for the mineral industry. Energy, Mines and Resources Canada. Ottawa. Noviembre 1986.
- 64.- C. F. Gokcay y R. N. Yurteri. *Fuel.*, 62, 1123-1124 (1983).
- 65.- L. E. Murr y A. P. Mehta. *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 743-748 (1982).
- 66.- F. Kargi y J. M. Robinsón. *Biotechnol. Bioeng.* 27. 41(1985).
- 67.- F. Kargi y J. M. Robinson. *Fuel*, 65, 397 (1986).

- 68.- N. Iglesias, I. Palencia y F. Carranza. Eliminación de la refractariedad de una mena de oro en una matriz de arsenopirita mediante Sulfato férrico., *Rev. Metal. Madrid.*, 28. [4], 251-257 (1992).
- 69.- W. J. Guay. Proceedings From the 110th AIME meeting on gold and Silver leaching, recovery and economics., Vol. III. Chicago, 22-26 (1981).
- 70 K. J. Henley. *Miner. Sci. Eng.*, 7, 289-312 (1975)
- 71- M. C JHA. *Miner. Process Extr. Metall. Rev.*, 3, 331-352 (1987).
- 72- E. Díaz, F. Carranza, R. Romero, *Rev. Metal. Madrid*, 24 (6), 391-401 (1988)
- 73- R. L. Paul. *J. Electroanal. Chem.*, 168, 147-162 (1984).
- 74- A. J. Brown. First International Symposium of precious metals recovery. Nevada, 10 (1984).
- 75- E. H. Smith. *Miner. Eng.*, 38 (10), 971-979 (1986).
- 76- S. R. Hutchins, J. A. Brierley y C. L. Brierley. *Process Mineral.*, 53.66 (1987).
- 77- M. Pozo y J. A. Campa. Estudio comparativo de la lixiviación química y bacteriana del cobre en piritas masivas de Río Tinto (Huelva). *Rev. Metal. Madrid.*, 19 [4], 223-230 (1983).
- 78- W. E. Razzell y P. C. Trussell. Isolation and properties of an iron-Oxidizing thiobacillus, *J. Bacteriol.*, 85. 595-603 (1963).