



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CINÉTICA  
DE BIOLIXIVIACIÓN DEL CONCENTRADO DE  
CALCOPIRITA AVINO EN PRESENCIA DE  
TRES CEPAS DE BACTERIAS MESÓFILAS  
PROVENIENTES DE LOS COMPLEJOS  
MINEROS TIZAPA Y NOCHEBUENA.”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO QUÍMICO METALÚRGICO**

**P R E S E N T A :**

**JOSUÉ MAURICIO BECERRIL GONZÁLEZ**



**MÉXICO D. F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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	Prof. José Antonio Barrera Godínez
Vocal	Prof. Antonio Huerta Cerdán
Secretario	Prof. Rosa Elva Rivera Santillán
1er. Suplente	Prof. Ventura Becerril Reyes
2º. Suplente	Prof. Nelly Gutiérrez Arenas

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

---

Asesor: Dra. Rosa Elva Rivera Santillán

---

Sustentante: Josué Mauricio Becerril González

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado con gran cariño y un profundo respeto a mi familia. A mis padres: la señora Rosa María González Chávez y el señor Manuel Becerril Orozco, y a mis hermanos Ricardo y Manuel. Ustedes me han regalado los mejores momentos de mi vida.

A mi sobrina Natalia y a mi cuñada Marcela. Su llegada a nuestra familia nos han vuelto aún más unidos y más felices, muchas gracias.

Mamá, Papá: por todo el amor que me han dado, por su apoyo incondicional, por la confianza que me han brindado, por las lecciones que me han regalado. Por todo eso les agradezco y les dedico éste escrito, el trabajo más importante de mi vida como estudiante.

Ricardo, Manuel: como hermanos hemos compartido muchas cosas, desde risas hasta corajes, pero todo eso nos ha hecho crecer juntos. ¡Por todas esas memorias y por nosotros!

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos mis maestros, a ellos debo gran parte de mi formación, no solo como estudiante sino también como persona: me enseñaron lo mejor como también lo peor.

En particular, agradezco a aquellos profesores que durante la universidad me brindaron enseñanzas que trascendieron más allá de mi vida académica: a la Doctora Rosa Elva Rivera Santillán por el gran apoyo que me brindo desde que la conocí, al Profesor Guillermo Salas Banuet por compartir conmigo su visión acerca de la enseñanza y el aprendizaje, al Doctor José Luz González Chávez por el constante apoyo que me brindó durante mis primeros años en la universidad así como por mostrarme el alcance y las repercusiones de la química para con el mundo, al Doctor Alberto Ingalls Cruz por sus inspiradoras palabras sobre la responsabilidad de una persona, y muy especialmente al Maestro Ventura Becerril Reyes por ser un gran profesor, una persona muy dedicada, pero sobre todo por ser un gran amigo y guía.

Les doy las gracias a los profesores: José Antonio Barrera Godínez, Antonio Huerta Cerdán y Rosa Elva Rivera Santillán, por las sugerencias y correcciones al presente trabajo.

Reconozco al proyecto de investigación financiado por DGAPA-UNAM referencia PAPIIT-IN223306: “Estudio de biolixiviación de sulfuros de cobre en columna y en reactores agitados” por el apoyo económico otorgado durante la realización de este estudio; de igual forma al Programa de Alta Exigencia Académica y al Subprograma de Formación de Profesores de la facultad de química, los cuales me permitieron complementar mi formación académica en diversos ámbitos.

Manifiesto mi agradecimiento hacia los técnicos: Iván Puente y María Cecilia Salcedo, pertenecientes a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, y al profesor Ciro Márquez del Departamento de Ingeniería Metalúrgica, por los servicios prestados durante el desarrollo experimental.

Por último -pero no por ello con menor importancia- agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, la cual a través de su Facultad de Química y su Escuela Nacional Preparatoria, me permitieron desenvolverme en un ambiente de responsabilidad, compromiso, tolerancia y amor al conocimiento. Espero ser digno de todas las buenas cosas que la Universidad me regaló desde mis catorce años y siempre contribuiré de la mejor manera posible para engrandecer el nombre de esta generosa institución.

## A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

A ellos les agradezco porque de todas las formas posibles han contribuido a enriquecer mi vida.

A mi mamá, a mi papá, a Ricardo y a Manuel, que me han dado tanto (nunca podría enumerarlo), que hemos compartido una vida y que siempre hemos estado juntos. A Natalia y a Marcela, que con poco tiempo de conocerlas nos han llenado mucho de alegría.

A mis abuelos, los señores: María de la Luz Chávez, Salvador González (†), José M. Becerril y Luz María Orozco, a quienes tengo mucho cariño. A mis tíos y tías, en especial a los señores Salvador González, José Luz González, Verónica González, Norma González y Rosa Elva Rivera, que siempre me han apoyado. A mis primos, especialmente a Givaldo, Osmar, Edson, Salvador y René.

A mis amigos y compañeros de la licenciatura y la facultad, sobre todo a aquellos que se ganaron mi admiración y mi confianza: César Álamo, Lucero Valencia, Luis Rodrigo Palomera y José Luis Saucedo.

A los amigos que tomaron otros caminos, en especial a Tao, Rubén, Marco, Ray, David, Luis Enrique.

A los compañeros del grupo de trabajo de biohidrometalurgia, que hicieron más amena la estancia en el laboratorio: Toño, Jorge, Ventura, Yanet, Fernando, Leo, Hugo.

A todos ellos, muchas gracias.

## ÍNDICE

<b>Prefacio</b> .....	i
<b>Objetivo general</b> .....	iii
<b>Objetivos particulares</b> .....	iii
<b>Resumen</b> .....	iv
<b>1. Generalidades</b> .....	2
1.1 Introducción.....	2
1.2 Microorganismos y biolixiviación de minerales.....	3
1.2.1 <i>Bacterias</i> .....	3
1.2.2 <i>Clasificación de las bacterias</i> .....	4
1.2.3 <i>Las bacterias involucradas en la biolixiviación de minerales</i> .....	8
1.2.4 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	10
1.2.5 <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> .....	11
1.2.6 <i>Mecanismos de biolixiviación por A. ferrooxidans</i> .....	12
1.3 Biolixiviación de minerales.....	14
1.3.1 <i>Variables que rigen los procesos de biolixiviación</i> .....	14
1.3.2 <i>Monitoreo del crecimiento bacteriano</i> .....	15
1.4 Antecedentes geográficos.....	16
1.4.1 <i>Tizapa (Peñoles - Dowa Mining – Sumitomo Corp.)</i> .....	16
1.4.2 <i>Noche Buena (Seabridge Gold Incorporated)</i> .....	17
1.4.3 <i>San José de Avino (Avino Silver &amp; Gold Mines Ltd.)</i> .....	18
<b>2. Desarrollo Experimental</b> .....	20
2.1 Reactivos, Material y Equipo utilizado.....	20
2.2 Caracterización del concentrado de calcopirita.....	21
2.3 Selección de cepas.....	21
2.4 Preparación de medios de cultivo.....	22

2.5 Preparación y reactivación de cultivos.....	23
2.6 Monitoreo de los parámetros del crecimiento bacteriano.....	24
2.6.1 <i>Medición y control del pH del sistema</i> .....	24
2.6.2 <i>Medición del potencial de óxido reducción (ORP) del sistema</i> .....	24
2.6.3 <i>Monitoreo del número de bacterias (conteo)</i> .....	25
2.6.4 <i>Ajuste de la concentración del medio de cultivo</i> .....	25
2.7 Estudio de la cinética de biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino.....	25
2.8 Caracterización del residuo del proceso de biolixiviación.....	26
<b>3. Resultados y Discusión</b> .....	<b>28</b>
3.1 Caracterización del concentrado de calcopirita Avino.....	28
3.1.1 <i>Caracterización de la muestra por el Consejo de Recursos Minerales</i> .....	28
3.1.2 <i>Estudios de la muestra realizados en Facultad de Química</i> .....	29
3.2 Activación y reactivación de cultivos.....	32
3.2.1 <i>Evolución del potencial de óxido-reducción durante los pases de adaptación</i> .....	34
3.2.2 <i>Monitoreo del crecimiento de los microorganismos durante su adaptación</i> .....	38
3.2.3 <i>Comportamiento del pH durante la adaptación de las cepas</i> .....	40
3.3 Adaptación de las bacterias ferroxidantes y tiooxidantes al concentrado Avino.....	41
3.3.1 <i>Evolución del potencial redox en la biolixiviación del concentrado Avino</i> .....	42
3.3.2 <i>Crecimiento de las cepas durante la biolixiviación del concentrado Avino</i> .....	46
3.3.3 <i>Comportamiento del pH durante la biolixiviación del concentrado Avino</i> .....	49
3.3.4 <i>Extracción de metales durante la cinética de biolixiviación</i> .....	49
3.4 Caracterización del residuo de la biolixiviación del concentrado Avino.....	53
3.4.1 <i>Caracterización por difracción de Rayos X</i> .....	53
3.4.2 <i>Observación al microscopio electrónico de barrido</i> .....	54
3.5 Consideraciones finales acerca del proceso de biolixiviación del concentrado Avino..	58
<b>Conclusiones</b> .....	<b>64</b>

<b>Referencias Bibliográficas</b> .....	66
<b>Anexos</b> .....	70
Anexo I.....	70
Anexo II.....	73
Anexo III.....	74

## **Prefacio.**

La economía de México como la de cualquier país del mundo se encuentra sujeta a una diversa cantidad de factores, entre ellos la explotación de los recursos naturales del país. México se halla en una posición envidiable en cuanto a la cantidad de recursos que posee, por su orografía, cuenta con importantes yacimientos minerales de metales como cobre (Cu), plata (Ag), Oro (Au), zinc (Zn) y plomo (Pb), por mencionar solo algunos de ellos; por lo que como productor de metales, el país es de los principales a nivel mundial.

No obstante la enorme cantidad de materias primas minerales con las que México cuenta, los retos actuales de la minería –tanto nacionales como internacionales- van de la mano tanto con el desarrollo de tecnología de alta eficiencia en cuanto a la extracción de metales como de la implementación de procesos no agresivos para el medio ambiente. Por estos motivos, procesos que hace años eran el estándar del quehacer de la Metalurgia Extractiva, en la actualidad se han vuelto poco prácticos.

Hoy día existe la tendencia a que las principales operaciones en el área minero-metalúrgica sean mayormente de carácter hidrometalúrgico y no pirometalúrgico, pues las primeras son considerablemente más amigables con el medio ambiente y más eficientes. Investigaciones recientes han buscado hacer aún más inofensivas las actividades hidrometalúrgicas, ello aunado al interés creciente de la comunidad científica internacional en el área de biotecnología, ha generado una disciplina denominada biotecnología minera o biohidrometalurgia, misma que busca aprovechar los procesos que ocurren al interior de los microorganismos para solubilizar minerales, proceso que se ha denominado como biolixiviación.

El presente trabajo es un estudio comparativo de la biolixiviación de un concentrado de calcopirita proveniente de la Compañía Minera San José de Avino utilizando tres cultivos de bacterias mesófilas, principalmente del género *Acidithiobacillus*, mismas que fueron obtenidas de los Complejos Mineros de Tizapa y de Nochebuena.

El trabajo escrito se encuentra estructurado en varios capítulos. En el Capítulo 1 se enumeran las bases teóricas que rigen a un estudio de biolixiviación y los antecedentes que conciernen al origen tanto de las cepas bacterianas como al mineral que se sometió a tal tratamiento. En el Capítulo 2 se describe el método experimental utilizado, mientras que en el Capítulo 3 se presentan y se analizan los resultados obtenidos a partir del desarrollo experimental. Posteriormente se muestra el apartado de Conclusiones derivadas del trabajo. Finalmente, se enumeran las Referencias bibliográficas utilizadas tanto en la preparación del tema expuesto como en la elaboración de este informe, y los Anexos pertinentes.

### **Objetivo general.**

Realizar un estudio comparativo de biolixiviación de un concentrado de calcopirita en presencia de distintos cultivos de bacterias mesófilas, compuestos principalmente de los microorganismos: *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* provenientes del Complejo Minero Tizapa y de *Acidithiobacillus ferrooxidans* proveniente del Complejo Minero Nochebuena.

### **Objetivos particulares.**

1. Obtener dos cultivos de bacterias mesófilas a partir del agua de mina del Complejo Minero Tizapa: el primero de ellos constituido por la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*, y el segundo por la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
2. Reactivar el cultivo de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* proveniente del Complejo Minero Nochebuena, y que se encuentra disponible en el laboratorio de Metalurgia Extractiva de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Adaptar cada cultivo bacteriano al concentrado de calcopirita Avino.
4. Realizar el estudio de biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino con cada uno de los cultivos.
5. Comparar los tres estudios de biolixiviación a fin de ratificar o refutar si existe una diferencia determinante entre los efectos producidos por cada cultivo sobre el concentrado Avino.

## Resumen.

La hidrometalurgia tradicional contempla la disolución de un mineral determinado a fin de liberar el metal de interés en forma de un catión metálico de relativamente fácil recuperación, todo ello en solución acuosa. A este proceso se le conoce como lixiviación, y cuando esta operación se lleva a cabo asistida por microorganismos se le denomina biolixiviación de minerales. En la biolixiviación, un mineral insoluble es llevado a una forma soluble por medio de las reacciones bioquímicas propias del metabolismo de los microorganismos involucrados, actuando éstos como un catalizador de la oxidación del mineral.

El trabajo que se presenta es un estudio comparativo de un proceso de biolixiviación de un concentrado de calcopirita a 36°C, donde la variable de estudio es el efecto que tienen distintos cultivos de bacterias mesófilas (principalmente del género *acidithiobacillus*) en el proceso de biolixiviación.

Para llegar hasta el estudio de la cinética de biolixiviación se requirió que los cultivos bacterianos se hicieran crecer en medios selectivos de acuerdo al tipo de bacteria que se deseaba obtener: en un medio rico en  $\text{Fe}^{2+}$  para el caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, y en un medio de azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) para bacterias *Acidithiobacillus thiooxidans*. Para seguir la evolución de los cultivos se realizó un monitoreo constante de parámetros como el pH al que se encontraban sometidos y la respuesta del potencial redox de cada sistema. Posteriormente se realizó la adaptación de las bacterias al concentrado de calcopirita Avino, cuidando nuevamente que los parámetros antes mencionados se encontrasen dentro de los límites permitidos para un crecimiento adecuado de las bacterias del género *Acidithiobacillus*. Finalmente, se llevó a cabo el estudio de la biolixiviación del concentrado Avino con cada uno de los cultivos ya adaptados a las condiciones establecidas desde el inicio del experimento.

*“(...)Dejad que a mi corazón llegue un momento el silencio,  
y así penetrar pueda en el misterio’.”*  
Edgar Allan Poe. El Cuervo.

## **CAPÍTULO I: GENERALIDADES.**

### **1. Generalidades.**

#### **1. 1 Introducción.**

La minería mundial está viviendo uno de los momentos más prósperos en la historia reciente debido al aumento en la demanda de materias primas minerales ocasionando que el precio de los metales alcance máximos históricos, todo ello provocado por el surgimiento industrial de China e India, países que concentran una tercera parte de la población del planeta. De acuerdo a cifras de la CAMIMEX (Cámara Minera de México), durante 2005, el valor de la producción minera mexicana creció de manera muy significativa en comparación con el año inmediato anterior, alcanzando el récord histórico de 53,954 millones de pesos (4,968 millones de dólares), lo que representó un incremento del 26%<sup>(1)</sup>. Si se considera que la producción de materias primas minerales es tan solo el inicio de la industria minero-metalúrgica, se realza la importancia de contar con tecnología adecuada para la explotación apropiada de tales recursos.

México cuenta con importantes yacimientos minerales de cobre, plata, zinc, oro, plomo y molibdeno<sup>(2)</sup>. Sin embargo, como sucede en todo el mundo, los minerales que se extraen actualmente poseen leyes cada vez más bajas de los metales de interés económico. Desde luego, esto conlleva la modificación de las técnicas de extracción propias de la Metalurgia Química, y aunado al interés creciente en la biotecnología no es de sorprenderse que las opciones para el aprovechamiento de minerales de bajo contenido metálico correspondan a la biohidrometalurgia. En años recientes los estudios sobre el aprovechamiento de menas metálicas sulfuradas (las más abundantes hoy día) se han enfocado principalmente en el uso de microorganismos para tales efectos<sup>(3)</sup>, dado que los métodos tradicionales correspondientes a la hidrometalurgia han resultado poco satisfactorios para tales efectos. El trabajo de investigación efectuado en el área de

biotecnología de minerales ha generado los conocimientos necesarios para que el proceso de biolixiviación como tal se esté implementando actualmente en diversos lugares y en diferentes tipos de operaciones industriales: ya sea en terreros para la obtención de cobre en Chile o en reactores de agitación mecánica continua para biolixiviación de concentrados de minerales sulfurados de cobre en Sudáfrica<sup>(4,5)</sup>, sin embargo, y a pesar de que lo que se conoce realmente de este tipo de procesos es que existe una reacción catalítica de disolución de minerales en presencia de bacterias, a veces resulta insuficiente para determinar con exactitud lo que ocurre al interior de los microorganismos involucrados, por tal motivo no solo existe una discusión muy importante acerca de los mecanismos de acción de las bacterias para lograr la disolución de un mineral, sino que además constantemente se descubren nuevos factores involucrados en el proceso global, complicando así el entendimiento de éste.

Con ello en mente, las investigaciones actuales contribuyen a ampliar los conocimientos sobre las variables que afectan la lixiviación de minerales por medio de microorganismos para poner a punto métodos que permitan la aplicación u optimización de este proceso hidrometalúrgico, a fin de hacerlo económicamente redituable, carácter determinante para el futuro de la biolixiviación como parte de la industria minero-metalúrgica.

## **1.2 Microorganismos y biolixiviación de minerales.**

### **1.2.1 Bacterias.**

Las bacterias son organismos agrupados desde 1977 en uno de los cinco reinos que clasifican a los seres vivos: el de los Procariontes o Reino Monera. Su organización es muy simple, pues se trata de células generalmente unicelulares cuyo ADN se encuentra

disuelto al interior de la célula. Se dividen básicamente en dos grandes grupos: las *arqueobacterias* –o bacterias antiguas- y las *eubacterias* –o bacterias verdaderas-<sup>(6)</sup>.

El éxito de los procariotas, hablando en términos biológicos, se debe a su gran diversidad metabólica y a su alto ritmo de crecimiento y de división celular. Pueden permanecer latentes y viables durante años hasta que las condiciones se tornen nuevamente favorables; entonces, vuelven a activarse, dado que algunas bacterias pueden formar estructuras de resistencia que les permiten sobrevivir durante largos períodos sin nutrimento y soportar temperaturas extremas.

En cuanto a su nutrición y aprovechamiento de energía, se encuentran todas las alternativas posibles: algunos organismos utilizan la energía proveniente de reacciones químicas mientras que otros son capaces de realizar la fotosíntesis; la mayoría utiliza el carbono derivado de compuestos orgánicos y algunos usan el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Con respecto a la respiración celular, no se encuentran menos opciones: el oxígeno puede ser vital o letal según el metabolismo de cada bacteria; ciertas especies, incluso, pueden existir con oxígeno o sin él. Así, algunos procariotas se encuentran entre los escasos organismos modernos que pueden sobrevivir sin oxígeno libre y obtener su energía por procesos anaeróbicos.

Esta diversidad metabólica se traduce en una distribución geográfica prácticamente ubicua: hay muy pocos lugares en la superficie de la Tierra que no estén colonizados por bacterias.

### **1.2.2 Clasificación de las bacterias.**

Las bacterias se clasifican de diversas formas, la clasificación más común depende principalmente de la manera en la que obtienen los requerimientos básicos que necesitan para subsistir tales organismos. Si bien los tipos y las cantidades de nutrientes que necesita un organismo pueden variar, todos necesitan agua, una fuente de carbono y una

de energía<sup>(7,8)</sup>. De acuerdo con los componentes nutricionales básicos se encuentran cuatro categorías fundamentales (Tabla 1)<sup>(6,7)</sup>. En cuanto a la fuente de energía utilizada, los organismos que utilizan la luz se denominan *fotótrofos* y los que obtienen la energía a partir de la oxidación de compuestos químicos se llaman *quimiótrofos*. Del mismo modo, como fuente de carbono, los organismos pueden utilizar compuestos inorgánicos, como el CO<sub>2</sub>. Estos organismos se denominan *litótrofos*. Si utilizan compuestos orgánicos –el más utilizado es la glucosa- se denominan *organótrofos*. Por otra parte, se diferencian organismos que son capaces de sintetizar las moléculas orgánicas necesarias a partir de sustancias inorgánicas simples como H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>, y de alguna fuente de energía como la luz solar. A estos organismos se les conoce como *autótrofos* (se bastan a sí mismos) en contrapartida con los *heterótrofos* cuyos compuestos orgánicos derivan de los procesos anabólicos de otros seres vivos.

<b>Tabla 1. Fuentes de energía y carbono de las bacterias</b>			
Tipo de organismo	Fuente de energía	Fuente de carbono	Donadores de electrones
<b>Fotolitótrofos</b> Bacterias verdes y purpúreas del azufre, cianobacterias.	Luz	CO <sub>2</sub>	Compuestos inorgánicos S <sup>2-</sup>
<b>Fotoorganótrofos</b> Bacterias purpúreas no del azufre.	Luz	Compuestos orgánicos (y CO <sub>2</sub> )	Compuestos orgánicos (alcoholes, ácidos grasos, etc.).
<b>Quimiolitótrofos</b> Arqueobacterias hipertermófilas del azufre, metanógenas, bacterias del hidrógeno, del hierro, nitrificantes, carboxibacterias.	Uniones químicas. Reacciones de oxidoreducción.	CO <sub>2</sub>	Compuestos inorgánicos (H <sub>2</sub> , S, S <sup>2-</sup> , Fe <sup>2+</sup> , NO <sub>3</sub> , NO <sub>2</sub> , CO).
<b>Quimioorganótrofos</b> La mayor parte de las bacterias.	Uniones químicas. Reacciones de oxidoreducción.	Compuestos orgánicos.	Compuestos orgánicos (glucosa y otros hidratos de carbono).

Las bacterias pueden clasificarse también por su morfología, así como por la adaptación que muestran a diversos agentes físicos, químicos y biológicos.

Por su forma, las bacterias pueden clasificarse como:

*Cocos* - son bacterias en forma de esfera. Aquellas bacterias que son cocos y que se agrupan en pares se les conoce como diplococos, cuando se forman en grupos mayores formando una cadena se les conoce como estreptococos. Los estafilococos son agregados o grupos de células.

*Bacilos* - son bacterias alargadas, en forma de bastón. Los bacilos que se agrupan en pares son conocidos como diplobacilos, aquellos que se agrupan formando cadenas alargadas se conocen como estreptobacilos.

*Curvas o Espirillas* - son bacterias que no caen en las dos clasificaciones anteriores y como el nombre sugiere, tienen formas curvas. Dentro de esta clasificación existen varios tipos como lo son los espirilios (en forma de espiral flexible), los espiroquetas en forma de hélice y los vibrios en forma de coma.

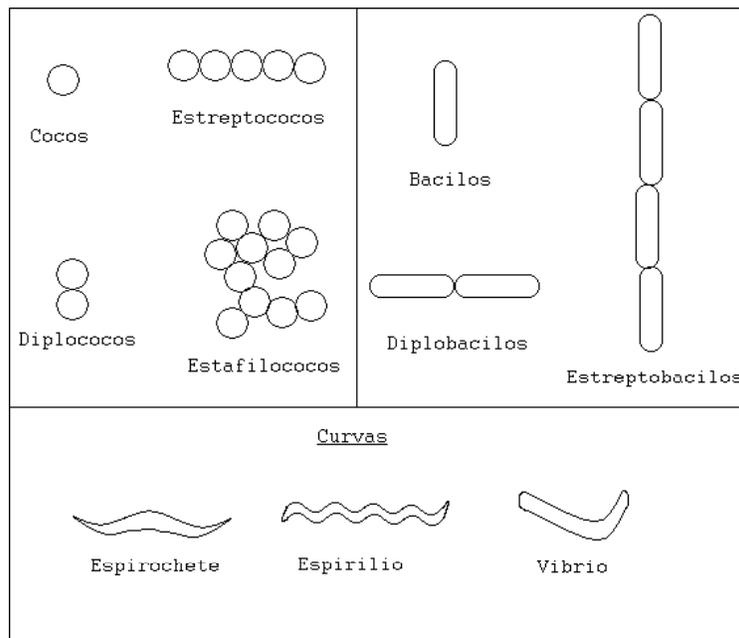


Figura 1. Representación gráfica de la clasificación de bacterias por su morfología.

Los organismos procariontes son afectados en su crecimiento por diversos agentes físicos como son: la temperatura, la presencia de oxígeno y otros gases en el aire, el pH al que son sometidos, la presión osmótica y radiaciones. Por estas razones, es común encontrar otras formas de categorizar a las bacterias; a continuación se mencionan algunos de estos sistemas de clasificación por lo relevantes que resultan para el presente trabajo.

El rango de temperatura al que opera un microorganismo le permite clasificarse como:

*Sicrófilo* – Opera a temperaturas entre 0 y 20 °C, con crecimiento óptimo a <15 °C.

*Sicrótrofo o Sicrófilo facultativo* - Opera a temperaturas entre 0 y 35 °C, con crecimiento óptimo entre 20 y 30 °C. Se le denomina sicrófilo facultativo debido a que puede adaptarse a las mismas condiciones que un sicrófilo cuando sea necesario.

*Mesófilo* - Opera a temperaturas entre 20 y 40 °C, con crecimiento óptimo a 35 °C aproximadamente.

*Termófilo* - Opera a temperaturas entre 40 y 70 °C, con crecimiento óptimo en un rango de temperaturas entre 55 y 65 °C.

*Hipertermófilo o Termófilo extremo* - Opera a temperaturas entre 80 y 113 °C, con crecimiento óptimo a temperaturas >90 °C.

Las bacterias pueden clasificarse como organismos *aerobios* o *anaerobios* en función de su supervivencia en presencia o ausencia de oxígeno (respectivamente) en el aire. No obstante es necesario señalar que esta clasificación resulta ser un tanto ambigua, por lo que es posible extender esta clasificación de la siguiente forma:

*Microorganismos aerobios:*

-*obligados* – requieren de la presencia de oxígeno en concentraciones de 21 % o más.

-*microaerófilicos* – solo pueden crecer a niveles de O<sub>2</sub> menores al atmosférico.

### *Microorganismos anaerobios:*

- obligados* – crecen en ausencia total de oxígeno, mueren en su presencia.
- facultativos* – su desarrollo es mejor con oxígeno, pero pueden crecer bajo condiciones de presiones parciales de CO<sub>2</sub> altas.
- aerotolerantes* – pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno.

Finalmente y aunque los valores no son del todo estrictos, por el rango de pH al que pueden sobrevivir, las bacterias se catalogan como:

- acidófilas extremas* – cuando crecen a valores de pH menores a 2.
- acidófilas* – cuando crecen a valores de pH entre 2 y 5.
- neutrófilas* - cuando crecen en un pH neutro (entre 6 y 8).
- alcalófilas* – cuando crecen a valores de pH entre 9 y 12.
- alcalófilas extremas* – cuando crecen a valores de pH mayores a 12.

### **1.2.3 Las bacterias involucradas en la biolixiviación de minerales.**

Los microorganismos que intervienen en la transformación de los minerales tienen como característica principal su alta resistencia para desarrollarse en ambientes con condiciones que resultarían agresivas para la mayoría de los seres vivos, éstas definidas por bajos pH's y temperaturas diversas (en algunos casos, elevadas), pero todos ellos con altos contenidos de metales pesados y sus compuestos derivados. Es muy común encontrar microorganismos en los minerales sulfurados, y estos viven asociados normalmente a ambientes acuosos característicos de las explotaciones mineras. La oxidación de las distintas formas del azufre y diferentes iones metálicos proveen a las bacterias de la energía requerida para su actividad vital, desde luego que esto trae como consecuencia la solubilización de los distintos metales que conforman al mineral, ésta es

la descripción simplificada de lo que constituye básicamente a un proceso de biolixiviación.

Se han encontrado diversas especies de microorganismos relacionados con la biolixiviación, dentro de la clasificación de las bacterias -discutida con anterioridad- aquellas asociadas a la oxidación de los minerales tienden a ser acidófilas o acidófilas extremas y mesófilas, termófilas o moderadamente termófilas. Las bacterias del género *Thiobacillus* (*Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*) son las más conocidas y utilizadas debido a que aparecen prácticamente en el agua de mina de cualquier lugar donde se hallen compuestos sulfurados. No obstante, existen otras bacterias que no pertenecen a tal género, ahora conocido como *Acidithiobacillus*<sup>(7)</sup>, y que intervienen también en la biolixiviación de manera importante, las quimiolitótrofas mesófilas: *Leptospirillum ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum*, además de la menos estudiada del género *Acidithiobacillus*: *Acidithiobacillus caldus*<sup>(9)</sup>. Existen pocos estudios reportados de bacterias que se desarrollen a temperaturas de 50°C y superiores, se sabe de algunos microorganismos que pueden sobrevivir a esas temperaturas en condiciones de biolixiviación, algunos de ellos incluyen al *A. caldus* y a algunos miembros del género *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* y *Acidimicrobium*<sup>(9)</sup>. Recientemente se ha incrementado el interés en la aplicación de procesos a altas temperaturas (65 – 80 °C) dado que las bacterias mesófilas pueden resultar ineficientes cuando se tienen minerales sulfurados complejos o cuando están presentes algunas especies metálicas dañinas para las bacterias<sup>(5)</sup>, por lo que se ha recurrido a microorganismos termófilos tales como *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus metallicus*, *Acidianus brierleyi* y *Metallosphaera sedula*<sup>(9,10)</sup>. Con esto se demuestra la gran variedad de vertientes y variables que involucran a los procesos de biolixiviación.

#### **1.2.4 *Acidithiobacillus ferrooxidans*.**

La bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* es la más importante dentro del género *Acidithiobacillus*, puesto que es la más común, y por ende la más utilizada en estudios de diversas escalas: laboratorio, planta piloto e industrial.

Por su morfología<sup>(11)</sup> se sabe que es un bacilo corto que tiende a encontrarse ya sea individualmente o en pares (diplobacilo, Ver: “1.2.2 Clasificación de las bacterias”), y cuyo tamaño oscila entre 0.4 y 1.0  $\mu\text{m}$ , es móvil y se agrupa en colonias pequeñas entre 0.5 y 1.0 mm. Éste bacilo crece en temperaturas que van desde los 10 hasta los 37  $^{\circ}\text{C}$ , sin embargo opera en condiciones óptimas en el rango de los 30-35 $^{\circ}\text{C}$ , por lo que se le clasifica como mesófila; se le encuentra en pH's desde 1.3 hasta 4.5, pero actúa de manera óptima en pH's cercanos a 2.0 es decir, es acidófila. Es una bacteria Gram Negativa (por su respuesta a la tinción de Gram) y por la manera en la que obtiene sus nutrientes se le clasifica como quimiolitótrofa autótrofa, puesto que obtiene su energía a partir de reacciones químicas de oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  y la transformación de especies del azufre, además de que su consumo de carbono proviene del  $\text{CO}_2$  del ambiente. Se sabe que es una bacteria aerobia obligada puesto que requiere de consumos de oxígeno incluso superiores al 21%<sup>(5)</sup> y que se reproduce por fisión binaria (Ver: 1.3.1 “Crecimiento de bacterias durante la biolixiviación”).<sup>(12)</sup>

A este microorganismo se le considera el principal responsable de la generación de aguas ácidas (drenaje ácido de minas) en ambientes asociados a los depósitos sulfurados de las minas, debido a que la biooxidación de marcasitas y piritas, genera soluciones fuertemente oxidantes compuestas por el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). No obstante, en ausencia de  $\text{Fe}(\text{II})$ , su principal fuente de energía proviene de la oxidación del azufre y la transformación de sus especies químicas. Si bien hasta hace unos años, el mecanismo por el cual el *A. ferrooxidans* se involucraba en la lixiviación de minerales era motivo de debate constante entre los investigadores, hoy se reconoce que existen dos mecanismos

que actúan al mismo tiempo durante este proceso<sup>(13,14)</sup>, mismos que se explicarán más adelante (Ver: “1.2.6 Mecanismos de biolixiviación por *A. ferrooxidans*”).

### **1.2.5 *Acidithiobacillus thiooxidans*.**

Dentro del género de las bacterias *Acidithiobacillus*, la especie *Acidithiobacillus thiooxidans* es una de las más importantes debido a que frecuentemente se encuentra asociada con la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Las características de ambos microorganismos son muy similares, puesto que se trata de bacterias mesófilas y acidófilas es decir, crecen de manera óptima a 35°C y a valores de pH de 2.0 e inferiores. Al igual que *A. ferrooxidans*, ésta bacteria es un bacilo Gram negativo de tamaño entre 0.5 y 2.0 µm, posee un flagelo polar que le da movilidad. No obstante sus similitudes, *Acidithiobacillus thiooxidans* no puede oxidar los compuestos de hierro como fuente energética, mas sí puede hacerlo con azufre elemental y compuestos sulfurados –se encuentra clasificada como quimiolitótrofa autótrofa- produciendo de ello ácido sulfúrico, por lo que se trata de uno de los organismos más tolerantes a medios ácidos, siendo capaz de crecer y reproducirse a valores de pH cercanos a cero.

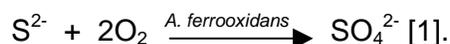
Quizá la mayor diferencia entre *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans*, es que la primera puede usar carbono orgánico como fuente de éste elemento, por lo anterior se tiene la certeza de que éste desempeña un papel importante cuando se le relaciona con *A. ferrooxidans* en la destrucción de compuestos orgánicos perjudiciales para el segundo.

De manera concreta se tienen reportes de que en la disolución de pirita con *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, éste último evita la formación de películas de compuestos de azufre en la superficie del mineral, típicas en el proceso de oxidación vía *A. ferrooxidans*, puesto que la disolución de Fe<sup>2+</sup> es más rápida que la de especies del azufre<sup>(15)</sup>.

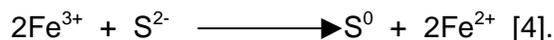
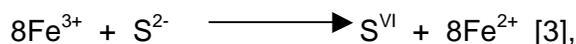
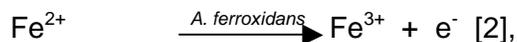
### 1.2.6 Mecanismos de biolixiviación por *A. ferrooxidans*.

De forma general, la biolixiviación es un proceso donde se produce solubilización o liberación de compuestos inorgánicos por la acción de microorganismos. La biolixiviación de minerales es el proceso donde microorganismos como *A. ferrooxidans* son utilizados como catalizador de las reacciones de oxidación de sulfuros y/o azufre elemental al igual que de otras especies químicas tales como el  $\text{Fe}^{2+}$ , logrando la liberación de los iones metálicos de interés para la metalurgia extractiva. Los mecanismos a través de los cuales esto ocurre fueron propuestos en 1964 por Silverman y Erlich<sup>(13)</sup>, quienes afirmaron que existen dos formas básicas para que las bacterias logaran la oxidación de los minerales, estas son el mecanismo directo y el indirecto<sup>(16)</sup>.

En el **mecanismo directo** (también llamado *biolixiviación por contacto*), los microorganismos se adhieren a la superficie del mineral para condicionar y facilitar la disolución electroquímica del mismo por medio de iones  $\text{Fe}^{3+}$ , mismos que se encuentran contenidos dentro de capas de exopolímeros producidos por las células bacterianas para fijarse sobre la superficie del mineral<sup>(13)</sup>. El mecanismo directo puede visualizarse de acuerdo con la siguiente reacción:



En el **mecanismo indirecto** de biolixiviación los microorganismos no se adhieren a las partículas de mineral sino que se quedan suspendidos en la solución, por lo que la lixiviación se encuentra en función de la renovación del agente lixivante es decir, el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ )<sup>(13)</sup>. Para ello se llevan a cabo las siguientes reacciones químicas:



Se puede observar que la bacteria oxida al ion ferroso obteniendo energía a partir de la reacción química [2], y que el ion férrico resultante lixivia al mineral sulfurado de acuerdo con las reacciones [3] y [4] obteniéndose el ion ferroso que será utilizado nuevamente por los microorganismos para obtener energía para su ciclo vital, continuando el proceso de manera cíclica.

A pesar de los debates recurrentes para saber cuál de los dos mecanismos es el que describe realmente el proceso, numerosas investigaciones indican la existencia de ambos, por lo que en 1999, Tributsch propuso la existencia de un tercer mecanismo de biolixiviación: el **mecanismo cooperativo**<sup>(13, 17)</sup>.

En el mecanismo cooperativo los microorganismos adheridos a la superficie del mineral cooperan con aquellos que se encuentran libres en solución, las bacterias adheridas liberan especies metálicas oxidables (como  $Fe^{2+}$ ) que son aprovechadas como fuente de energía por las bacterias que se encuentran en el seno de la solución. En este caso en particular, las reacciones que ocurren son todas las anteriores (reacciones[1],[2],[3] y [4]).

Desde luego, esto es sólo un acercamiento a los mecanismos de lixiviación por acción de microorganismos (en el caso específico de *A. ferrooxidans*), nótese que la reacción 1 puede realizarse también por *A. thiooxidans*, además que está demostrado que bacterias como *Leptospirillum ferrooxidans*<sup>(13)</sup> actúan bajo la misma dinámica, aún cuando sus procesos metabólicos difieren de los de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*. De igual forma, los mecanismos antes descritos se encuentran simplificados debido a que la forma en la cual actúan los microorganismos en función de cada mineral sulfurado difiere para cada caso aún cuando en esencia se lleva a cabo el mismo proceso. Por otra parte, una revisión exhaustiva de los mecanismos de disolución bacteriológica de minerales requiere de estudios avanzados sobre la bioquímica de los procesos metabólicos de las bacterias involucradas<sup>(18)</sup>, mismos que no son el objetivo primario del presente trabajo.

### **1.3 Biolixiviación de minerales.**

#### **1.3.1 Variables que rigen los procesos de biolixiviación.**

En las secciones anteriores se ha explicado que para que las bacterias sobrevivan requieren fundamentalmente de agua, una fuente de carbono y una fuente de energía<sup>(6)</sup>, adicional a esto es necesario recordar que además las bacterias en general crecen en ambientes con características de acidez, temperatura, concentraciones de oxígeno y radiaciones, específicas para cada especie. También se ha mencionado que en las condiciones propias de las minas, las bacterias que allí pueden hallarse se encuentran especialmente adaptadas a valores muy ácidos de pH, son mesófilas o termófilas, son aerobias obligadas y extraen el carbono que requieren a partir del CO<sub>2</sub> presente en el aire. Lo anterior debe de tomarse en cuenta dado que estas bacterias se utilizan para procesos de biolixiviación.

Para que el crecimiento y reproducción de los organismos ferrooxidantes y tiooxidantes sea favorable, se controla la acidez de las soluciones en las que éstas bacterias viven; como se mencionó en el apartado 1.2.4, el pH adecuado para tales efectos es 2.0; de igual manera, la temperatura a la cual se lleva a cabo el proceso no deberá estar en detrimento de las funciones vitales de los microorganismos y en consecuencia, dependiendo del tipo de bacteria –ya sea mesófila o termófila- deberán estar a una temperatura de 35 °C ó 70°C respectivamente; así mismo, las bacterias deben mantenerse en medios acuosos donde el paso de aire no se vea obstaculizado, por un lado para brindarle sus requerimientos básicos de agua y por otro para proporcionarle el aire que demanda tanto para tomar oxígeno como CO<sub>2</sub>, este último como fuente de carbono; sus requerimientos energéticos son proporcionados por medios de cultivo de composición determinada, que permiten que las reacciones químicas -que los microorganismos utilizan como fuente de energía- se lleven a cabo.

### 1.3.2 Monitoreo del crecimiento bacteriano.

La reproducción de las bacterias del género *Acidithiobacillus* se lleva a cabo por fisión binaria a una velocidad máxima promedio de cada 20 minutos<sup>(12)</sup>, a esta velocidad, si no existiesen factores adversos, una sola bacteria sería capaz de dar origen a 250 000 en tan sólo seis horas. Los microorganismos no sostienen estos ritmos de reproducción debido a que en tales condiciones la falta de alimento y la inhibición por acumulación de productos de desecho resultan evidentemente adversos.

En estudios de laboratorio, cuando una bacteria es inoculada en un medio de cultivo, se observan los siguientes periodos de crecimiento<sup>(12)</sup>:

a) Fase inicial estacionaria, de latencia, o fase lag.

En esta fase se presenta muy poca actividad bacteriológica, ello se debe a que las bacterias se encuentran en una etapa de adaptación a las condiciones del medio de cultivo (acidez, temperatura, composición) antes de presentarse la división celular.

b) Fase logarítmica.

En esta etapa los microorganismos se reproducen a su velocidad máxima, por tanto su número se incrementa por progresión geométrica, esto significa que se está llevando a cabo la fisión binaria de las células. Este periodo se identifica fácilmente en una gráfica del logaritmo del número de bacterias contra tiempo como una línea recta.

c) Fase estacionaria.

Durante esta fase, las bacterias están muriendo a la misma velocidad a la que se están formando.

d) Fase de muerte.

Generalmente, después de 18 a 24 horas, la proporción logarítmica de células viables de reproducción a las no viables, es menor conforme al avance del tiempo debido a diferentes factores tales como el agotamiento de los nutrientes, falta de oxígeno, acumulación de los productos tóxicos y la falta de espacio.

La habilidad de los microorganismos de crecer y realizar su función específica (la biolixiviación) está limitada por la disponibilidad de alimento para sus requerimientos energéticos, los cambios que ocurren en el medio de cultivo -tales como el pH de la solución y la concentración de iones de metales pesados, entre otros- e incluso a las condiciones hidrodinámicas que permitan la adherencia de las bacterias a las partículas de mineral así como el suministro constante de oxígeno y dióxido de carbono. No obstante todas las variables que deben considerarse, una vez pasado el periodo de adaptación de las bacterias, el proceso de cultivo y/o biolixiviación se lleva a cabo autorregulándose a sí mismo.

#### **1.4 Antecedentes geográficos.**

##### **1.4.1 Tizapa (Peñoles - Dowa Mining – Sumitomo Corp.).**

Las bacterias *Ac. ferrooxidans* y *Ac. thiooxidans* utilizadas en el presente trabajo, provienen del agua de mina que se encuentra al interior del complejo minero Tizapa. La Compañía Minera Tizapa S. A. de C. V., localizada en Zacazonapan, Estado de México, produce concentrados de zinc, plomo y cobre; posee una capacidad de molienda de 540,000 toneladas por año, mismas que son proveídas por una mina subterránea de sulfuros masivos. Actualmente la participación accionaria corresponde en un 51% a Peñoles, 39% para Dowa Mining y 10% de Sumitomo Corp.

De acuerdo con la carta Geológico-Minera de la zona de Michoacán-Guanajuato-Estado de México<sup>(20)</sup>, la mineralización de las menas de la zona se produjo en 3 eras geológicas distintas, en el jurásico tardío se llevó a cabo la mineralización de sulfuros masivos, mientras que las menas cupríferas se desarrollaron en el periodo cretácico a causa de la aparición del eje Neovolcánico Transversal, finalmente las vetas auroargentíferas de la zona se desarrollaron en el mioceno tardío. Los minerales

principales son esfalerita, galena, pirita y argentita, con un zoneamiento de Zn-Pb-Ag de SO al NE, aumentando las perspectivas de mineral de plata hacia el NE.

#### **1.4.2 Noche Buena (Seabridge Gold Incorporated).**

La otra cepa utilizada en este estudio para la biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino fue obtenida del complejo Minero Noche Buena, ubicado en el estado de Sonora, México. Desde 1991, la compañía Minera Noche Buena S. A. de C. V., realizó la exploración y explotación de diversas zonas del complejo, convirtiéndose en Minera Hecla S. A. de C. V. (una concesión de Hecla Mining Company) en 1997, hasta que, por el bajo contenido metálico de las vetas, éstas dejaron de producir. Actualmente, la concesión para la explotación de este complejo minero se encuentra en manos de Seabridge Gold Incorporated, empresa de origen canadiense<sup>(21)</sup>.

De acuerdo con la carta Geológico-Minera de la Zona de Puerto Peñasco, Sonora<sup>(22)</sup>, la Mina Noche Buena se encuentra dentro de la zona mineralizada de la Herradura. La zona mineralizada La Herradura es la que presenta mayor interés por contener depósitos de oro encajonados en granitos, rocas metavolcánicas y metasedimentarias, la mineralización está emplazada en vetas de rumbo predominante NO-SE, como en la mina La Herradura que se encuentra actualmente en operación con reservas de 67.6 millones de toneladas y ley media de 1.11 g/t de Au. En las minas Carina, Carolina (El Socorro) y El Sahuaro existen vetas de cuarzo con oro visible con valores de 13.7, 13.3 y 17.1 g/t respectivamente. La mina Noche Buena tiene valores de 1.8 g/t de Au en veta.

### **1.4.3 San José de Avino (Avino Silver & Gold Mines Ltd.).**

El concentrado que se lixivió durante el presente estudio proviene de la Compañía Minera Mexicana de Avino S. A. de C. V., conocida actualmente como Avino Silver & Gold Mines Ltd., compañía de origen canadiense que posee el 49% de la concesión. La mina se ubica en Durango, México, y dentro de los valores metálicos que contiene se encuentran: oro, plata, cobre y plomo<sup>(23)</sup>. Desde 1974 y hasta 2001, Avino Silver & Gold Mines Ltd. en conjunto con la Compañía Minera Mexicana de Avino S.A. de C. V. extrajeron 497 toneladas de plata, 3 toneladas de oro y 11 000 toneladas de cobre. Sin embargo debido a la caída del precio de la plata en el mercado internacional en 2001, la mina suspendió operaciones.

La carta Geológico-Minera de la zona de Durango, Durango y Sinaloa<sup>(24)</sup>, se divide en 8 zonas mineras; junto a Tejaman, Coneto, San Lucas de Ocampo, Sierra de la Silla y el Cerro de Minitas, Avino se encuentra en la denominada “Faja de la plata”, que es una región polimetálica de plata, plomo, zinc y oro, cuyo origen se encuentra en las rocas sedimentarias de los periodos jurásico-cretácico en la era mesozoica y en las rocas andesitas del periodo eoceno en la era cenozoica.

*“You saved me, raised me, dirtied my soul...  
and loved me.”*  
Millia Rage. Guilty Gear XX: The Midnight Carnival.

## **CAPÍTULO 2: DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

### **2. Desarrollo Experimental.**

#### **2.1 Reactivos, Material y Equipo utilizado.**

##### **Reactivos**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico).

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (sulfato de amonio).

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de potasio dibásico).

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (sulfato de magnesio heptahidratado).

KCl (cloruro de potasio).

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (nitrato de calcio).

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (sulfato ferroso heptahidratado).

S (azufre elemental).

CH<sub>3</sub>COOH (ácido acético glacial).

C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>.HCl.H<sub>2</sub>O (lorhidrato de ortofenantrolina monohidratado)

NH<sub>2</sub>OH.HCl (clorhidrato de hidroxilamina).

NaF (floruro de sodio).

CuFeS<sub>2</sub> (concentrado de calcopirita).

##### **Material**

Matraces Erlenmeyer 250 mL.

Electrodo combinado para medir potencial redox con referencia interna de Ag/AgCl.

Electrodo combinado para medir pH con referencia interna de Ag/AgCl.

Material de laboratorio común.

## **Equipo**

Incubador con Agitación Orbital marca Barnstead Lab-line, modelo SHKE4000.

Microscopio de Contraste de Fases marca Leica, modelo DME.

Espectrofotómetro UV-Visible marca GBC, modelo Cintra 5.

Potenciómetro marca Cole-Parmer, modelo 05669-20.

## **2.2 Caracterización del concentrado de calcopirita.**

La muestra utilizada en el presente trabajo fue un concentrado de calcopirita obtenido por flotación, proporcionado por la Compañía Minera Mexicana de Avino S. A. de C. V.

El estudio mineralógico de la muestra, realizado por el Consejo de Recursos Minerales (hoy Servicio Geológico Mexicano), reveló que el concentrado posee un tamaño de partícula entre 70 y 150  $\mu\text{m}$ . y sus componentes básicos son calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), calcosita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), covelita ( $\text{CuS}$ ), digenita ( $\text{Cu}_9\text{S}_5$ ), bornita ( $\text{Fe}_5\text{CuS}_4$ ), Ag nativa, Au nativo y Argentita ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ).

Para complementar esta información, se sometió a la muestra a un análisis químico cuantitativo por vía húmeda a fin de determinar el porcentaje de Cu, Fe y Zn; de igual forma, se envió una muestra del concentrado a difracción de rayos X para identificación de sulfuros metálicos; y se observó la morfología del mineral al microscopio electrónico de barrido. Todos estos estudios se llevaron a cabo en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **2.3 Selección de cepas.**

Los microorganismos utilizados para desarrollar el presente trabajo fueron 2 cepas provenientes de los complejos mineros Tizapa y Noche Buena, ambas conteniendo a la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*; y la cepa Tizapa que contenía además a la bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans*. Las bacterias de Tizapa fueron obtenidas a partir de

agua de mina de ese lugar, mientras que la cepa proveniente de Noche Buena fue reactivada a partir de los cultivos disponibles en el laboratorio de Metalurgia Extractiva de la Facultad de Química.

## 2.4 Preparación de Medios de Cultivo.

Para la realización de este estudio, se utilizó como medio de cultivo al medio basal 9K (10 fold 9K)<sup>(25)</sup> enriquecido con Fe(II), azufre elemental o concentrado de mineral, para el caso de bacterias ferrooxidantes, para bacterias tiooxidantes y para el caso de la cinética de biolixiviación, respectivamente. El medio de cultivo 9K fue desarrollado en 1959 y actualmente se sigue usando como base para cultivar bacterias de diversos tipos, adicional a los nutrientes básicos se ajusta el pH de la solución a 2.0 con ácido sulfúrico.

El medio 9K posee la siguiente composición:

<b>Tabla 2. Composición del Medio basal 9K.</b>	
Reactivo	g/dm <sup>3</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5
KCl	0.1
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.01
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O*	44.22
S**	10

\*Utilizado para medios de cultivo selectivos de bacterias ferrooxidantes.

\*\*Utilizado para medios de cultivo selectivos de bacterias tiooxidantes.

## 2.5 Preparación y reactivación de cultivos.

La activación de las cepas Tizapa se realizó inoculando la muestra del agua de mina en el medio de cultivo 9K en presencia de Fe (II) y de S<sup>0</sup> para desarrollar las bacterias ferrooxidantes y tiooxidantes, respectivamente.

la **reactivación** de la cepa de bacterias ferrooxidantes Noche Buena se llevó a cabo a partir de microorganismos derivados de la muestra proporcionada por el Centro Experimental del Noroeste (Chihuahua) perteneciente al servicio Consejo de Recursos Minerales. Esta reactivación se realizó inoculando la cepa almacenada en medio de cultivo 9K rico en Fe(II).

Una vez preparados los cultivos de las dos cepas de bacterias ferrooxidantes tipo *A. ferrooxidans* y la cepa de bacterias tiooxidantes tipo *A. thiooxidans*, fueron mantenidos en un incubador con agitación orbital marca Barnstead-Lab-Line modelo SHK64000, con condiciones para el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias. Para evitar la contaminación de los cultivos, éstos fueron protegidos con torundas de algodón y gasa, materiales que permiten el paso del aire requerido por los microorganismos. Se monitorearon periódicamente los parámetros: pH, potencial redox, número de bacterias por mL de medio líquido (Ver: "2.6 Monitoreo de los parámetros del crecimiento bacteriano") y adicionalmente las pérdidas por evaporación de agua fueron compensadas adicionando agua destilada.

Las cepas se consideraron activas y aptas para contacto con minerales una vez realizados dos pases sucesivos inoculando 10% del cultivo anterior en medio de cultivo basal 9K con Fe(II) o con S<sup>0</sup>.

Una vez concluido el segundo pase de adaptación al medio de cultivo, se inoculó al 10% con el cultivo anterior una pulpa mineral de concentrado de calcopirita al 5% masa/volumen, procedimiento descrito como la adaptación de las bacterias al concentrado Avino. Al igual que en la etapa experimental anterior, se llevaron a cabo

pases sucesivos bajo las mismas condiciones de pH, temperatura y agitación; constituyendo el segundo pase la cinética de biolixiviación del concentrado de mineral de calcopirita<sup>(26, 27)</sup>.

## **2.6 Monitoreo de los parámetros del crecimiento bacteriano.**

Durante los pases de adaptación de los microorganismos tanto al medio de cultivo como al mineral, se llevó a cabo el control y monitoreo de los parámetros que permiten el seguimiento del crecimiento de las bacterias en sistemas como los antes descritos. Estos parámetros son:

- a) pH.
- b) Potencial de óxido-reducción (ORP).
- c) Número de bacterias por mililitro de cultivo.
- d) Ajuste de la concentración del medio de cultivo.

### **2.6.1 Medición y control del pH del sistema.**

Los valores de pH de los sistemas se determinaron con un potenciómetro de marca Cole Parmer, modelo 05669-20 y un electrodo combinado para medir pH cuya referencia interna fue Ag/AgCl. En el caso de que el pH del sistema aumentara, este valor fue ajustado a 2.0 con solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% volumen.

### **2.6.2 Medición del potencial de óxido-reducción (ORP) del sistema.**

La medición del potencial de óxido-reducción para cada sistema se realizó con el equipo al cual se hizo referencia en el punto anterior, el electrodo utilizado para la medición de potencial redox fue un electrodo combinado para medir potencial redox con referencia interna de Ag/AgCl.

### **2.6.3 Monitoreo del número de bacterias (conteo).**

El crecimiento de la población bacteriana se estima a partir del conteo directo del número de bacterias sobre una muestra del cultivo, realizado en una cámara Neubauer ( $1/400\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm}$ ). Los resultados arrojados por el conteo del número de células por campo de la cámara permite conocer la concentración de bacterias por mL. de licor lixiviado. El conteo se llevó a cabo en un microscopio marca Leica, modelo DME equipado con un sistema de contraste de fases.

### **2.6.4 Ajuste de la concentración del medio de cultivo.**

Debido a la evaporación de agua en los sistemas de biolixiviación, la concentración del medio de cultivo puede variar, por lo que fue necesario que esta se ajustara durante el control de los otros parámetros; para ello se adicionó agua destilada en la misma proporción a aquella que se perdía, es decir manteniendo constante el peso de cada sistema.

### **2.7 Estudio de la cinética de biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino.**

Una vez que por selección natural las bacterias estaban adaptadas a las condiciones necesarias para la biolixiviación, la siguiente etapa experimental corresponde a la cinética de biolixiviación.

Para el estudio de la cinética de biolixiviación, se formó una pulpa de mineral al 5% masa/volumen a partir del concentrado de calcopirita Avino en medio basal 9K y 10% del inóculo del pase anterior, y esta fué sometida a las mismas condiciones de acidez, temperatura y agitación de los cultivos anteriores. De igual forma, se monitorearon (y se controlaron cuando fue necesario) los parámetros de biolixiviación. Adicionalmente, se estudió la disolución de las diferentes especies metálicas provenientes del concentrado Avino:  $\text{Cu}^{2+}$ , Fe total y  $\text{Zn}^{2+}$ .

Para asegurarse que la disolución de metales corresponde a un proceso de biolixiviación, se corrió una prueba “testigo” que se define como: mismo tratamiento en condiciones estériles. Para asegurarse que este testigo permaneciera estéril, se le agregó periódicamente –es decir, durante cada control- solución etanólica de Timol al 5%, sustancia conocida por sus propiedades bactericidas.

## **2.8 Caracterización del residuo del proceso de biolixiviación.**

Una vez realizadas las pruebas de biolixiviación del mineral de calcopirita Avino, se filtraron los licores de lixiviación para separar la fase sólida de la fase líquida, esta separación se realizó por medio de filtración al vacío sobre membranas de acetato de celulosa con porosidad de 0.4  $\mu\text{m}$ . Los residuos sólidos de este proceso fueron recolectados y secados para su posterior análisis vía Difracción de Rayos X y observación al Microscopio Electrónico de Barrido.

*"It was there that I saw you  
And it was there that I came.  
As evening sighs,  
Rises up against the sky-line  
Let me come and have my leis.*

*You were fair and fey as a sun that evil day  
We were bold and life was great,  
But as time went on  
I wondered what was wrong,  
I wondered what became of you."*

...And You Will Know Us by the Trail of Dead. It Was There (That I Saw You).

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **3. Resultados y Discusión.**

#### **3.1 Caracterización del concentrado de calcopirita Avino.**

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó un concentrado de calcopirita obtenido por flotación y proporcionado por la Compañía Minera Mexicana de Avino S. A. de C. V.. La caracterización de esta muestra se divide en dos partes: El análisis mineralógico realizado por el Consejo de Recursos Minerales, y la información complementaria que se obtuvo por los diferentes servicios que brinda la Facultad de Química para tal propósito.

##### **3.1.1 Caracterización de la muestra por el Consejo de Recursos Minerales.**

El estudio mineralógico del concentrado de calcopirita Avino realizado en el Centro Experimental Tecamachalco –pertenece al Consejo de Recursos Minerales- indica que el tamaño de partícula se encuentra entre 70 y 150  $\mu\text{m}$ . El estudio menagráfico señala que el mineral está compuesto por Au nativo, Ag nativa, Argentita ( $\text{Ag}_2\text{S}$ ), Calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), Calcosita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), Covelita ( $\text{CuS}$ ), Digenita ( $\text{Cu}_9\text{S}_5$ ) y Bornita ( $\text{Fe}_5\text{CuS}_4$ ). La caracterización química completa de la muestra se llevó a cabo utilizando varias técnicas para ello, los resultados de se pueden ver en la tabla 3.

**Tabla 3. Resultados del análisis químico de la muestra (CoReMi).**

Elemento	Cantidad (%)	Técnica
Cu	29.50	Absorción Atómica
Zn	1.54	Absorción Atómica
Fe	17.11	Absorción Atómica
Au	32.12 (g/ton)	Copelación
Ag	6479 (g/ton)	Copelación
S	27.64%	Gravimetría

### **3.1.2 Estudios de la muestra realizados en Facultad de Química.**

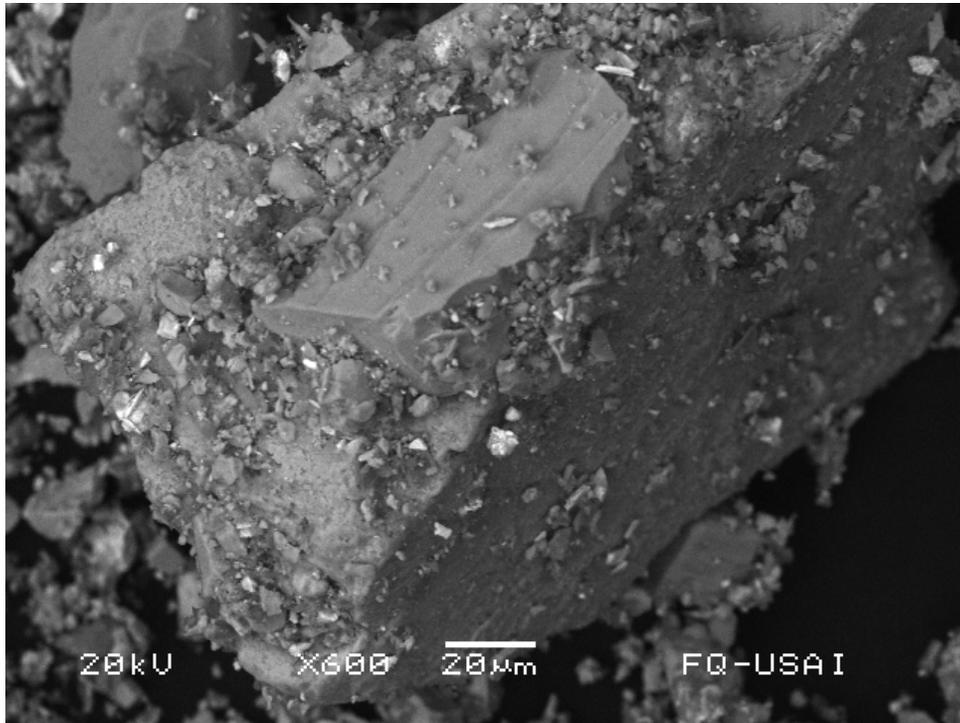
El estudio complementario de la muestra de concentrado de mineral de calcopirita consistió de análisis químico por espectroscopía de absorción atómica en la solución resultante del ataque ácido de la muestra; así como de difracción de Rayos X y microscopía electrónica de barrido.

El estudio de composición química por espectroscopia de absorción atómica realizado en el laboratorio de Análisis por vía húmeda arrojó los siguientes resultados:

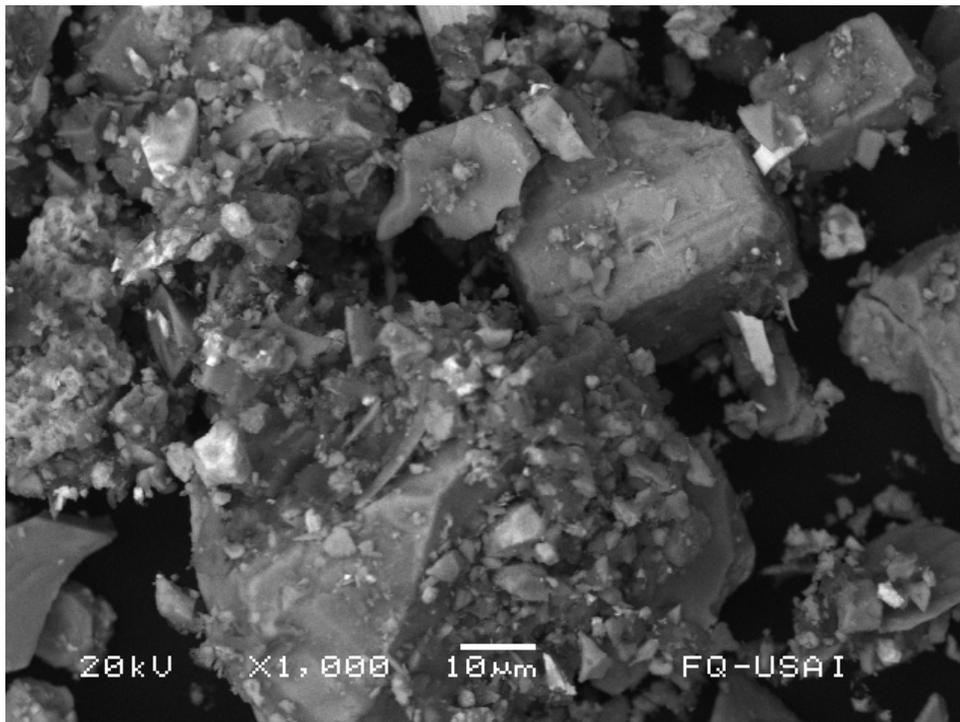
<b>Tabla 4. Resultados del análisis químico de la muestra (F. Q.)</b>	
Elemento	%Peso
Cu	25.41
Fe	15.74
Zn	1.16
As	0.11
Cd	0.19
Co	0.01
Pb	3.20
Mn	0.02

El estudio del concentrado Avino por difracción de Rayos X -realizado en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (U. S. A. I.) de la Facultad de Química de la U. N. A. M.- permitió identificar la presencia de sulfuros en el concentrado. Las fases minerales identificadas fueron: calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) como fase mayoritaria y pirita ( $\text{FeS}_2$ ), cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) y digenita ( $\text{Cu}_9\text{S}_5$ ) como impurezas; el difractograma se muestra en el Anexo I del presente trabajo.

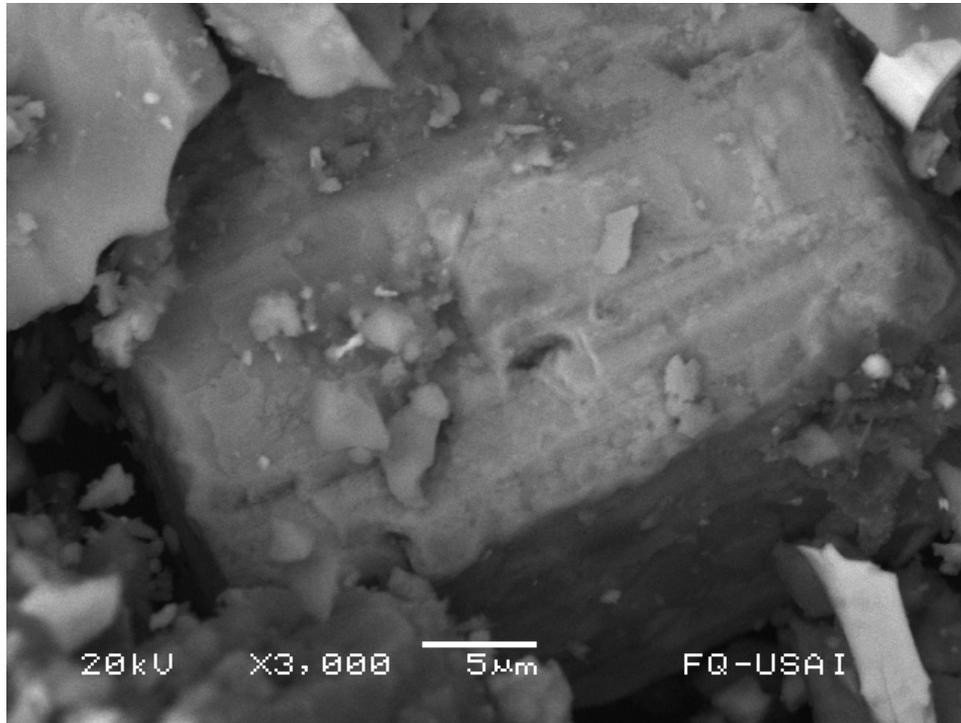
El concentrado de calcopirita fue observado al microscopio electrónico de barrido perteneciente a la U. S. A. I. de la Facultad de Química de la U. N. A. M. Las imágenes obtenidas son las siguientes:



**Figura 2a.** Micrografía por MEB obtenida a 600 aumentos.



**Figura 2b.** Micrografía por MEB obtenida a 1000 aumentos.



**Figura 2c.** Micrografía por MEB obtenida a 3000 aumentos.

**Figura 2.** Micrografía del concentrado de Calcopirita Avino.

En la micrografía se observa que el tamaño de partícula de la muestra es heterogéneo, no obstante con estas imágenes se puede apreciar de manera cualitativa el tamaño de partícula del concentrado analizado y se puede afirmar que si bien es cierto que existe una cantidad apreciable de partículas que se encuentran entre 70 y 150  $\mu\text{m}$ . según el reporte previo, existen otras de tamaño mayor o inferior al señalado en la información preeliminar.

Estos resultados se usan como referencia para la posterior comparación con la información arrojada por la caracterización del residuo del proceso de biolixiviación.

### **3.2 Activación y reactivación de cultivos.**

A continuación se presentan los resultados arrojados por el control y monitoreo de los parámetros que rigen el crecimiento bacteriano. De acuerdo con el procedimiento experimental establecido, se mantuvieron fijas las condiciones -con la metodología

establecida por el grupo de investigación en biohidrometalurgia de la Facultad de Química- para obtener cultivos de las bacterias tipo *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* al fijar la temperatura en 35°C, al conservar la agitación del sistema en 176 rpm y al permitir el paso de aire (fuente de oxígeno y CO<sub>2</sub>) a los reactores.

Durante esta primera etapa se prepararon 3 cultivos de bacterias mesófilas acidófilas, el primero de estos cultivos corresponde a la cepa de *Acidithiobacillus thiooxidans* proveniente del agua de mina del complejo minero Tizapa, el medio de cultivo correspondiente es el medio basal 9K y enriquecido con azufre elemental<sup>(15)</sup>; el segundo cultivo se trata de la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans*, misma que procede de las condiciones de la cepa anteriormente mencionada, el medio de cultivo utilizado para su activación corresponde al medio 9K enriquecido con Fe(II); el tercer cultivo preparado se trata de la cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* originaria del agua de mina del complejo minero Noche Buena, mismo que se ha utilizado en trabajos de biolixiviación previos a éste<sup>(26,27)</sup>, y que para efectos de este estudio recibió el mismo tratamiento de la cepa *A. ferrooxidans* Tizapa como parte de su reactivación.

Los cultivos mencionados anteriormente constituyen el inicio de la etapa de adaptación de las cepas a las condiciones de biolixiviación, y que en este estudio se denominan "Pases de adaptación al medio de cultivo", cada pase de adaptación al medio tuvo una duración aproximada de 20 días, al término de los cuales se extrajo el 10% de cada cultivo que fue inoculado en medios frescos de solución 9K enriquecida con azufre elemental o Fe(II), dependiendo de las características inherentes a cada cepa.

En los siguientes apartados se muestran los gráficos correspondientes a los monitoreos del potencial redox y del crecimiento de las bacterias tioxidantes y ferroxidantes, así como el comportamiento del pH de cada sistema.

### 3.2.1 Evolución del potencial de óxido-reducción durante los pases de adaptación.

El Potencial de óxido-reducción de un sistema cualquiera (también llamado Potencial redox) es un indicativo de la energía libre de éste; el potencial eléctrico y la energía libre se relacionan a través de la ecuación del trabajo eléctrico:

$$\Delta G^{\circ} = -nFE^{\circ} \quad [A].$$

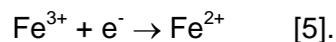
Así pues, el potencial eléctrico es una medida de la Energía de los sistemas, entre los que se encuentran todos los equilibrios químicos. En un sistema de biolixiviación, donde se llevan a cabo reacciones químicas de disolución de minerales a través del metabolismo de distintas bacterias, el potencial redox es un indicativo de la actividad de los microorganismos que catalizan tales reacciones.

El comportamiento típico del potencial redox en procesos de biolixiviación se encuentra en función de la actividad de las bacterias, misma que se puede visualizar a partir del crecimiento y desarrollo de las cepas, es decir que el potencial redox varía de acuerdo a cada etapa del crecimiento de un cultivo dado. En el Capítulo 1 de este trabajo se hace mención a las fases del crecimiento bacteriano, las cuales se distinguen por la velocidad de reproducción de las bacterias, tales fases son: la fase lag, la fase logarítmica y la fase estacionaria. La Gráfica 1 muestra la evolución del comportamiento del potencial de óxido-reducción desarrollado por los cultivos en función del tiempo; básicamente se observa un pequeño periodo correspondiente a la fase estacionaria de latencia, donde el potencial se encuentra a un determinado valor inicial; posteriormente se nota un incremento rápido y gradual en los valores de Eh (Potencial) para el caso de las cepas de *A. ferrooxidans*, mientras que para *A. thiooxidans* se observa un decremento del mismo, en ambos casos este cambio corresponde a la fase logarítmica de crecimiento de los microorganismos; finalmente durante la fase estacionaria de crecimiento, el potencial redox de los sistemas permanece estable en un valor que concierne al equilibrio químico

de la(s) reacción(es) que se lleva(n) a cabo, en las que las bacterias actúan como catalizadores.

Es importante señalar cuáles son los equilibrios químicos que se cuantifican con la medición del potencial de óxido-reducción, pues de ese modo se puede saber cómo está actuando cada tipo de cultivo sobre el concentrado.

La bacteria más estudiada dentro del género *Acidithiobacillus*, *A. ferrooxidans*, utiliza como fuente energética la transformación de Fe(II) a Fe(III), así como la oxidación de distintos compuestos del azufre. La oxidación de Fe(II) a Fe(III) se manifiesta como un valor de Potencial Redox de 0.771 V, mismo que corresponde a la siguiente reacción química:



Este valor de potencial de óxido-reducción corresponde a un estado estándar (25°C, 1 atmósfera de presión, pH = 0 y a concentración 1M de las especies químicas), por lo que para cuantificar el potencial redox de un sistema que no cumple con estas condiciones se utiliza la Ecuación de Nernst:

$$E_{M^{n+}/M^0} = E_{M^{n+}/M^0}^0 - \frac{RT}{nF} \ln Keq \quad [B],$$

donde E, es el potencial del sistema;  $E^0$ , el potencial estándar; R, la constante de los gases ideales; T, la temperatura absoluta; n, el número de equivalentes intercambiados; F, la constante de Faraday; y Keq es la constante de equilibrio del sistema. Esta ecuación cuantifica el efecto de la Temperatura y la concentración de las especies que participan en la reacción, arrojando un cálculo más acertado del valor de potencial de un sistema real. Para el caso de la biolixiviación por *A. ferrooxidans*, la variación de este parámetro depende de la razón existente entre la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , como se observa en la ecuación [C] correspondiente a la reacción química 5:

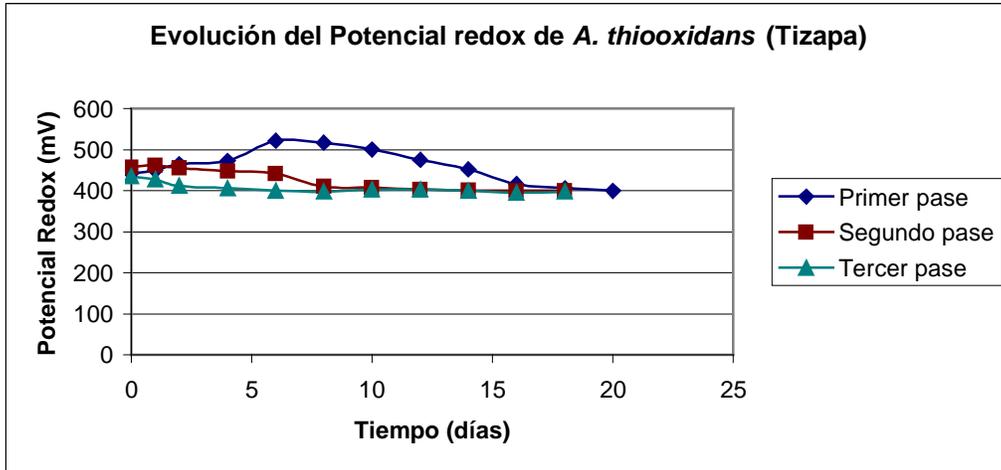
$$E_{Fe^{3+}/Fe^{2+}} = 0.771 + 0.059 \log \frac{[Fe^{3+}]}{[Fe^{2+}]} \quad [C].$$

Así, se entiende por qué en el Gráfico 1 b) y 1 c), el potencial se estabiliza en valores cercanos a 650 mV vs Ag/AgCl cuando se llega a la fase estacionaria de crecimiento de los microorganismos ferrooxidantes.

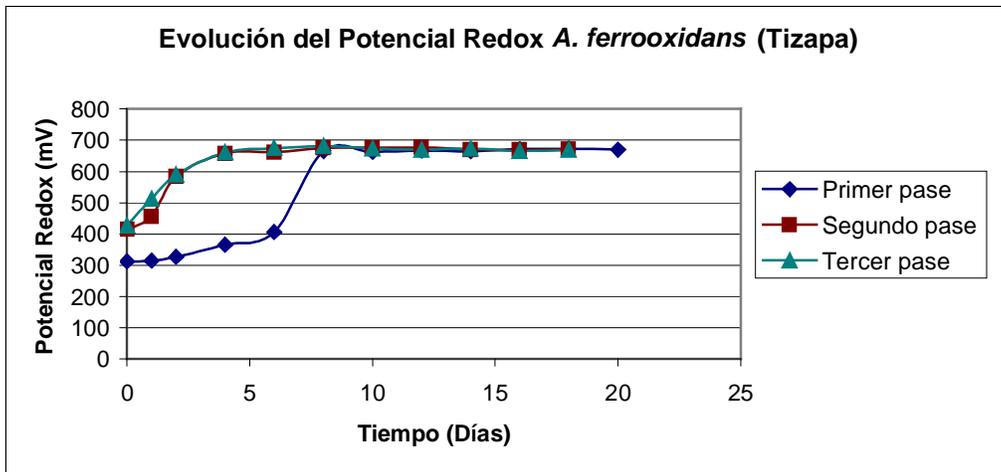
En el caso de *A. thiooxidans*, el valor de potencial observado durante los pases de adaptación corresponde a la oxidación de especies de azufre, sin embargo, en medios ácidos existen diversos equilibrios que pueden ocurrir<sup>(28)</sup>:

<b>Tabla 5. Algunos equilibrios de reacción de especies del azufre y su Potencial Redox.</b>	
Reacción Química	Potencial (V)
$S_2O_8^{2-} + 2e^- = 2SO_4^{2-}$	2.0
$SO_4^{2-} + 4H^+ + 2e^- = SO_2(aq) + H_2O$	0.17
$S_2O_6^{2-} + 4H^+ + 2e^- = 2H_2S_2O_3$	0.6
$2SO_2(aq) + 2H^+ + 4e^- = S_2O_3^{2-} + H_2O$	0.40
$S_4O_6^{2-} + 2e^- = 2S_2O_3^{2-}$	0.09
$S_2O_3^{2-} + 6H^+ + 4e^- = 2S + 3H_2O$	0.5
$S + 2H^+ + 2e^- = H_2S(g)$	0.14

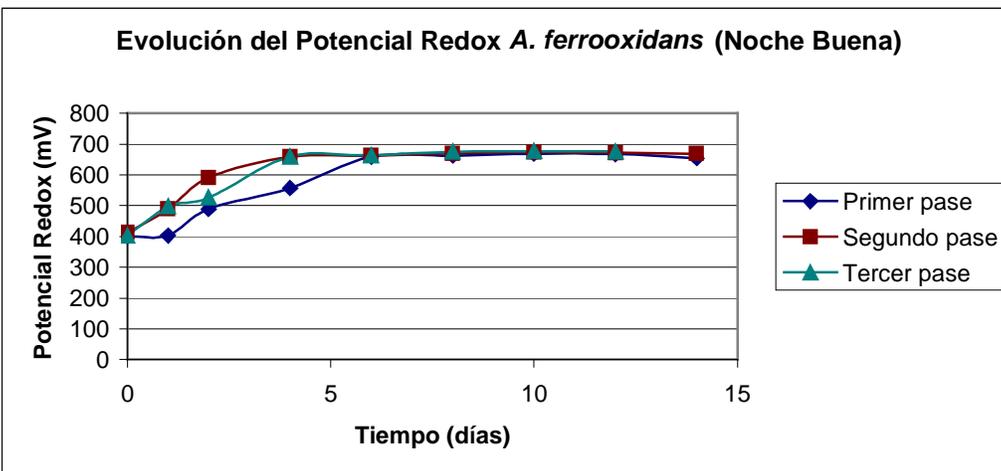
Así, el valor de Potencial Redox correspondiente a la actividad de *A. thiooxidans* durante la primera fase del experimento -aproximadamente 360 mV vs Ag/AgCl- se ve afectado no solo por varios equilibrios, sino además por la concentración de las especies químicas involucradas en esos equilibrios, lo cual se puede explicar por medio de la Ecuación de Nernst (Ecuación B).



a)



b)



c)

Gráfico 1 (a, b, c). Evolución del Potencial Redox de cada cepa durante la adaptación de las mismas al medio nutriente.

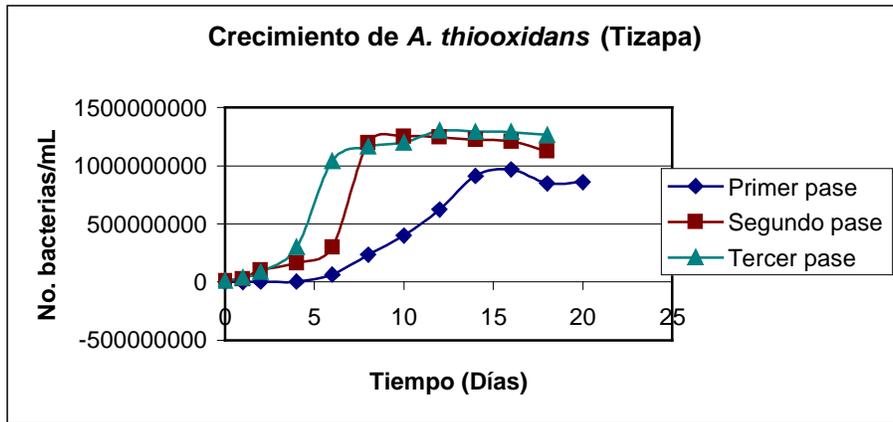
### 3.2.2 Monitoreo del crecimiento de los microorganismos durante su adaptación.

De acuerdo con lo que se ha mencionado en el Capítulo 1, en referencia al crecimiento de microorganismos en medios de cultivo, la existencia de fases de crecimiento bien identificadas en una gráfica “No. Células/mL vs Tiempo” permite conocer la forma en la cual se está desarrollando un cultivo específico. En este estudio, se construyeron las gráficas utilizando el factor correspondiente a las dimensiones de la cámara Neubauer, a fin de cuantificar el número de células bacterianas en 1 mL del medio en el que se encontraban.

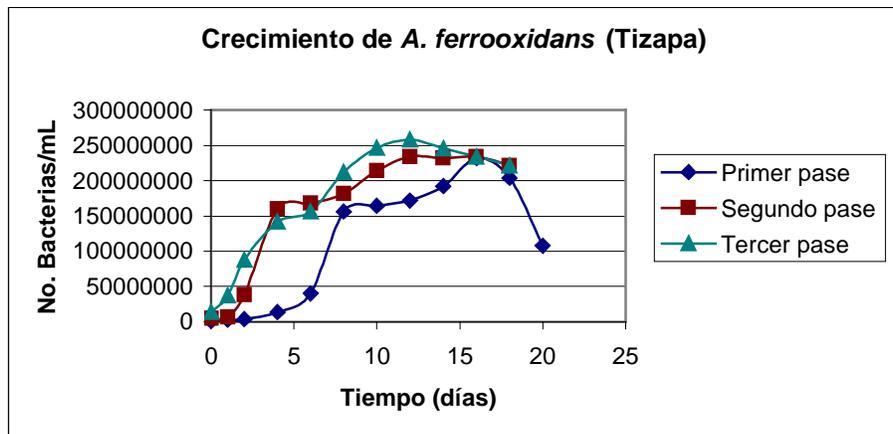
En los tres sistemas se pudo observar (Gráfico 2) la existencia de las tres fases de crecimiento de interés, es decir la fase de latencia (o fase lag), la fase logarítmica y la fase estacionaria. En general, la fase lag se observó durante los primeros dos días del estudio, la fase logarítmica se obtuvo a partir del día 2 y hasta el día 7 aproximadamente, por lo que la última parte de los resultados corresponden a la fase estacionaria; todo ello en un periodo de tiempo de 7 a 20 días como máximo. Nótese que en cada pase sucesivo los tiempos en los cuales los sistemas se encuentran en las primeras dos fases (la fase de latencia y la fase logarítmica) se acortan, teniéndose cultivos listos para su utilización en tiempos de 5 días aproximadamente.

En cuanto al desempeño de cada tipo de cepa, cabe mencionar que las bacterias de tipo ferrooxidante es decir, las cepas de *A. ferrooxidans* de Tizapa y de Noche Buena, crecen en la misma magnitud; mientras que para la cepa de *A. thiooxidans* de Tizapa se obtiene un mayor número de células bacterianas, y la diferencia es tan grande como un orden de magnitud. Se puede explicar la diferencia entre la cantidad de bacterias presentes en cada tipo de cultivo si se recuerda que las bacterias *A. ferrooxidans* al igual que las bacterias tiooxidantes pueden tomar su requerimiento energético de la transformación de las especies del azufre, por lo que en un cultivo de medio 9K enriquecido con azufre elemental es posible encontrar bacterias de la especie

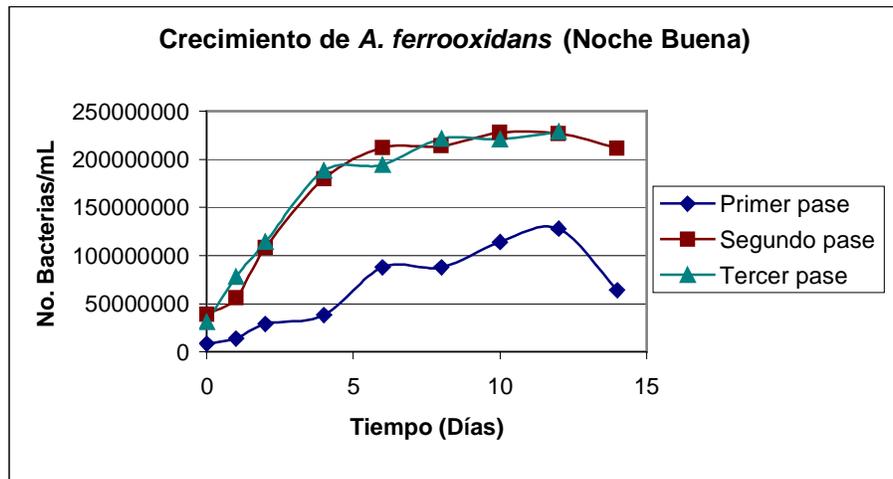
*A. thiooxidans* actuando de manera conjunta con *A. ferrooxidans*, y en consecuencia la cantidad de bacterias en el cultivo de bacterias tioxidantes es mucho mayor que en cultivos de bacterias ferrooxidantes.



a)



b)



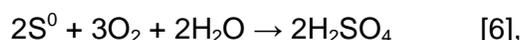
c)

Gráfico 2 (a, b, c). *Creimiento de las bacterias de cada cepa durante la fase de adaptación.*

### 3.2.3 Comportamiento del pH durante la adaptación de las cepas.

El pH es un indicador de la acidez o alcalinidad de las sustancias, como se mencionó en el capítulo anterior, tanto la bacteria *A.thiooxidans* como *A. ferrooxidans* son acidófilas es decir, se desarrollan en ambientes con pH ácido. Por esta razón se buscaba mantener en 2.0 el pH del medio de cultivo 9K, para que así no se viera afectado el crecimiento de los microorganismos.

Dado que el pH de los medios de cultivo se reajustó regularmente durante los primeros días de cada pase de adaptación no se muestran los resultados correspondientes. No obstante es conveniente explicar el por qué de los cambios en la acidez, mismos que obedecen a las fases de crecimiento de las bacterias. Durante los primeros días los cambios en el pH del medio de cultivo corresponden a la fase lag - donde las bacterias se adaptan a las condiciones que se les han impuesto- no obstante, las variaciones en la acidez no se deben a la actividad de las bacterias, sino al equilibrio mineral-solución; cuando los microorganismos se han acondicionado, es decir durante la fase logarítmica de crecimiento, éstos producen ácido sulfúrico a partir de la siguiente reacción:



lo cual se observa en los sistemas cuando ya no es necesario adicionarles  $H_2SO_4$  para que permanezcan en el valor de pH adecuado.

Como se mencionó durante la descripción de *A. thiooxidans* (Pág. 11) los valores de pH observados para esta cepa en particular son más bajos que en el caso de las dos cepas de *A. ferrooxidans*, siendo para el primer caso cercanos a 0.8 durante la fase de latencia (lag) y 1.4 para el segundo.

A continuación se presenta una tabla comparativa de la acidez de cada sistema al 5º día del estudio (una vez identificado el inicio de la fase logarítmica):

<b>Tabla 6. pH de los sistemas de estudio al inicio de la fase logarítmica de crecimiento.</b>			
Pase de Adaptación\Cepa	<i>A. thiooxidans</i> (Tizapa)	<i>A. ferrooxidans</i> (Tizapa)	<i>A. ferrooxidans</i> (Noche Buena)
Primero	1.37	2.00	2.03
Segundo	0.85	0.45	1.65
Tercero	0.8	0.43	1.58

### **3.3 Adaptación de las bacterias ferrooxidantes y tiooxidantes al concentrado Avino.**

Una vez presentados los resultados de la etapa previa al ataque de las bacterias al concentrado de calcopirita Avino, en esta sección se analizarán las principales diferencias encontradas entre los “pases de adaptación al medio” y los “pases de adaptación al mineral”.

Como se mencionó en el Capítulo 2, posterior al tercer pase de adaptación a las condiciones impuestas con el medio de cultivo, se realizó el ataque del mineral por medio de microorganismos (operación denominada biolixiviación). En trabajos de tesis en el área de biolixiviación de minerales, realizados por el grupo de investigación en biohidrometalurgia de la facultad de química de la U. N. A. M., se demostró que después del tercer pase de adaptación, los resultados obtenidos por un cuarto y quinto pases, tenían el mismo comportamiento que el tercero, razón por la cual al tercer pase de adaptación de los microorganismos al mineral se le puede considerar como un estudio cinético de biolixiviación<sup>(26,27)</sup>.

Para los pases de adaptación al mineral, el medio de cultivo utilizado fue el medio basal 9K, con la diferencia de que, en ésta ocasión los requerimientos energéticos necesarios para el crecimiento de los microorganismos fueron proporcionados por el

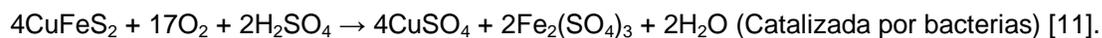
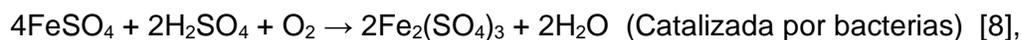
concentrado de calcopirita Avino, tanto para bacterias tiooxidantes como para las bacterias ferrooxidantes; adicional a lo antes descrito, se colocó un sistema estéril en ausencia de inóculo adicionándole 5mL de timol al 5% volumen, para mantener al sistema libre de bacterias.

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la evolución en el comportamiento del potencial de óxido-reducción de los sistemas así como los referentes al crecimiento de las bacterias en estos medios, se discute también el cambio en el pH de los medios de cultivo, así como la extracción de los metales de interés (Cu y Fe) para el tercer pase de adaptación (que constituye el estudio cinético de biolixiviación del concentrado Avino).

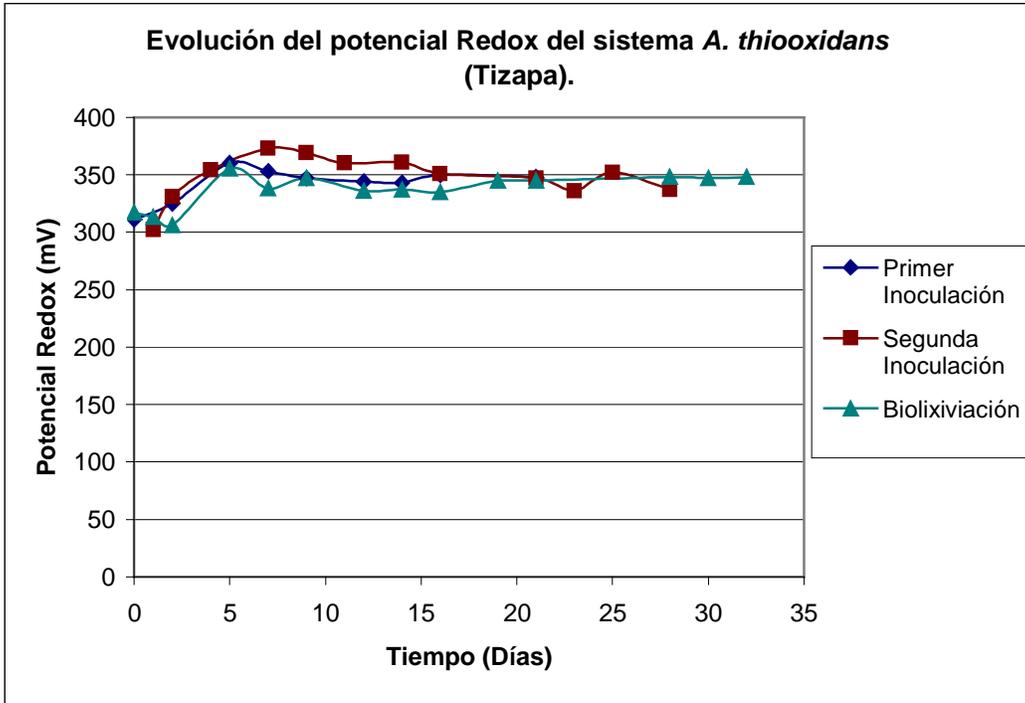
### **3.3.1 Evolución del potencial redox en la biolixiviación del concentrado Avino**

El Gráfico 3, presenta la variación del potencial de los sistemas de biolixiviación en función del tiempo en el cual se lleva a cabo este proceso. Sorpresivamente se puede observar, que con respecto al Gráfico 1 –donde se observaban valores de potencial redox de 650 mV para bacterias ferrooxidantes y 400 mV para bacterias tiooxidantes- el potencial ha caído cerca de los 350 mV para los tres sistemas estudiados y que, además, existe una variación casi insignificante entre cada pase de adaptación. Esto implica que en los tres sistemas (los dos ferrooxidantes y el tiooxidante) se lleva a cabo el mismo equilibrio, cuyo valor de potencial redox corresponde con el presentado por el sistema estéril.

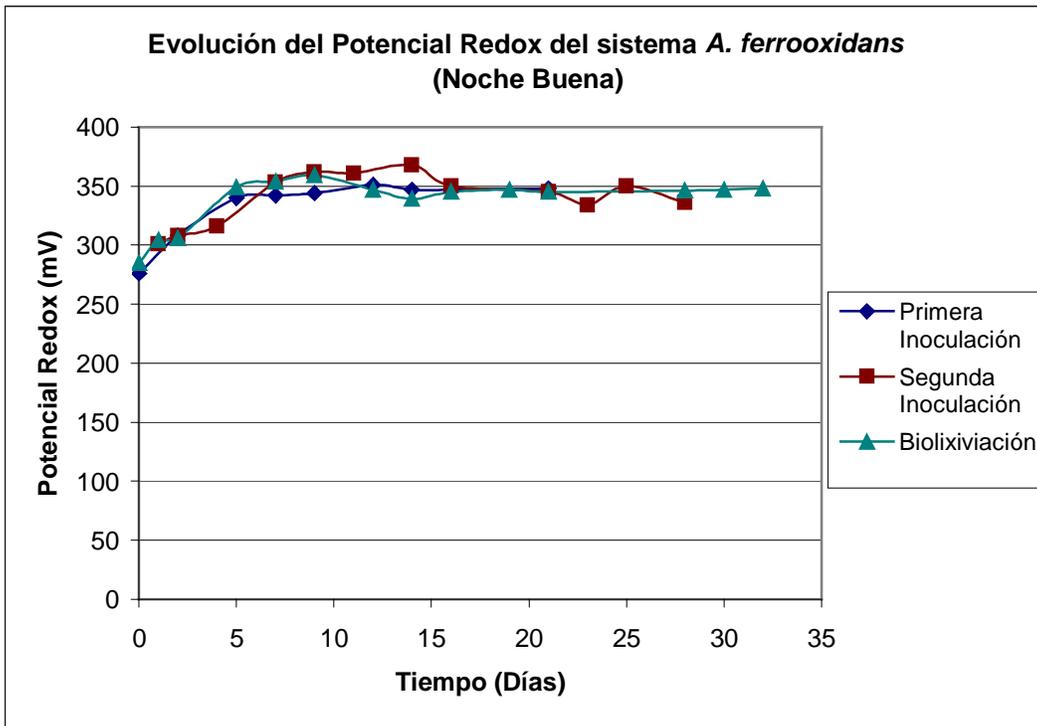
En un estudio de biolixiviación típico donde interviene la bacteria *A. ferrooxidans*, los valores de potencial redox alcanzados corresponden al equilibrio  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  (como se explicó en el apartado 3.2.1); para el caso de la lixiviación de la calcopirita se tienen las siguientes reacciones, que explican la disolución del mineral<sup>(7)</sup>:



Las reacciones 7 a 10 corresponden al ataque indirecto de la calcopirita, de lo cual se hizo mención en el Capítulo 1 del presente trabajo, mientras que la reacción 11 aplica para el caso del ataque biológico directo de la calcopirita. Ballester<sup>(13)</sup> afirma que lo más conveniente es pensar que ambos ataques ocurren al mismo tiempo de la forma en la que propuso Tributsch<sup>(17)</sup> al hacer referencia a la existencia de un mecanismo de ataque combinado. A pesar de que el mineral sea atacado tanto por bacterias, como por  $\text{Fe}^{3+}$  producto del metabolismo de los microorganismos que se encuentran libres en solución, se ha encontrado que en estos casos, el mecanismo de ataque indirecto actúa de manera más eficiente, por lo que el potencial que representa a un sistema de biolixiviación de calcopirita corresponde a valores de potencial cercanos a 0.771V, algunos estudios de biolixiviación de calcopirita reportan potenciales típicos de 0.500V<sup>(13,29)</sup>. Es correcto suponer que en el caso de la disolución del concentrado de calcopirita Avino, las reacciones 7 a 11 ocurren en presencia de bacterias de tipo ferrooxidante (Gráfico 3b y 3c), por lo que el valor de potencial redox para esos sistemas (cepas ferrooxidantes de Tizapa y Noche Buena) debería ser similar a los presentados en la etapa anterior (Gráfico 1b y 1c), no obstante esto no es así, y a juzgar por los resultados obtenidos en cada fase de adaptación al concentrado Avino se puede afirmar que para el caso específico de este estudio el equilibrio que ocurre entre las bacterias y el concentrado de calcopirita Avino es diferente al establecido en la literatura (0.500 V).



**Gráfico 3a.**



**Gráfico 3b.**

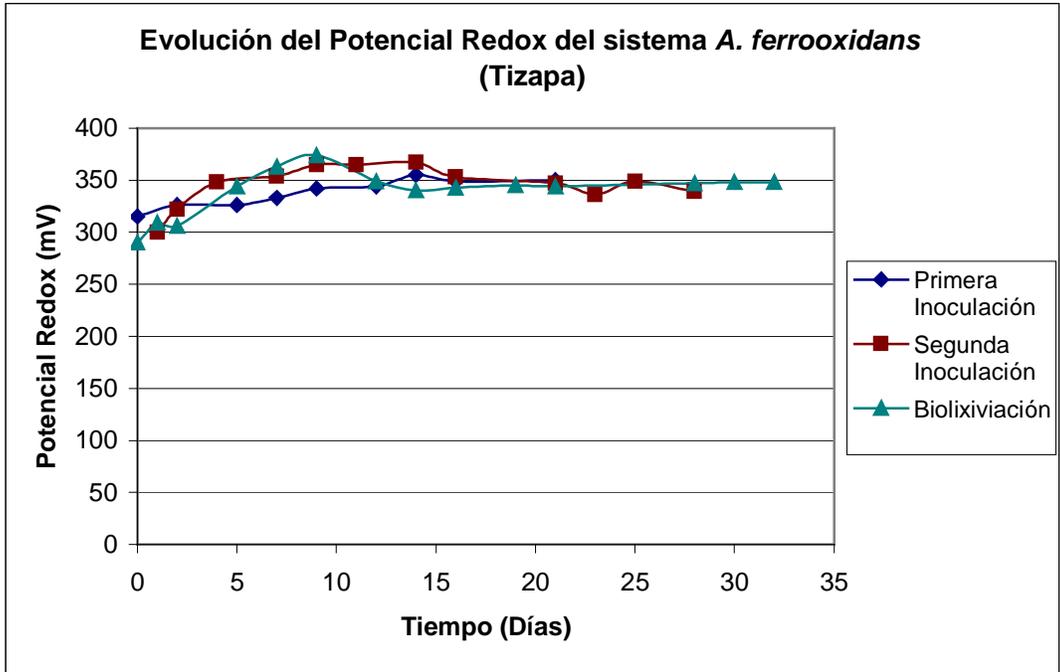


Gráfico 3c.

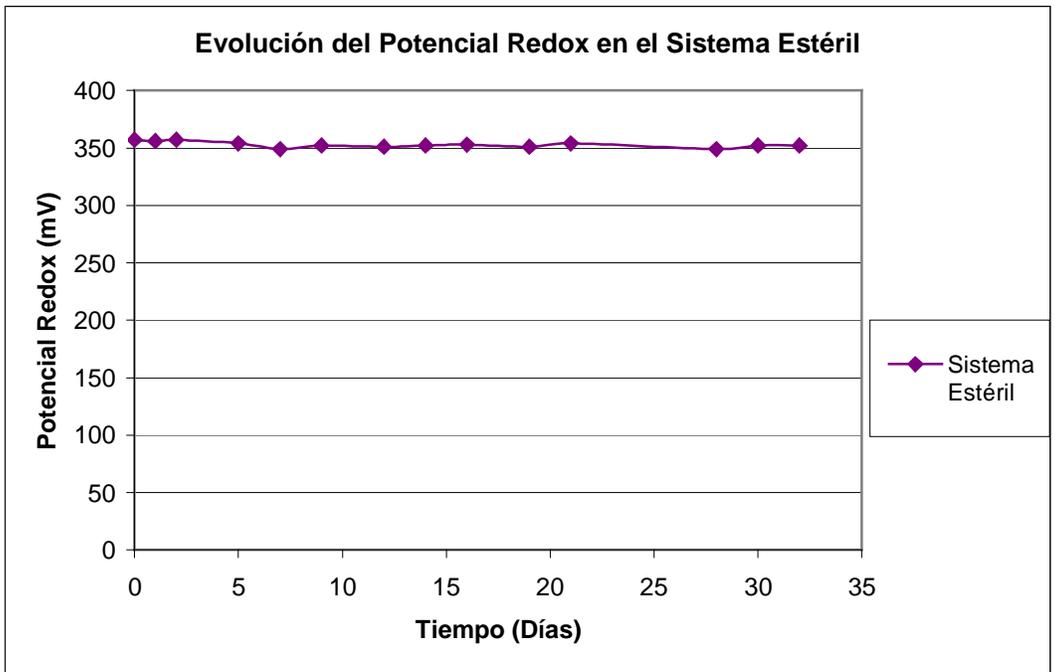


Gráfico 3d.

Gráfico 3 (a, b, c, d). Evolución del potencial redox durante los pases de adaptación al mineral.

Para el caso del estudio de biolixiviación de la cepa tioxidante Tizapa es conveniente recordar –como se dijo en la sección 3.2.1- que las bacterias obtenidas en la

fase anterior a la biolixiviación del concentrado Avino a partir de la cepa tioxidante son tanto *A. ferrooxidans* como *A. thiooxidans*, por lo que las reacciones 7 a 11 también ocurren durante ésta etapa, y por tanto los valores de potencial redox esperados corresponden al equilibrio  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ . Sin embargo, al igual que en el caso de las cepas de bacterias predominantemente ferrooxidante (es decir las cepas ferrooxidantes de Tizapa y Noche Buena), el potencial desarrollado en esta etapa del experimento no corresponde a lo que se encuentra en la literatura, es decir, potenciales similares a 0.500 V.

Finalmente se observa que el sistema estéril presenta valores de potencial similares a aquellos obtenidos por la cepas anteriormente mencionadas, sin embargo en este sistema el valor del potencial redox permanece constante durante todo el experimento.

En el Anexo II del presente trabajo, se muestra el Diagrama de Pourbaix para el sistema Cu-Fe-S-O-H, a fin de obtener un panorama general de los valores de potencial redox que se desarrollan en sistemas similares a los de biolixiviación; puede observarse que los potenciales generados por sistemas de lixiviación abiótica a un pH de 2.0, se encuentran en un rango de 0.390 y 0.770V.

### **3.3.2 Crecimiento de las cepas durante la biolixiviación del concentrado Avino.**

El gráfico 4 presenta el desarrollo de todas las cepas y del sistema estéril en presencia del concentrado de calcopirita Avino. Se observa claramente, si se le compara con el gráfico 2, que si bien las etapas del crecimiento de las bacterias son igualmente visibles que en la fase de adaptación al medio, es muy complicado diferenciarlas de manera clara; además, cada una de las fases del crecimiento bacteriano se retardan, es decir, ocurren más lentamente que en la etapa previa. Así, la fase lag, que en los pases de adaptación se mantenía durante los primeros dos días, en esta etapa es difícil de determinar y en algunos casos visibles se extiende más allá de los primeros 5 días del estudio; la fase de

crecimiento logarítmica, que ocurría entre el segundo y el quinto día de los pases de adaptación, presenta una duración de más de quince días y la fase estacionaria ocurre después de los 30 días, suceso que en la etapa anterior acaecía apenas 5 días después del inicio del experimento.

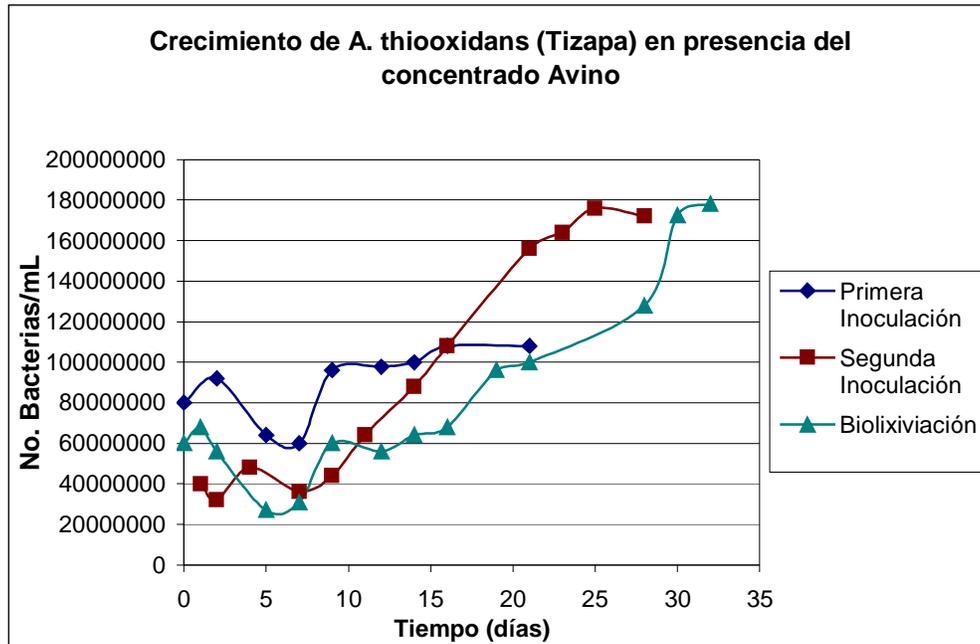


Gráfico 4a.

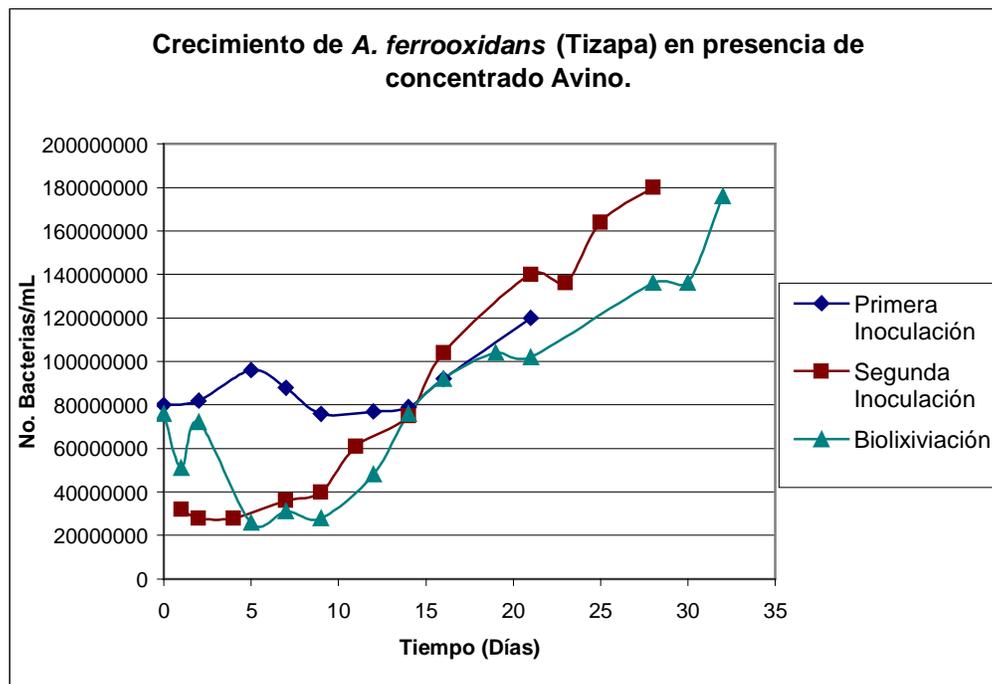


Gráfico 4b.

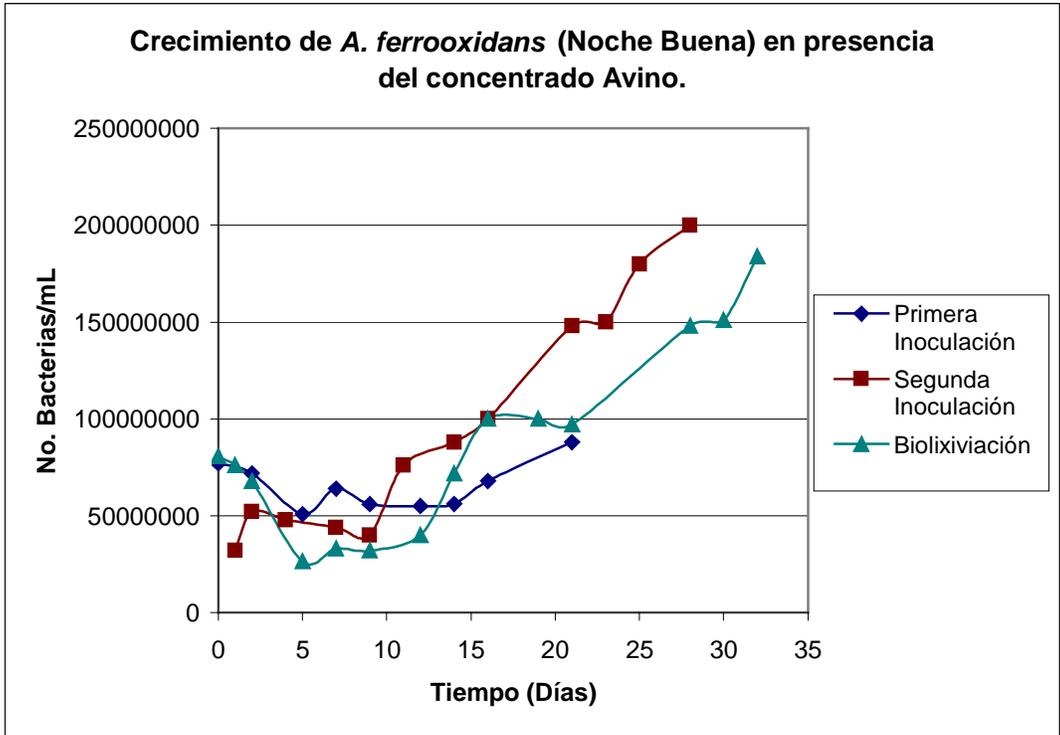


Gráfico 4c.

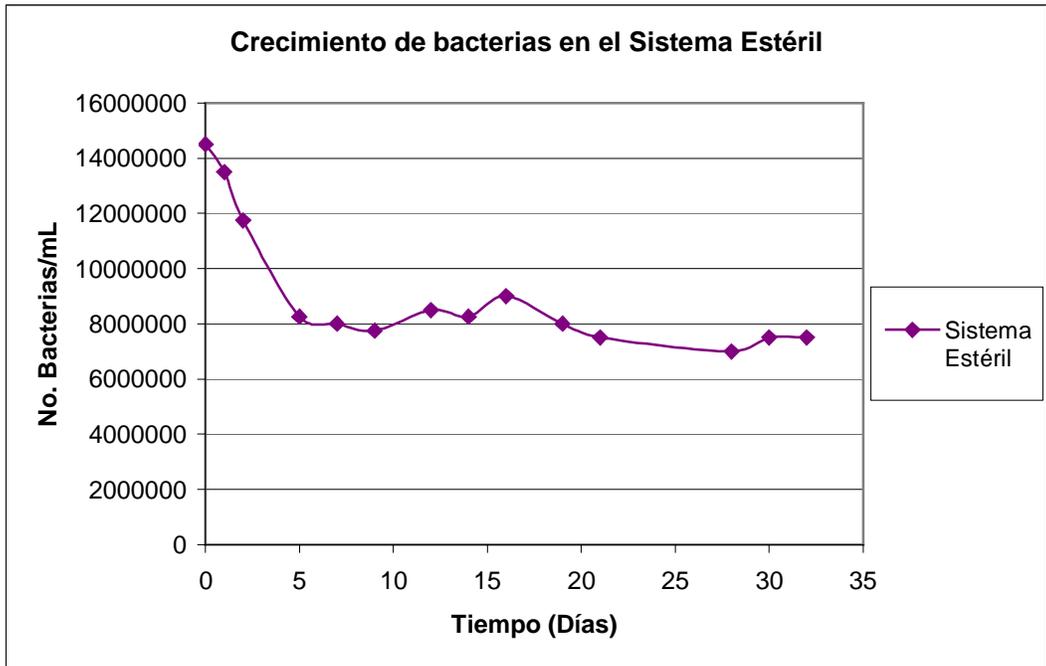


Gráfico 4d.

Gráfico 4 (a, b, c, d). Crecimiento de las bacterias durante los pases de adaptación al mineral.

Se debe notar que en la evolución de los tres pases de adaptación al medio para las tres cepas, si bien existe una mejoría en cuanto al desarrollo de los microorganismos entre el primer y el segundo pase (después del día 15), el tercero, es decir el correspondiente a la cinética de biolixiviación, sufre de retardo y menor número de células en comparación con el segundo pase.

### **3.3.3 Comportamiento del pH durante la biolixiviación del concentrado Avino.**

La acidez del medio de cultivo en presencia del concentrado de calcopirita Avino tiene el mismo comportamiento que se describió en la sección 3.2.3, es decir, durante los primeros días éste tuvo que ajustarse a 2.0 mientras las bacterias se adaptaban a las condiciones del medio de cultivo, una vez logrado esto, el pH del medio fue autorregulado por los microorganismos encargados de la biolixiviación.

No existen diferencias importantes entre los pases de adaptación al medio, los pases de adaptación al mineral y la cinética de biolixiviación.

### **3.3.4 Extracción de metales durante la cinética de biolixiviación.**

Los gráficos 5 y 6 muestran los resultados de la extracción de los metales de interés durante la biolixiviación del concentrado Avino. Como se mencionó en el Capítulo 2, la cinética de biolixiviación requirió –por su importancia- del monitoreo de la disolución de los valores metálicos del mineral; cuantificar la extracción de especies metálicas a partir del concentrado es la manera de medir la eficiencia del proceso.

El Gráfico 5 presenta la evolución de la extracción de cobre; puede notarse que ésta es muy baja; de acuerdo con Batty<sup>(5)</sup>, normalmente bacterias mesófilas como *A. ferrooxidans* llevan a cabo disoluciones del 30 al 60% de los valores metálicos de un mineral. Ello se debe a la formación de capas pasivantes en la superficie de estos materiales, estas capas pasivas pueden ser removidas por bacterias como *A. thiooxidans*

según lo reportado en el trabajo de investigadores como Sasaki<sup>(15)</sup>; por tal motivo se esperaría, que la cepa de bacterias tioxidantes que contenía tanto *A. ferrooxidans* como *A. thiooxidans* presentase mejores extracciones de cobre durante la biolixiviación del concentrado Avino. Si bien existe biolixiviación de cobre (y esto se observa al comparar el desempeño del sistema estéril, es decir, la disolución química con la cinética de biolixiviación de cada cepa) ésta resulta poco eficiente de acuerdo con el contenido de cobre de la muestra original.

La gráfica 6 presenta la disolución de Fe en el medio a partir del concentrado, nótese que la extracción de hierro es muy poca, casi nula a pesar de que la ley de Fe en el concentrado es considerable. Ya se ha discutido con anterioridad la importancia que tiene la presencia de Fe(II) y Fe(III) en el sistema de biolixiviación, por lo que al no existir disolución de hierro, el mecanismo de ataque indirecto de las bacterias por producción de Fe<sup>3+</sup> es prácticamente ausente. De nuevo, este hecho resulta sorprendente, pero explica parcialmente el por qué de la caída de los valores de potencial redox en todos los reactores así como también es un indicativo de la baja extracción de cobre obtenida, ya que en la hidrometalúrgica abiótica, el Fe(III) puede utilizarse para lixiviar concentrados de cobre.

Dado que el %ley zinc en el concentrado Avino es muy bajo (1.35), no se ha considerado importante presentar la evolución en la extracción de esta especie.

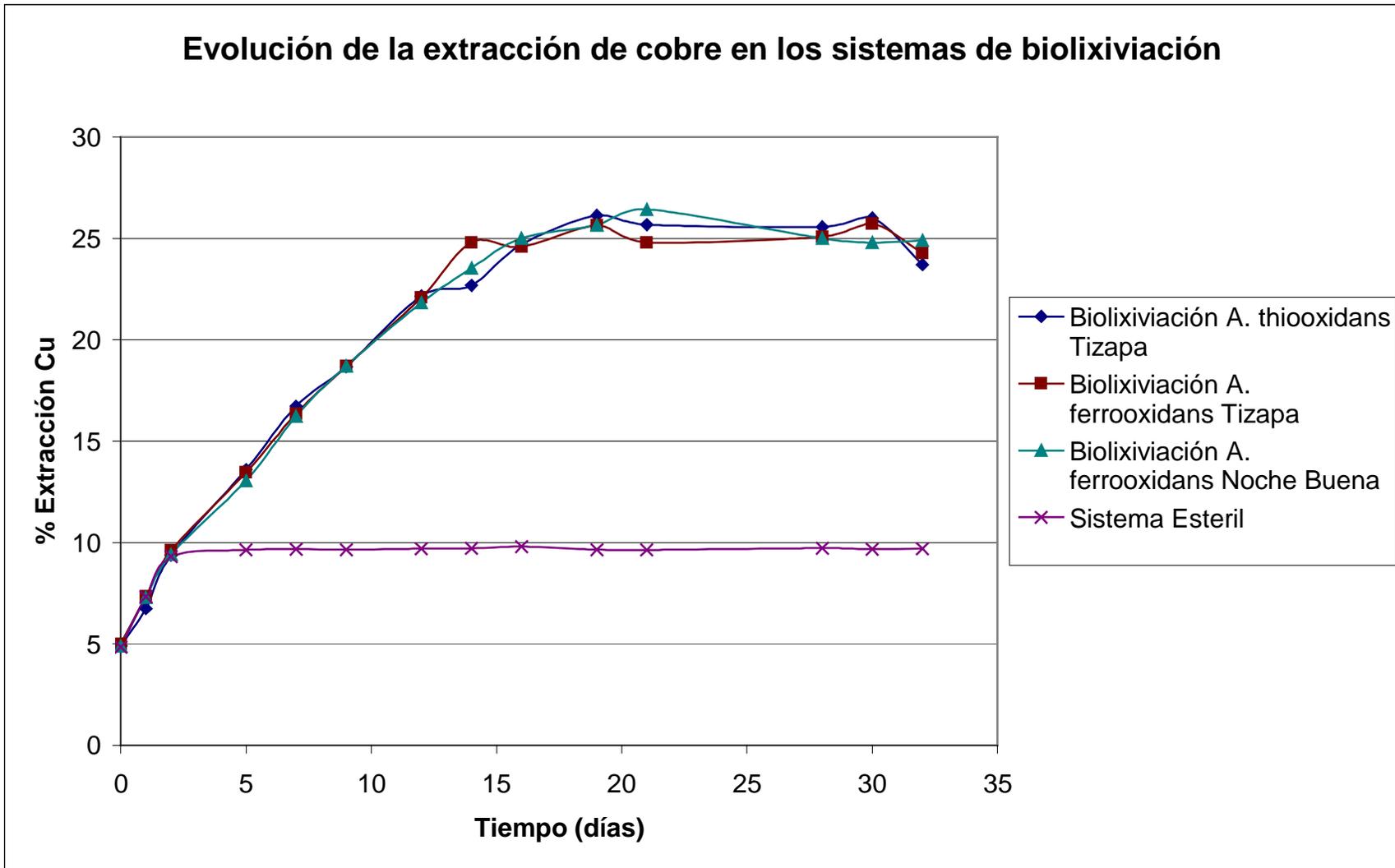


Gráfico 5. Evolución de la extracción de cobre durante la biolixiviación del concentrado Avino.

### Evolución de la liberación de Hierro en los sistemas de biolixiviación

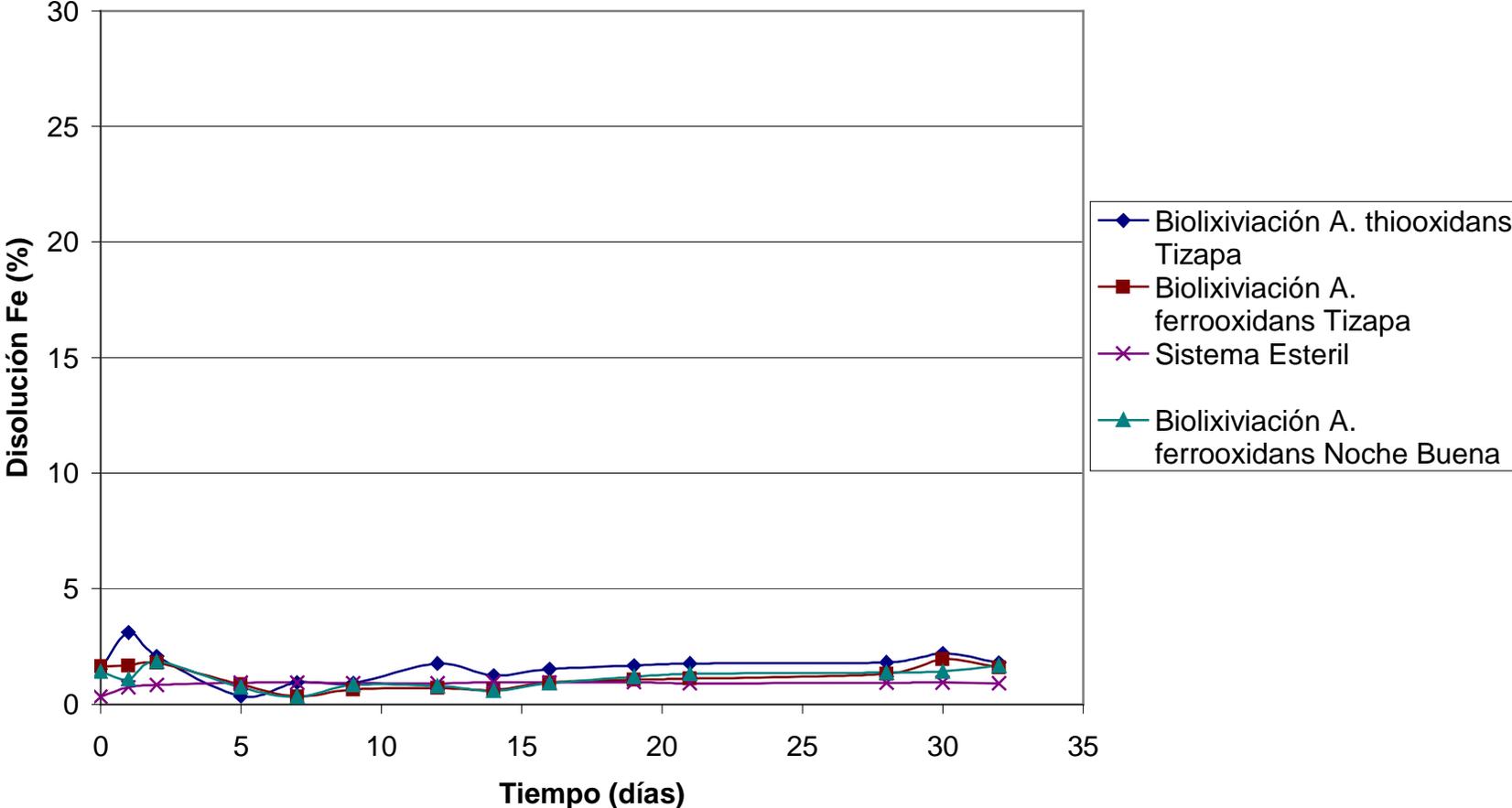


Gráfico 6. Evolución de la disolución de hierro durante la biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino.

### **3.4 Caracterización del residuo de la biolixiviación del concentrado Avino.**

La caracterización de los residuos del proceso de biolixiviación fue la última parte del procedimiento experimental. Las fases sólida y líquida que se encontraban en los reactores fueron separadas por medio de filtración, y una vez libre de humedad, la fase sólida fue disgregada y caracterizada utilizando las técnicas de difracción de Rayos X y microscopía electrónica de barrido; con la técnica de difracción de Rayos X se pretendía identificar el cambio en las fases minerales que componen a los residuos, es decir, si se encuentran presentes productos de reacción como jarositas, mientras que con el microscopio electrónico de barrido se puede observar el grado de ataque al que ha sido sometido el material original. Ambos estudios fueron realizados por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (U. S. A. I.) de la Facultad de Química de la U. N. A. M.

#### **3.4.1 Caracterización por difracción de Rayos X.**

El estudio de los residuos de biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino por difracción de Rayos X fue realizado a los cultivos tanto de bacterias tioxidantes como de bacterias ferrooxidantes de Tizapa. Los difractogramas correspondientes se encuentran en el Anexo I del presente trabajo.

Las fases identificadas para los residuos de biolixiviación del concentrado Avino por bacterias tioxidantes fueron: calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), pirita ( $\text{FeS}_2$ ), anglesita ( $\text{PbSO}_4$ ) y jarosita  $\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ .

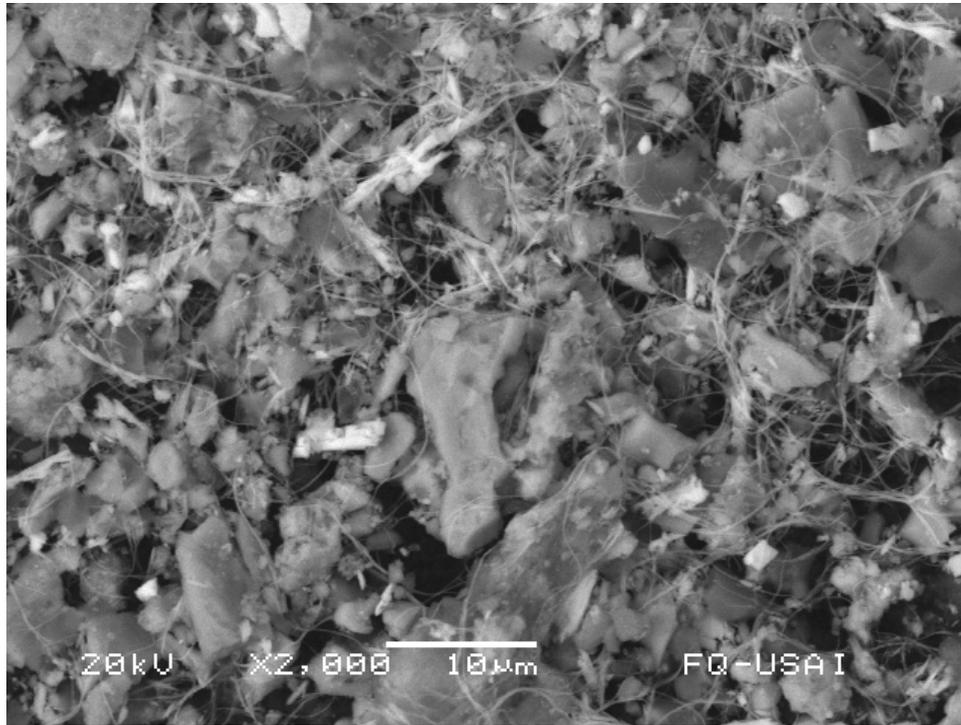
Las fases identificadas para los residuos de biolixiviación del concentrado Avino por bacterias predominantemente ferrooxidantes fueron: calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), pirita ( $\text{FeS}_2$ ), anglesita ( $\text{PbSO}_4$ ) y jarosita de plomo  $\text{PbFe}_6(\text{SO}_4)_4(\text{OH})_6$ .

La presencia de anglesita y jarositas en el residuo de biolixiviación -productos de reacción típicos de procesos de oxidación- es un indicador de que se llevó a cabo la

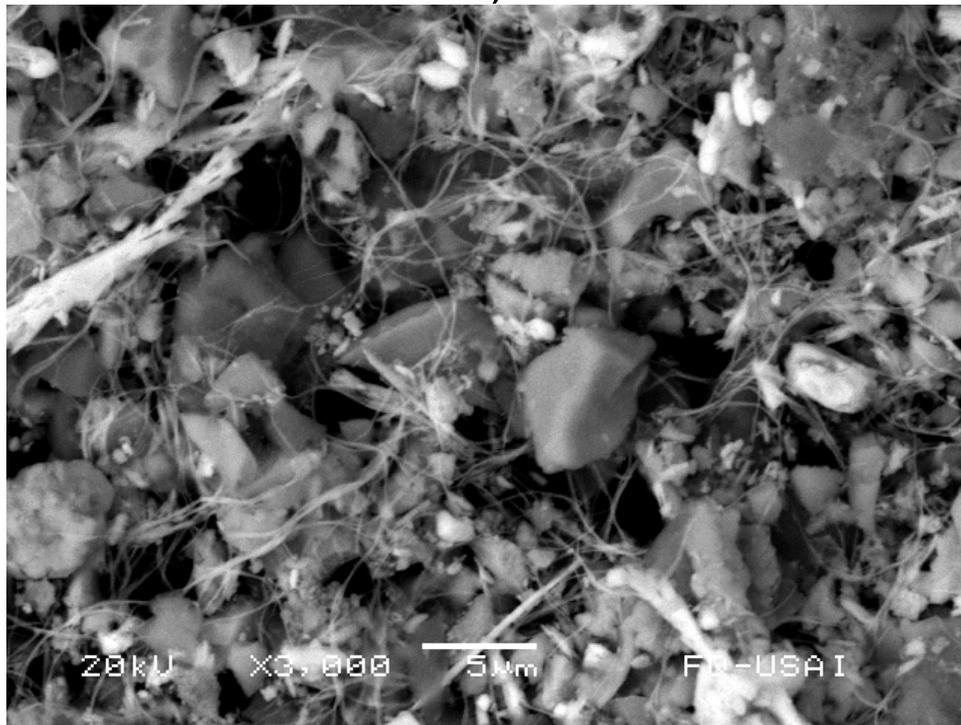
lixiviación del concentrado Avino, modificando las fases de la muestra original (ver: 3.1.2 Estudios de la muestra realizados en Facultad de Química) y disminuyendo la presencia de la fase mayoritaria del concentrado, es decir, la calcopirita.

#### **3.4.2 Observación al Microscopio Electrónico de Barrido.**

A continuación se presentan los resultados de la observación de los residuos del proceso de biolixiviación obtenidos a partir del microscopio electrónico de barrido. La muestra fue enviada a observación sin tratamiento previo. La micrografía muestra (figuras 3 y 4) la presencia de una fase fibrosa que recubre a las partículas de mineral en ambas muestras provenientes del proceso de biolixiviación por las distintas cepas de bacterias. Por las dimensiones de esta fase y la extensión que presenta, es correcto señalar que se encuentra presente en la superficie de todo el concentrado de calcopirita, y que posiblemente se encuentre adherida a ella. Ahora bien, las figuras 5 y 6 presentan estructuras similares a lo que se observa en las micrografías obtenidas de los residuos, éstas estructuras corresponden a otro tipo de microorganismo y es posible que constituyan al cuerpo de un hongo. La figura 5 presenta micrografías al MEB del crecimiento del hongo *Aspergillus niger* sobre poliéster<sup>(30)</sup>, mientras que las micrografías de la figura 6 corresponden a diversas especies de hongos encontradas en el Río Tinto, España, lugar donde se sabe existen microorganismos asociados con la biolixiviación de minerales<sup>(31)</sup>, dado que éste atraviesa la Franja Pirítica.; por lo tanto se puede afirmar por comparación, que la estructura que se encuentra envolviendo al residuo observado posee una naturaleza similar a estos hongos. Las características de este tipo de microorganismos se encuentran en el Anexo III del presente trabajo.

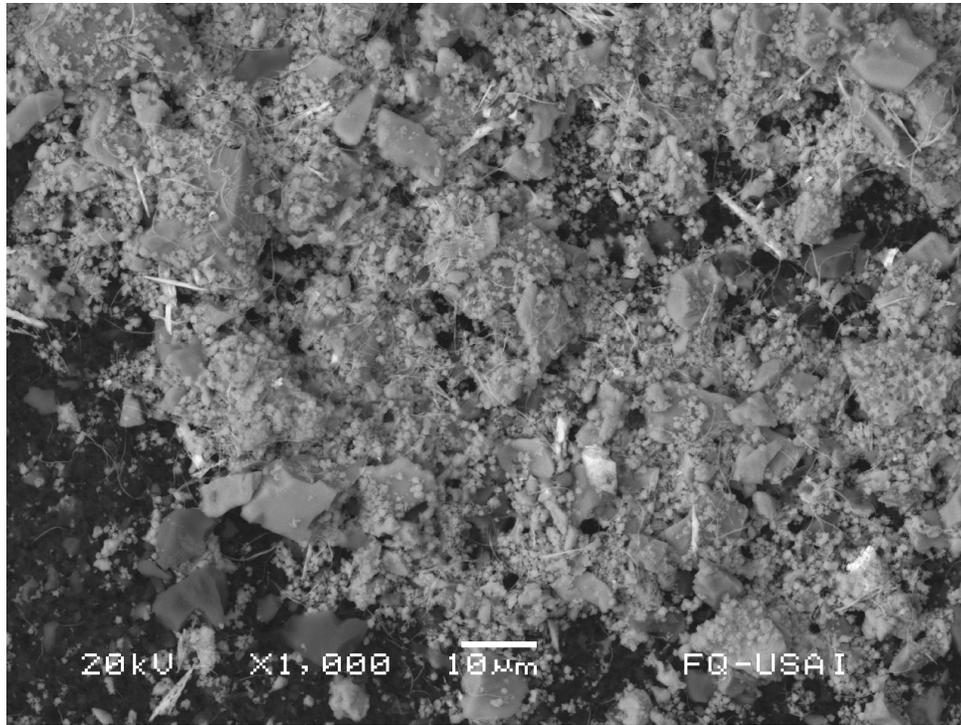


a)

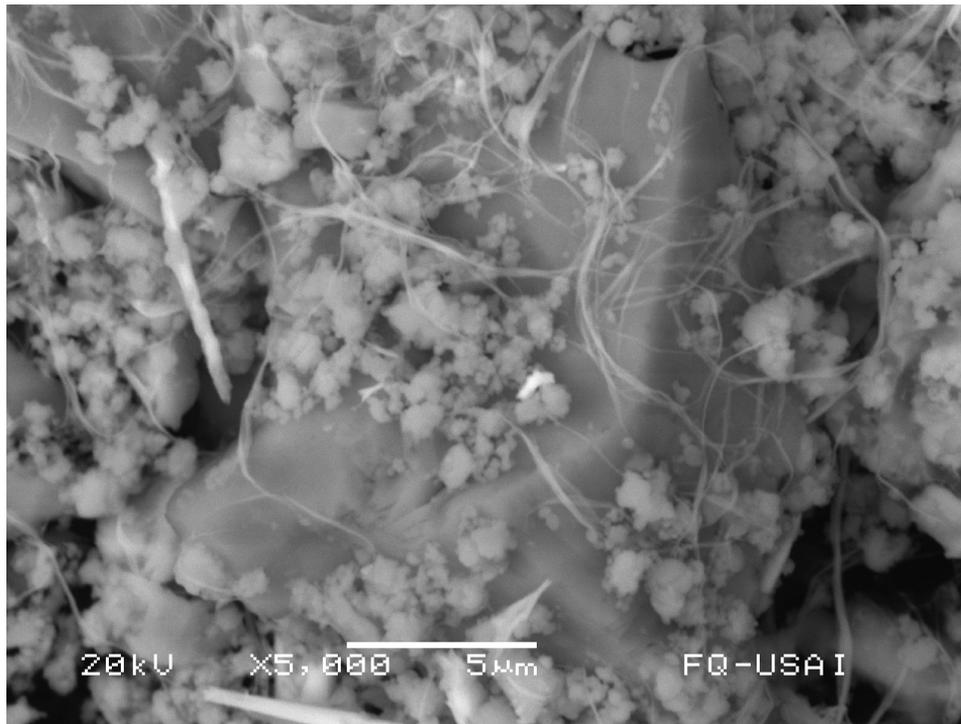


b)

**Figura 3. Micrografía del residuo de la biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino en presencia de *A. thiooxidans* Tizapa. a) 2000 aumentos, b) 3000 aumentos.**



a)



b)

**Figura 4. Micrografía del producto de biolixiviación del concentrado Avino en presencia de la cepa *A. ferrooxidans* Tizapa. a) 1000 aumentos, b) 5000 aumentos.**

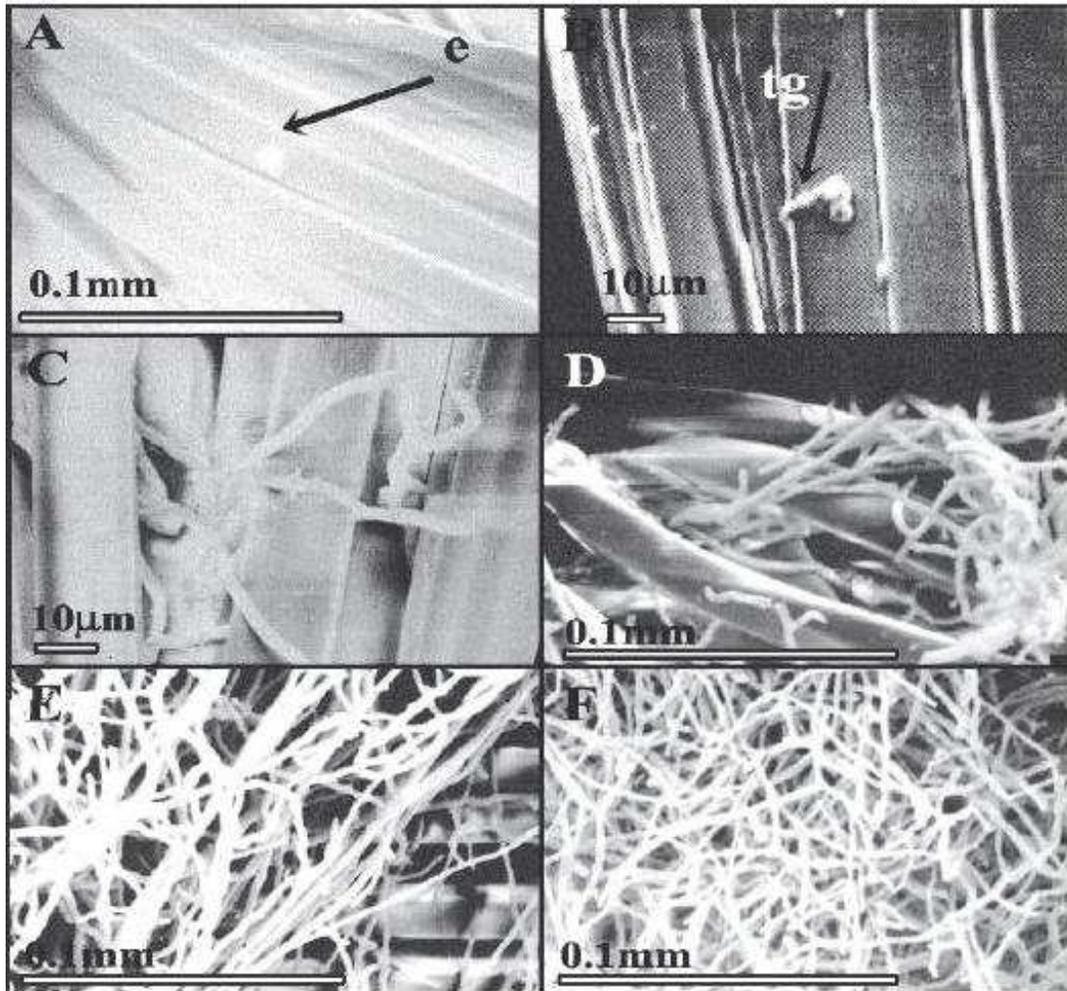


Figura 5. Formación de una biopelícula de *Aspergillus niger* (un hongo) por crecimiento sobre poliéster: (A) 0 horas, (B) 4 horas, (C) 10 horas, (D) 18 horas, (E) 24 horas; (F) 120 horas de crecimiento<sup>(30)</sup>.

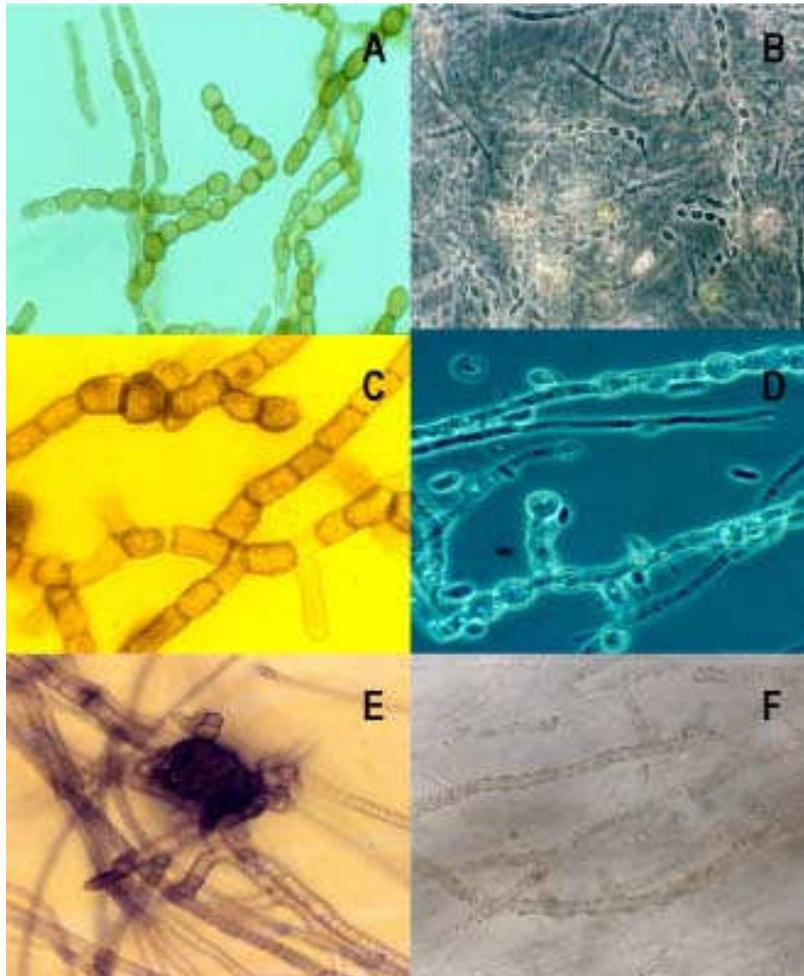


Figura 5. Micrografías de diferentes hongos aislados del río Tinto (España). (A) *Scytalidium thermophilum*; (B) Posible *Acremonium* sp.; (C) *Scytalidium acidophilum*; (D) *Lecythophora hoffmannii*; (E) Cepa de clasificación incierta caracterizada por la pigmentación oscura de las hifas; (F) Imagen de la alta densidad de hifas de hongos encontradas en distintas partes del río<sup>(31)</sup>.

### 3.5 Consideraciones finales acerca del proceso de biolixiviación del concentrado Avino.

A través de todo el proceso para lograr la biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino se impusieron las condiciones necesarias para que las bacterias que en la naturaleza llevan a cabo este proceso, se desarrollasen de forma tal que fueran aprovechadas para conseguir el objetivo. Estas condiciones exigían un control estricto de

la temperatura, la acidez del medio y las condiciones hidrodinámicas adecuadas para mantener el flujo de aire requerido para el crecimiento de los microorganismos.

Durante la adaptación de las cepas a los medios de cultivo apropiados para su crecimiento, las condiciones impuestas a las cepas permitieron que el potencial redox de los sistemas en los que se encontraban -principal indicativo de la actividad bacteriana- alcanzara los valores correspondientes a los equilibrios químicos reportados en la literatura. Para el caso de las cepas de bacterias ferrooxidantes este valor de potencial redox es de 771 mV, pues de acuerdo con la serie electromotriz, al equilibrio  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  le corresponde ese valor, no obstante la magnitud de los resultados arrojados por los sistemas difieren un poco de éste, debido entre otras cosas a la existencia de diversos equilibrios químicos presentes en el medio y a las variaciones tanto de temperatura como de concentración de especies químicas presentes. Para el caso de la cepa de bacterias tioxidantes ocurren más de un equilibrio y no existe uno predominante, por lo que el potencial alcanzado, si bien es una característica propia del desarrollo de éste cultivo, no tiene que corresponder necesariamente a un número reportado en la literatura, sin mencionar que además, la cantidad de trabajos con bacterias tioxidantes es más escasa dentro del género *Acidithiobacillus*, y por tanto la existencia de datos para hacer comparaciones al respecto también lo es. De manera adicional, entre la información colectada a partir de los pases de adaptación a los distintos medios de cultivo, se confirma que en tiempos de aproximadamente 5 días se pueden obtener cultivos frescos a partir de las cepas utilizadas, tal información ha sido reportada en los trabajos de tesis de Becerril Reyes y López Juárez, desarrollados en el grupo de investigación en biohidrometalurgia de la Facultad de Química<sup>(26, 27)</sup>, esta información también es congruente con los trabajos de otros investigadores como Castillo, Ballester, Sasaki y Tributsch<sup>(12, 13, 14, 15, 18)</sup>.

En la segunda parte del experimento se encontraron indicativos de que el proceso de biolixiviación no se llevó a cabo de manera óptima, tales índices se vieron reflejados en los gráficos presentados en la sección 3.3 y en los resultados mostrados en la sección 3.4, que muestran la evolución de los parámetros de biolixiviación y la caracterización de los residuos de ésta, respectivamente. Se ha hecho mención en repetidas ocasiones de que típicamente en un proceso de biolixiviación de minerales, tales como el concentrado Avino, la razón de la concentración  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  es un indicativo de que la actividad de las bacterias es la que permite la lixiviación de la calcopirita, Ballester explica<sup>(13)</sup> que si bien en la lixiviación por acción de bacterias del género *Acidithiobacillus*, se llevan a cabo tanto el ataque directo como el indirecto hacia la calcopirita, por lo general aquel que controla todo el proceso es el ataque indirecto de  $Fe^{3+}$  sobre  $CuFeS_2$ ; el potencial registrado a lo largo de todo el control de los pases de adaptación al mineral por parte de las tres cepas deja en claro que el equilibrio entre Fe(III) y Fe(II) no representa a ninguno de los tres sistemas, cuyo valor de potencial redox corresponde al mismo que se observó en el sistema estéril. El monitoreo del crecimiento de bacterias es otro indicio de que el proceso de biolixiviación no se llevó a cabo de la manera en que se esperaba, para los tres sistemas se obtenían cultivos listos para su uso en un tiempo de 5 días como máximo durante la adaptación a los medios de cultivo, en cambio en la segunda parte del experimento se observó que en cada pase sucesivo el crecimiento de las bacterias se llevaba a cabo a un ritmo más lento, retardando así el desarrollo de los cultivos.

La explicación a los fenómenos hallados -que resultan inesperados para una cinética de biolixiviación- puede obtenerse a partir de los datos de caracterización de los residuos de la lixiviación. De acuerdo con Batty y Rorke<sup>(5)</sup>, las razones por las que un mineral no puede lixivarse al 100% no tienen que ver con la termodinámica del proceso, sino más bien por la formación de películas pasivas o refractarias en la superficie del mineral, por ello es conveniente recordar que en las imágenes obtenidas al MEB

(microscopio electrónico de barrido) se observa la presencia de una fase que posiblemente corresponde a un microorganismo diferente presente sobre la superficie de las partículas del concentrado Avino. Por la información recopilada a partir del monitoreo de los diferentes sistemas de biolixiviación, es muy probable que la presencia de ésta constituya una barrera física para el ataque de las bacterias, razón por la que tanto el potencial de los sistemas como el desarrollo de los cultivos, y en consecuencia la extracción de cobre, se ven disminuidos en el estudio de lixiviación que constituye este trabajo. Los elementos para lograr la identificación de la fase que envuelve al concentrado Avino son limitados puesto que la dirección en la que el procedimiento experimental estaba encaminado no lo permite; sin embargo la evidencia obtenida a partir de éste trabajo señala dos aspectos importantes: la posible presencia de un microorganismo de naturaleza diferente a la de las bacterias y, que la etapa en la cual comenzó a desarrollarse, es decir, a mostrar efectos importantes en el proceso, corresponde a la fase de adaptación al mineral. La existencia de otros microorganismos involucrados en la biolixiviación de minerales no es algo nuevo, si bien en el Capítulo 1 se mencionaron algunas especies y géneros de bacterias susceptibles a ser utilizados en procesos de lixiviación de minerales, Demergasso y colaboradores<sup>(4)</sup> encontraron que la biolixiviación no es exclusiva de estas, puesto que hallaron protozoarios capaces de sobrevivir a partir de la transformación de minerales usados para lixiviación en terreros; de igual forma, López Archilla<sup>(31)</sup> ha hallado interrelaciones importantes entre las bacterias utilizadas para procesos de biolixiviación y hongos. Así, si bien los medios de cultivo utilizados en laboratorio son selectivos del tipo o grupo de bacterias que se deseen obtener, concretamente el caso del medio de cultivo basal 9K, no lo son para especies de microorganismos particulares.

Finalmente, la existencia de un microorganismo que pasiva a un mineral limitando la cinética de biolixiviación del mismo debe ser cuidadosamente considerado en un futuro

de dos maneras distintas: tanto como un agente perjudicial para el proceso de lixiviación por bacterias mesófilas, tanto como un agente inhibidor de las mismas que podría ser aprovechado en el tratamiento de los residuos de procesos hidrometalúrgicos; en ambos casos, el estudio futuro de este microorganismo en temas relacionados con la lixiviación de minerales es indispensable.

*"It's hard to imagine, it's so hard to perceive  
To find an expression for what it all means  
All panic and struggle, all death and decay  
Are coming together in relative ways."*

...And You Will Know Us By The Trail of Dead. Relative Ways.

## CONCLUSIONES

1. Un proceso de biolixiviación de minerales exige un control estricto de temperatura, pH, condiciones hidrodinámicas y administración de nutrientes para asegurarse del crecimiento de las bacterias que en la naturaleza llevan a cabo esta clase de procesos.
2. Las bacterias ferrooxidantes se caracterizan por presentar potenciales de óxido-reducción que corresponden al equilibrio  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , es decir 771 mV. La variación en el valor de este potencial puede explicarse utilizando la Ec. Nernst.
3. Las bacterias tiooxidantes no presentan un valor de potencial redox específico.
4. Se pueden tener cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* o *Acidithiobacillus thiooxidans* en medio líquido en sólo 5 días.
5. Las bacterias tiooxidantes de la cepa Tizapa se desarrollan en mayor cantidad en medio basal 9K que las bacterias ferrooxidantes del mismo origen, observándose diferencias de un orden de magnitud en el número de bacterias por mililitro de medio de cultivo.
6. En ninguno de los sistemas de biolixiviación del concentrado de calcopirita Avino en presencia de bacterias mesófilas se obtuvieron resultados favorables de extracción de cobre.
7. La caída de potencial redox de los sistemas de biolixiviación, la baja disolución de hierro en los medios de cultivo y el retardo en la acción de las bacterias se deben a la pasivación del concentrado Avino, y explican el bajo rendimiento de la biolixiviación del mineral, rendimiento que fue el mismo para todas las cepas utilizadas.
8. El concentrado Avino fue pasivado por la formación de una fase constituida posiblemente por un microorganismo diferente a los estudiados.
9. Por la presencia de un microorganismo adicional se hace imposible saber si la acción combinada de bacterias tiooxidantes y ferrooxidantes es más efectiva en la biolixiviación

de un concentrado de calcopirita que la presentada por bacterias exclusivamente ferrooxidantes.

10. El crecimiento de otros microorganismos capaces de adaptarse a las condiciones de crecimiento de bacterias como *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* y que pueden pasivar la superficie de un mineral debe ser tomado en cuenta en futuros estudios de biolixiviación de minerales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- <http://www.camimex.org.mx/info/situación.pdf>
- 2.- <http://www.camimex.org.mx/info/est/est/pdf>
- 3.- Brierley, J., Brierley, C. 2001. Present and Future commercial applications of biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*. 59, 233-239.
- 4.- Demergasso, C., Galleguillos, P., Escudero, L., Zepeda, V., Castillo, D., Casamayor, E. 2005. Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*. 80, 241-253.
- 5.- Batty, J.D., Rorke, G.V. 2006. Development and commercial demonstration of the BioCOP™ thermophile process. *Hydrometallurgy*. 83, 83-89.
- 6.- Curtis, H., Barnes, S. 2003. Biología. 6a edición. Editorial Médica Panamericana. Nueva York. 736-759.
- 7.- Hatzikioseyan, A., Tsezos, M. 2006. Modelling of microbial metabolism stoichiometry: Application in bioleaching processes. *Hydrometallurgy*. 83, 29-34.
- 8.- McCarty, P.L. 2006. Citado en: Hatzikioseyan, A., Tsezos, M. Modelling of microbial metabolism stoichiometry: Application in bioleaching processes. *Hydrometallurgy*. 83, 29-34.
- 9.- Rawlings, D.E., Dew, D., du Plessis, C. 2003. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology*. 21, 38–44.
- 10.- Lindström, E. B., Sandström, A., Sundkvist, J. 2003. A sequential two-step process using moderately and extremely thermophilic cultures for biooxidation of refractory gold concentrates. *Hydrometallurgy*. 71, 21-30.
- 11.- Garrity, G. M. 2005. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 2a edición. Vol. 2, parte B. Editorial Springer. Nueva York. 60-62.

- 12.- Castillo, P. 1995. 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 Recurso Minerales – Japan International Cooperation Agency – SECOFI. Chihuahua, Chih., octubre (1995).
- 13.- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F. Muñoz, J. A. 2003. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy*. 71, 37-46.
- 14.- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F. Muñoz, J. A. 2003. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy*. 71, 47-56.
- 15.- Sasaki, A., Tsunekawa, M. Ohtsuka, T., Konno, H. 1998. The role of sulfur-oxidizing bacteria *Thiobacillus thiooxidans* in pyrite weathering. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 133, 269-278.
- 16.- Silverman, M.P., Ehrlich, H.L. 1964. Microbial formation and degradation of metals. *Adv. Appl. Microbiol.* 6, 153– 206.
- 17.- Tributsch, H. 1999. Direct versus indirect bioleaching. Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99. Elsevier, Amsterdam, pp. 51– 60. Citado en: Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F. Muñoz, J. A. 2003. New information on the pyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy*. 71, 37-46.
18. Rojas-Chapana, J. A., Tributsch, H. 2001. Biochemistry of sulfur extraction in bio-corrosion of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*. 59, 291-300.
- 19.- [http://www.penoles.com.mx/penoles/sobre\\_penoles/perfil/divisiones/minas/detail.php?mina=7](http://www.penoles.com.mx/penoles/sobre_penoles/perfil/divisiones/minas/detail.php?mina=7)
- 20.-[http://www.coremisgm.gob.mx/productos/cartas/cartas250/geologia/metadatos/78\\_E14-1GM\\_META.htm](http://www.coremisgm.gob.mx/productos/cartas/cartas250/geologia/metadatos/78_E14-1GM_META.htm)
- 21.- [http://www.seabridgegold.net/Noche\\_Buena\\_43\\_101\\_Report.pdf](http://www.seabridgegold.net/Noche_Buena_43_101_Report.pdf)

- 22.-[http://www.coremisgm.gob.mx/productos/cartas/cartas250/geologia/metadatos/10\\_H12-1GM\\_META.htm](http://www.coremisgm.gob.mx/productos/cartas/cartas250/geologia/metadatos/10_H12-1GM_META.htm)
- 23.- <http://www.avino.com/s/Avino.asp>
- 24.-[http://www.coremisgm.gob.mx/productos/cartas/cartas250/geologia/metadatos/50\\_G13-11GM\\_META.htm](http://www.coremisgm.gob.mx/productos/cartas/cartas250/geologia/metadatos/50_G13-11GM_META.htm)
- 25.- Silverman, M.P., Lundgren, D.G.. 1959. Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*: I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *Journal of Bacteriology*. 77 (5), 642– 647.
- 26.- López Juárez, A. 1999. Lixiviación bacteriológica de un mineral sulfurado de cobre. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.*
- 27.- Becerril Reyes, V. 2002. Biolixiviación de un concentrado mineral constituido básicamente de calcopirita a 35°C. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.*
- 28.- Dean, J. A. 1990. Lange Manual de Química. *McGraw-Hill*. U. S. A. Tomo II, 6-4 – 6-7.
- 29.- Rivera Santillán, R. E., Ballester Pérez, A., Blázquez Izquierdo, M., González González, F. 1999. Bioleaching of a copper sulphide flotation concentrate using mesophilic and thermophilic microorganisms. Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99. ISBN: 0 444 50193 2. Elsevier.
- 30.- Villena, G. K., Gutiérrez-Correa, M. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista Peruana de Biología*. 10(1), 78-87.
- 31.- López-Archilla, A.I., González, A.E., Terrón, M.C. y Amils, R. 2004. Ecological study of the fungal populations of the acidic Tinto River in Southwestern Spain. *Canadian Journal Microbiology* 50: 923-934.

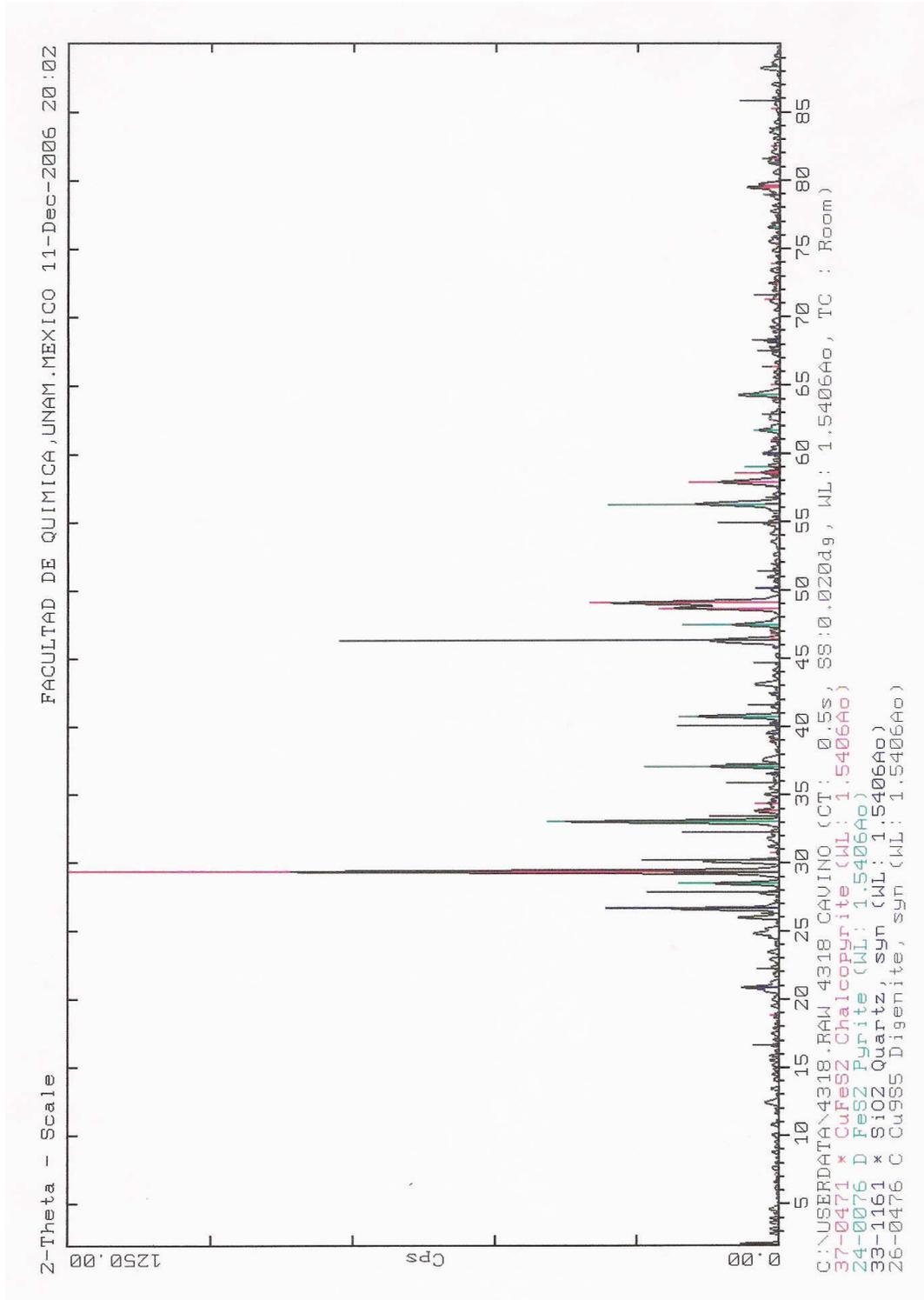
32.-Garrels, R., Christ, C. L. 1965. Solutions, Minerals & Equilibria. Freeman, Cooper & Company. 230-232.

33.- Curtis, H., Barnes, S. 2003. Biología. 6a edición. Editorial Médica Panamericana. Nueva York. 796-798.

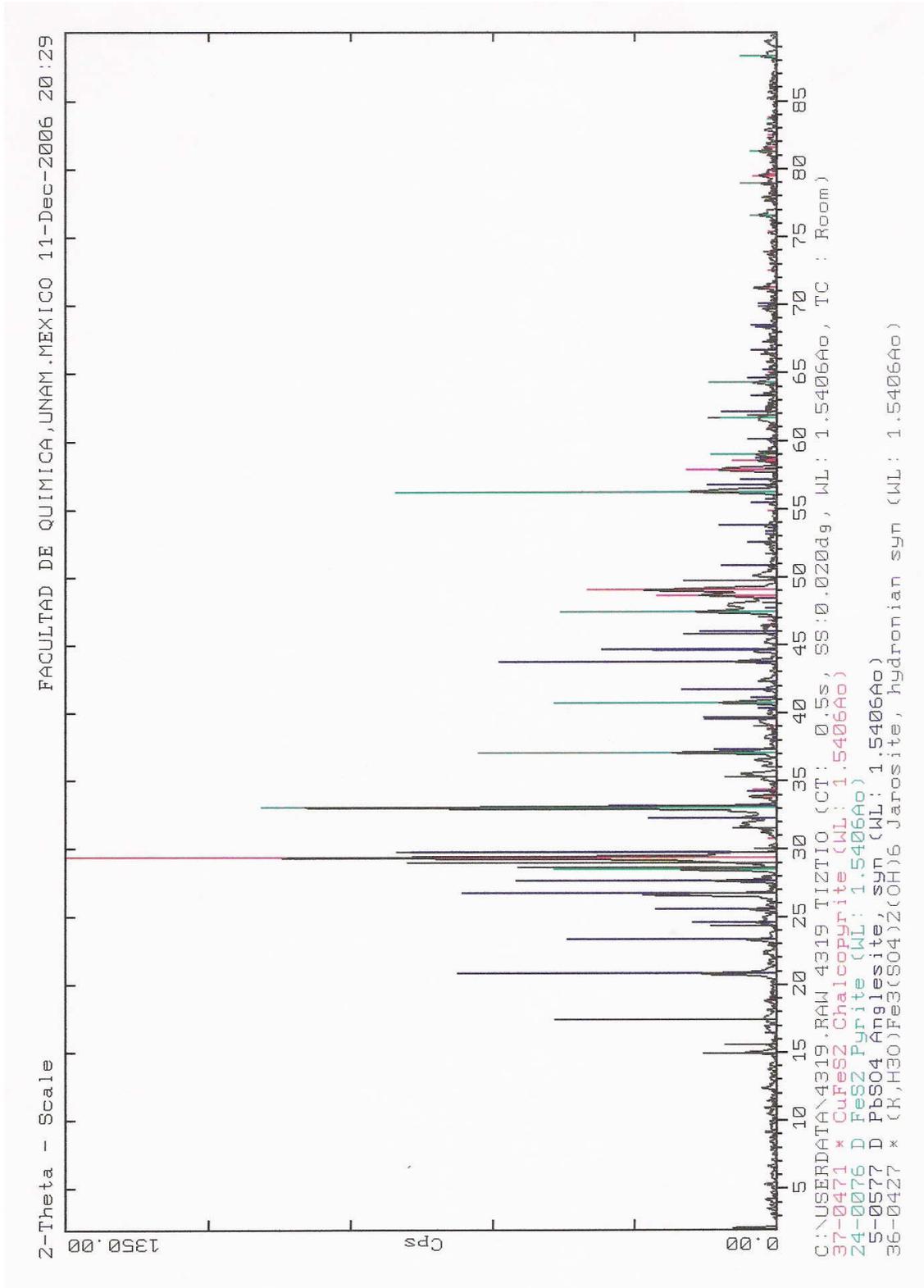
# ANEXOS

## Anexo I: Difractogramas.

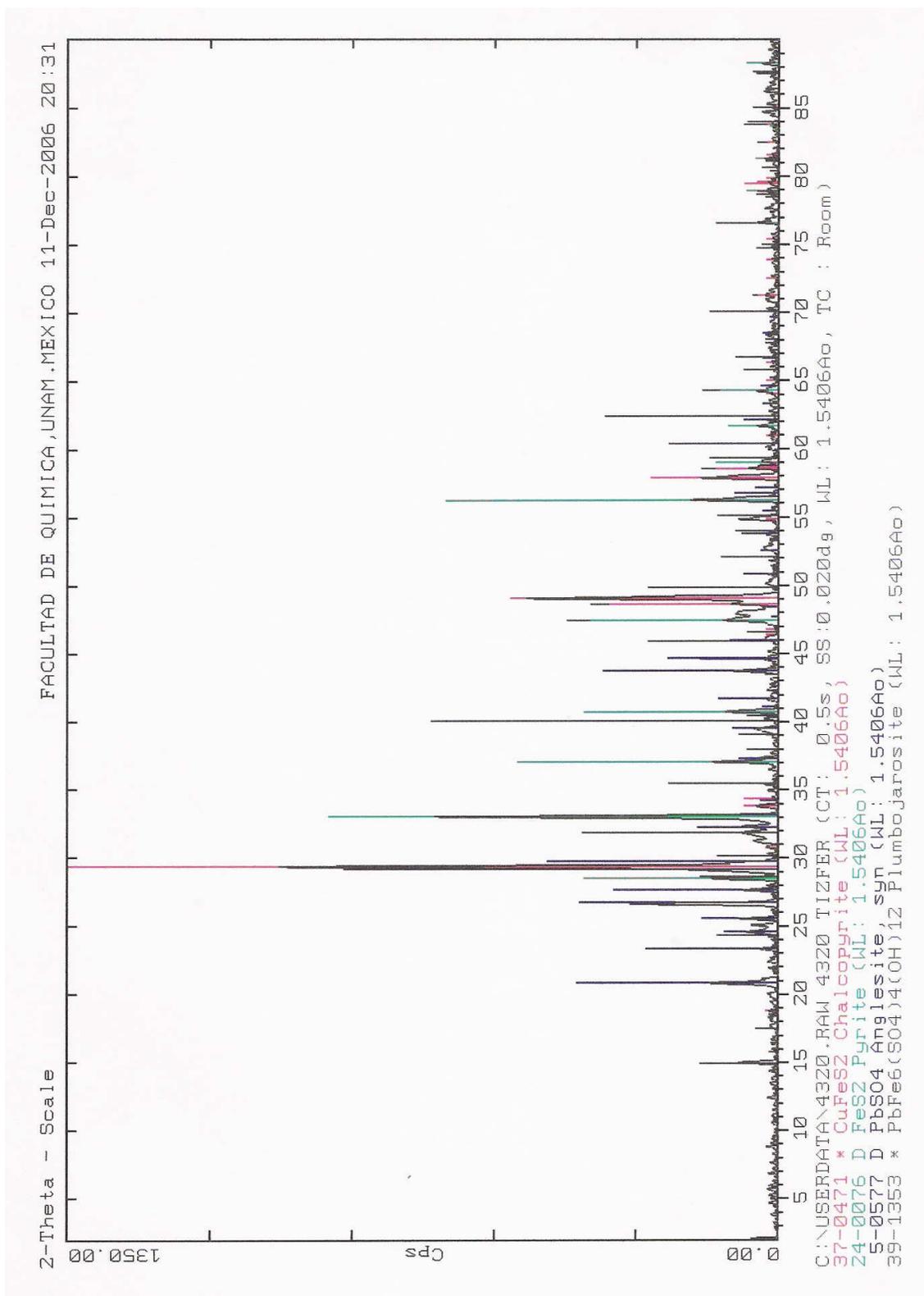
Difractograma del Concentrado de calcopirita Avino.



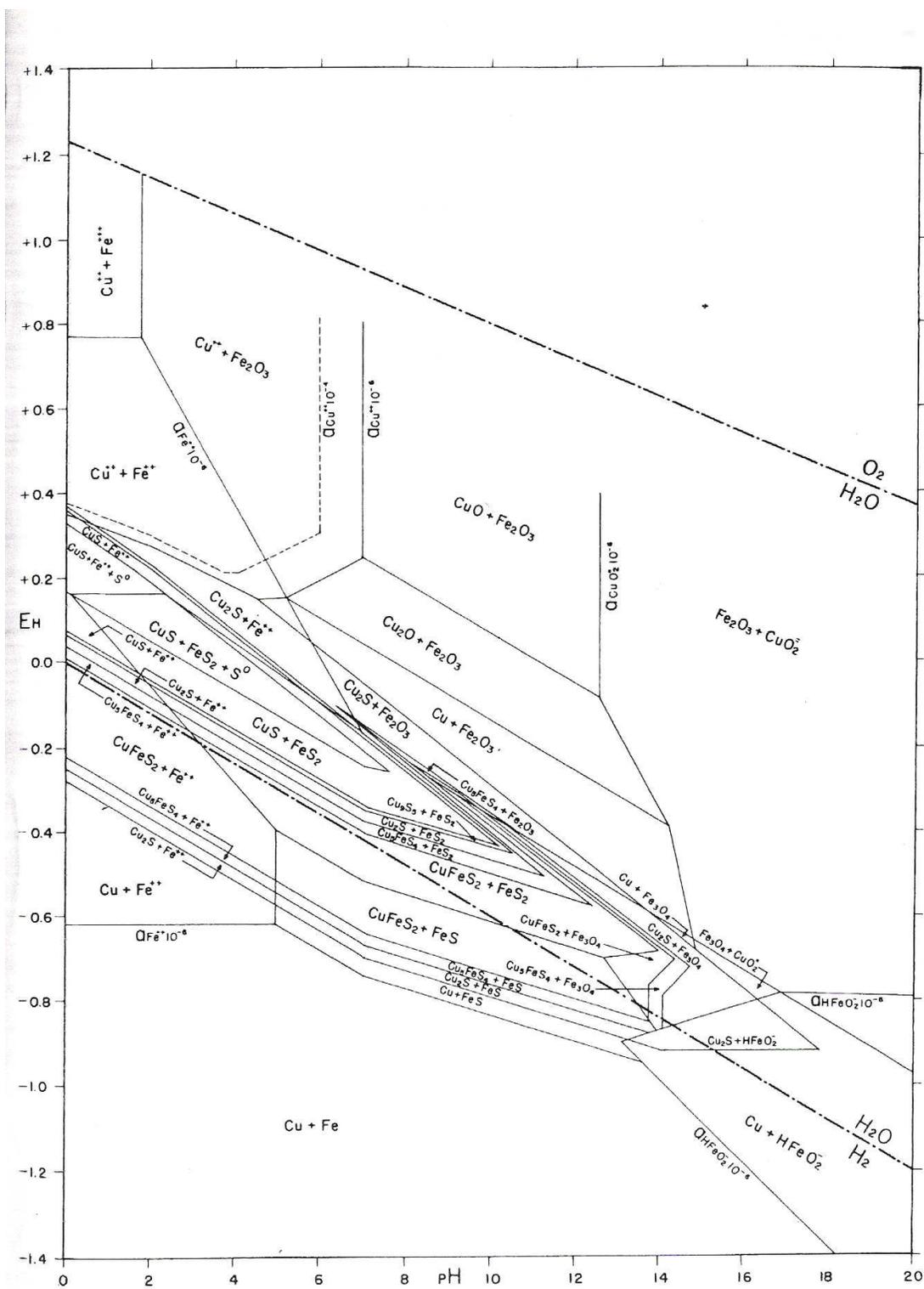
Difractograma del residuo de biolixiviación del concentrado Avino por *A. thiooxidans*  
Tizapa.



Difractograma del residuo de biolixiviación del concentrado Avino por *A. ferrooxidans*  
Tizapa.



Anexo II: Diagrama de Pourbaix del sistema Cu-Fe-S-O-H a 25°C y 1 atmósfera de presión.<sup>(31)</sup>



### **Anexo III: Características básicas de los hongos<sup>(33)</sup>.**

Los hongos son muy diferentes de cualquier otro tipo de organismos aunque, por ser inmóviles y poseer una pared celular, se clasificaron durante mucho tiempo junto con las plantas. En la actualidad, los biólogos los asignan a un reino separado. Aunque algunos hongos, incluidas las levaduras, son unicelulares, la mayoría de las especies están compuestas por masas de filamentos *cenocíticos* –es decir, muchos núcleos dentro de un citoplasma común- o multicelulares. Un filamento fúngico se llama *hifa* y todas las hifas de un solo organismo se llaman colectivamente **micelio**. Las paredes de las hifas están compuestas fundamentalmente por *quitina*, un polisacárido que nunca se encuentra en las plantas. Sin embargo, la quitina es el componente principal del exoesqueleto de los insectos y de otros artrópodos. Además, los hongos son heterótrofos y pueden tener como sustancias de reserva al glucógeno y no al almidón. Así, paradójicamente, los hongos se asemejan más a los animales que a las plantas. Las estructuras visibles de la mayoría de los hongos representan sólo una pequeña porción del organismo; estas estructuras, en algunos grupos son llamados *cuerpos fructíferos* o *fructificaciones* y son hifas fuertemente compactadas, especializadas en la producción de esporas.

Un micelio se origina por la germinación de una sola espora. El crecimiento tiene la particularidad de que se produce solamente en los extremos de las hifas. Si bien los hongos son inmóviles, las esporas pueden ser llevadas a grandes distancias por el viento. El crecimiento del micelio reemplaza la movilidad, poniendo al organismo en contacto con nuevas fuentes de alimento y con diferentes cepas de apareamiento. Este crecimiento puede ser bastante rápido; algunos hongos llegan a producir en 24 horas una masa de hifas nuevas que, si se colocaran una a continuación de otra, totalizarían más de un kilómetro de longitud.

Todos los hongos son heterótrofos, ya sean *saprobios*, *parasitos facultativos*, *obligados* o *micorrícicos*. Dada su forma filamentosa, cada célula fúngica se encuentra a

no más de pocos micrómetros del suelo, del agua o de cualquier otra sustancia en la que viva el hongo y está separada de ella solamente por una delgada pared celular. Dado que sus paredes celulares son rígidas, los hongos son incapaces de englobar pequeños microorganismos u otras partículas por fagocitosis, obtienen alimento absorbiendo sustancias orgánicas o inorgánicas disueltas. Generalmente, el hongo secreta enzimas digestivas sobre la fuente alimenticia y luego absorbe las moléculas resultantes más pequeñas (producto de la degradación) que son liberadas al medio. El micelio puede aparecer como una masa sobre la superficie del alimento o puede estar oculto debajo de la superficie del sustrato. Los hongos parásitos frecuentemente tienen hifas especializadas llamadas **haustorios**, que absorben los nutrientes directamente de las células del organismo hospedador.

Los hongos, juntamente con las bacterias, son los descomponedores principales de materia orgánica. Desde el punto de vista humano, algunos hongos son destructivos, atacan los cultivos, los productos alimenticios, las plantas y animales domésticos e incluso al propio ser humano. Otros tienen aplicaciones biotecnológicas, son esenciales para la producción de pan, cerveza y vino, así como en la producción de enzimas (amilasas, celulasas, etc), ácidos orgánicos (fumárico, succínico, cítrico, oxálico, etc) o bien para la producción comercial de hongos comestibles como los champiñones (*Agaricus bisporus*) o el shiitake u hongo japonés (*Lentinula edodes*). Además, los hongos son la fuente de una gran variedad de antibióticos y otros medicamentos capaces de salvar vidas.