



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Escalado de un proceso de biooxidación de residuos de minería ricos en sulfuros usando reactores de tanque agitado

Laura María Muñoz Echeverri

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela Biociencias
Medellín, Colombia

2015

Escalado de un proceso de biooxidación de residuos de minería ricos en sulfuros usando reactores de tanque agitado

Laura María Muñoz Echeverri

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director:

Ph.D. Marco Antonio Márquez Godoy

Codirector (a):

M.Sc Darío de Jesús Gallego Suárez

Línea de Investigación:

Bioineralogía y biohidrometalurgia

Grupo de Investigación:

Minería Aplicada y Bioprocesos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela Biociencias
Medellín, Colombia

2015

Agradecimientos

A mis padres Luz Stella y José Narciso por su apoyo incondicional y su constante motivación.

A mis amigos y compañeros del Grupo de Investigación Minería Aplicada y Bioprocesos, Paola Duarte, Andrea Escobar, Santiago Benavides, Orlando Ajos, John Gelves, Juan David Torrenegra, Federico Uribe, Susana Calle y Viviana López, por su inmensa ayuda, confianza y por generar un ambiente de trabajo ameno.

A Santiago Benavides y Orlando Ajos un agradecimiento especial por toda su colaboración en el montaje y ejecución del ensayo a nivel de planta piloto.

A mis asesores Darío Gallego y Marco Antonio Márquez, por su confianza, enseñanzas y por hacer posible el planteamiento y desarrollo de esta investigación.

Al profesor Juan Carlos Pérez por su motivación, apoyo y paciencia.

A la Facultad de Minas y al Laboratorio de Biomineralogía Aplicada y Bioprocesos por financiar la investigación.

A los laboratorios de Crudos y Derivados, CIMEX y Carbones de la Universidad Nacional de Colombia, y al Centro de Investigación y Desarrollo de Argos por la realización de diversos análisis.

A la empresa Mineros Nacionales y a la Mina San Antonio por facilitar la materia prima para el desarrollo de la investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín, a la Facultad de Ciencias y al Área Curricular de Biotecnología por todo el apoyo y acompañamiento durante la realización del posgrado.

Resumen

En este trabajo se presenta el escalado y evaluación del proceso de biooxidación de un residuo de minería aurífera (proveniente de la mina La Maruja, Marmato-Caldas), desde una escala de laboratorio hasta un nivel de planta piloto en reactores de tanque agitado. Para procurar el éxito del escalado, se realizó una caracterización mineralógica inicial del residuo y una adaptación del agente biológico, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, al mineral. A escala de laboratorio se determinó el nivel más apropiado de agitación, y se evaluaron dos criterios de escalado seleccionados con base en las necesidades del proceso. A través de la caracterización mineralógica se estableció que la fase mineral predominante en el residuo fue la piritita con un 34.1% y el contenido de Fe y S ascendió a 24.9 y 28.7%, respectivamente; se observaron además partículas micrométricas de oro diseminadas en la superficie de los sulfuros indicando la refractariedad del mineral. Mediante una serie de cultivos sucesivos se obtuvo una cepa estable respecto a su actividad oxidativa y se eliminaron las fases de latencia en las cinéticas de biooxidación. Los ensayos preliminares en reactores indicaron que el intervalo de agitación idóneo para el proceso oscila entre 500 y 700 r.p.m, sobresaliendo 500 r.p.m por la reducción en el consumo de potencia. El criterio de escalado más adecuado fue velocidad en la punta del impulsor, el cual redujo el estrés hidrodinámico sobre el microorganismo y condujo a los más altos porcentajes de hierro y sulfatos disueltos. El escalado desde laboratorio hasta planta piloto, precisó del ajuste y/o cambio de ciertas condiciones con cada aumento en el volumen, particularmente la calidad del medio de cultivo y la relación inicial [células]/[mineral], algunos de estos cambios parecen haber afectado el arranque del proceso a nivel de planta piloto. A nivel de laboratorio (matraz y 5L) los porcentajes de hierro y sulfatos disueltos fueron de $\approx 22\%$ y $\approx 25\%$, y mejoraron con el aumento en escala (27-29% y 30-32%). Si bien aún se requiere del ajuste de ciertos parámetros y condiciones, particularmente en planta piloto, en términos generales se encontró que el escalado del proceso de biooxidación de los residuos de La Maruja, presentó resultados promisorios que pueden ser tomados como punto de partida para la optimización del proceso y su implementación a escala comercial.

Palabras clave: adaptación, biooxidación, caracterización mineralógica, escalado, residuo minero.

Abstract

This work presents the scale-up and the evaluation of the biooxidation process of mine tailings (coming from La Maruja mine in Marmato, Caldas (Colombia)) from laboratory to a pilot scale in stirred-tank reactors. To ensure a successful scaling, an initial mineralogical characterization of mine tailings and an adaptation of the biological agent (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) to the mineral were carried out. The most appropriate level of agitation was established at laboratory scale. Additionally, two scaling criteria were selected and evaluated based on the process needs. Thanks to the mineralogical characterization it was established that the predominant mineral phase in the residue was pyrite (35.7%) with Fe and S reaching 24.9 and 28.7% respectively. Micron gold particles were observed in the mineral surface indicating refractoriness. By means of a series subcultures, a stable strain was obtained and the latency phases were eliminated in the biooxidation kinetics. Preliminary tests in reactors indicated that proper agitation rate is between 500 and 700 r.p.m, favoring 500 r.p.m because of lower power consumption. The most suitable scale-up criteria was speed at the tip of the impeller. Thus, reducing hydrodynamic stress on the microorganisms and generating the highest rates of diluted Fe and S. The scale-up from laboratory to the pilot plant requires adjusting and/or changing certain conditions every time the volume is increased, in particular, the culture medium and the initial relation [cells]/[mineral]. These changes may have affected the onset process at pilot plant level. At laboratory level, the percentage of ore biooxidation was significantly improved with an increase in the scale. While some parameters and conditions might still require some adjusting, particularly at the pilot level, the overall scale-up of the biooxidation process of mine tailings from La Maruja, produced promising results that can be taken as a starting point for process optimization and commercial implementation.

Keywords: adaptation, biooxidation, mine tailings, mineralogical characterization, scale-up.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
Introducción	1
Diseño metodológico global	4
1. Marco teórico.....	6
1.1 Minerales refractarios.....	6
1.1.1 Sulfuros insolubles más abundantes.....	7
1.2 Biooxidación	8
1.2.1 Mecanismos de biooxidación	8
1.2.2 Mecanismos de reacción	9
1.2.3 Microorganismos.....	10
1.2.4 Factores que intervienen en un proceso de biooxidación.....	11
1.2.5 Configuraciones de biorreactoresmas empleados en biooxidación.....	15
1.2.6 Biooxidación en la actualidad	17
1.3 Nociones generales sobre el escalado de bioprocesos.....	18
2. Evaluación de las características mineralógicas de residuos de minería aurífera, como materia prima para biooxidación	21
Resumen	21
2.1 Introducción	22
2.2 Materiales y métodos	23
2.2.1 Mineral.....	23
2.2.2 Caracterización química.....	24
2.2.3 Análisis granulométrico	24
2.2.4 Caracterización mineralógica.....	25
2.3 Resultados	25
2.3.1 Análisis granulométrico y caracterización química	25
2.3.2 Caracterización mineralógica.....	27
2.3.3 Oro micrométrico	31
2.4 Discusión.....	33
2.4.1 Efecto de las fases minerales sobre un proceso de biooxidación	33
2.4.2 Efecto de los iones metálicos sobre un proceso de biooxidación.....	35
2.4.3 Efecto del tamaño de partícula sobre un proceso de biooxidación	38
2.4.4 Grado de refractariedad de los residuos de la mina La Maruja	39
2.5 Conclusiones y recomendaciones.....	40

3. Adaptación de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a residuos de minería aurífera provenientes de la mina La Maruja	41
Resumén	41
3.1 Introducción	42
3.2 Materiales y métodos	44
3.2.1 Mineral	44
3.2.2 Material biológico y medio de cultivo	45
3.2.3 Adaptación del microorganismo al mineral	45
3.2.4 Análisis químicos	46
3.2.5 Análisis estadísticos	47
3.3 Resultados	48
3.3.1 Adaptación primera etapa: aumento gradual de mineral en el medio	48
3.3.2 Adaptación segunda etapa: repíques sucesivos mineral de partícula gruesa.....	49
3.3.3 Adaptación tercera etapa: repíques sucesivos mineral de partícula fina	53
3.4 Discusión.....	57
3.4.1 Efecto del aumento gradual de mineral.....	57
3.4.2 Efecto de los repiques sucesivos	59
3.4.2 Efecto del tipo de residuo.....	60
3.5 Conclusiones y recomendaciones	62
4. Efecto de la velocidad de agitación y control de pH en reactores de tanque agitado (5L), sobre el proceso de biooxidación de los residuos de minería aurífera de la mina La Maruja	65
Resumén	65
4.1 Introducción	66
4.2 Materiales y métodos	68
4.2.1 Mineral.....	68
4.2.2 Material biológico	68
4.2.3 Diseño experimental	68
4.2.4 Montaje de bioensayos.....	69
4.2.5 Monitoreo de bioensayos	70
4.2.6 Análisis estadístico.....	71
4.2.7 Determinación de parámetros hidrodinámicos y potencia	71
4.2.8 Determinación de k_La y consumo de oxígeno.....	72
4.2.9 Caracterización mineralógica de los ensayos de biooxidación	73
4.3 Resultados	73
4.3.1 Efecto de diferentes velocidades de agitaciones y control de pH sobre las cinéticas del proceso de biooxidación	73
4.3.2 Resultados estadísticos del diseño experimental	79
4.3.3 Parámetros hidrodinámicos y potencia	83
4.3.4 Coeficientes de transferencia de masa (k_La) y consumo de oxígeno	85
4.3.5 Caracterización mineralógica de proceso de biooxidación	86
4.4 Discusión.....	92
4.4.1 Efecto de diferentes velocidades de agitaciones y control de pH sobre las cinéticas del proceso de biooxidación.....	92
4.4.2 Análisis estadístico.....	95
4.4.3 Hidrodinámica.....	96
4.4.4 Coeficientes de transferencia de masa (k_La) y consumo de oxígeno	98
4.4.5 Mineralogía del proceso de biooxidación	101
4.5 Conclusiones y recomendaciones	103

5. Escalado y evaluación desde laboratorio hasta planta piloto, del proceso de biooxidación de los residuos de minería aurífera de la mina La Maruja	104
Resumén	104
5.1 Introducción	105
5.2 Materiales y métodos	107
5.2.1 Mineral	107
5.2.2 Material biológico	108
5.2.3 Bioreactores y escalado	108
5.2.4 Montaje de bioensayos escala de laboratorio	110
5.2.5 Montaje de bioensayos escala piloto	110
5.2.6 Monitoreo de bioensayos	111
5.2.7 Determinación de parámetros hidrodinámicos y potencia	112
5.2.8 Determinación de $k_L a$ y consumo de oxígeno	113
5.2.9 Caracterización mineralógica del proceso	113
5.2.10 Cianuración de muestras biooxidadas	113
5.2.11 Tratamiento de efluentes y recuperación de muestras minerales	113
5.3 Resultados	110
5.3.1 Estimación de velocidades de agitación a nivel de laboratorio	114
5.3.2 Efecto del escalado a nivel de laboratorio sobre las cinéticas de biooxidación	114
5.3.3 Estimación de velocidades de agitación a escala piloto	118
5.3.4 Efecto del escalado hasta un nivel de planta piloto sobre las cinéticas de biooxidación	119
5.3.5 Parámetros hidrodinámicos y potencia	123
5.3.6 Coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) y consumo de oxígeno	124
5.3.7 Caracterización mineralógica de proceso de biooxidación	126
5.3.8 Cianuración de muestras biooxidadas	134
5.3.9 Neutralización de residuos generados a escala piloto	134
5.4 Discusión	136
5.4.1 Efecto del escalado sobre las cinéticas de biooxidación	136
5.4.2 Criterios de escalado e hidrodinámica	141
5.4.3 Concentración de oxígeno disuelto y consumo de oxígeno	143
5.4.4 Mineralogía del proceso de biooxidación	143
5.4.5 Cianuración	145
5.4.6 Neutralización de residuos	146
5.5 Conclusiones y recomendaciones	147
A. Anexo: Registro fotográfico	150
Bibliografía	153

Introducción

El uso indiscriminado de las reservas de metales altamente puros y su consecuente agotamiento, ha conducido a la búsqueda de nuevas fuentes para suplir la creciente demanda de la industria. Hoy, gran parte de la extracción de metales preciosos se hace desde reservas secundarias, como menas de baja ley y residuos de la actividad minera (Gentina y Acevedo, 2005; Hoque y Obbard, 2011; Sekhar *et al.*, 2012; Kaksonen *et al.*, 2014a). En el caso particular del oro, se estima que un tercio de su producción mundial proviene de depósitos secundarios, constituidos en su mayoría por minerales refractarios (Das y Sen, 2001; Arroyave, 2008). En las menas refractarias el oro se encuentra encapsulado y/o en solución sólida en sulfuros insolubles, entre los que destacan la pirita y arsenopirita, barreras físicas o químicas que evitan o hacen ineficiente la recuperación del metal por el método convencional de cianuración, lo que ha conducido al desarrollo de diversos pretratamientos (Das y Sen, 2001; Karamenev *et al.*, 2001; Arroyave, 2008; Hoque y Hobbard, 2011; Kaksonen *et al.*, 2014a). Entre las tecnologías o pretratamientos disponibles comercialmente para destruir las matrices de sulfuros, la biooxidación es considerada la más económica, versátil y menos contaminante (Karamanev *et al.*, 2001; Das y Sen, 2001).

La biooxidación es un proceso natural de disolución, en el que los microorganismos extremófilos como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, catalizan la oxidación de sulfuros asociados a los metales preciosos (Mishral y Rhee, 2014). Este proceso usualmente no genera la cantidad de residuos peligrosos característicos de pretratamientos como la tostación u oxidación química, y tampoco presenta altos costos como la oxidación a presión; los residuos de la biooxidación consisten en lixiviados que se pueden tratar fácilmente mediante neutralización (Morin, 1995; Climo *et al.*, 2000; Mejía *et al.*, 2011; Sekhar *et al.*, 2012). Adicionalmente, este proceso biológico se puede llevar a cabo en diferentes configuraciones de reactores, con diversos tipos de microorganismos y condiciones de operación (Acevedo, 2000; Karamanev *et al.*, 2001; Hoque y Hobbard, 2011; Kaksonen *et al.*, 2014a).

Como cualquier proceso que involucra el uso de microorganismos, en la biooxidación es necesario conocer y controlar cierto tipo de factores que afectan el crecimiento celular. Se considera que la

composición y/o características físicas y químicas del mineral es uno de los factores más determinantes (Gentina y Acevedo, 2005), a este pueden estar sujetos, los cambios de pH en el sistema de reacción, y los tipos y concentraciones de metales pesados que conducen a la inhibición del microorganismo (Dew, 1997; Dopson, 2003, Watling, 2006); de las características y clases de fases presentes, depende también el grado de refracteriedad y el orden de oxidación de los sulfuros (Tributsh y Bennett, 1981b; Gasparrini, 1993; Mason y Rice, 2002). Para contrarrestar los efectos adversos inherentes a las características del mineral, se recomienda realizar una adaptación previa del microorganismo al concentrado, y de tal manera mejorar la actividad bacteriana y la eficiencia del proceso (Sonnleitner, 1998; Xia *et al.*, 2008; Haghshenas *et al.*, 2009). Por otro lado de la configuración de reactor surgen otros aspectos a los que se debe prestar atención. En el caso de tanques agitados, la agitación juega un papel importante puesto que garantiza la mezcla entre las tres fases del sistema, y determina el nivel de estrés hidrodinámico sobre las bacterias, además es imperante conocer su nivel más adecuado si se desea llevar el proceso a otras escalas mediante criterios tradicionales de escalado (Quintero, 1981; Gallego, 2002b; Deveci, 2002; Sun *et al.*, 2012).

Diariamente en Colombia se generan una gran cantidad de residuos provenientes de la minería aurífera, con oro u otros metales valiosos presentes no recuperados por los métodos tradicionales empleados comúnmente en la explotación de los depósitos. La biooxidación, un proceso poco conocido en nuestro país, se presenta como una excelente alternativa que facilitaría la recuperación de estos metales. La economía colombiana depende en buena parte de la minería, por lo que se hace necesario pensar en la implementación de procesos “nuevos” y efectivos para la recuperación de los metales presentes en depósitos primarios y secundarios. Adicionalmente, vale la pena explorar nuevos campos y avances con miras a una minería aurífera eficiente, ambientalmente más limpia y a la vanguardia con los procesos que actualmente se vienen empleando exitosamente en otros lugares del mundo.

Acorde a lo anterior y dando continuidad a la línea de investigación en biomineralogía y biohidrometalurgia del grupo de investigación GMAB (Grupo de Biomineralogía Aplicada y Bioprocesos), esta investigación pretende: **Evaluar a nivel de planta piloto, la eficiencia del proceso de biooxidación de residuos de minería aurífera ricos en sulfuros, a partir de condiciones de operación preestablecidas a escala de laboratorio, usando reactores de tanque agitado.**

Para dar cumplimiento al objetivo general se plantearon los objetivos específicos:

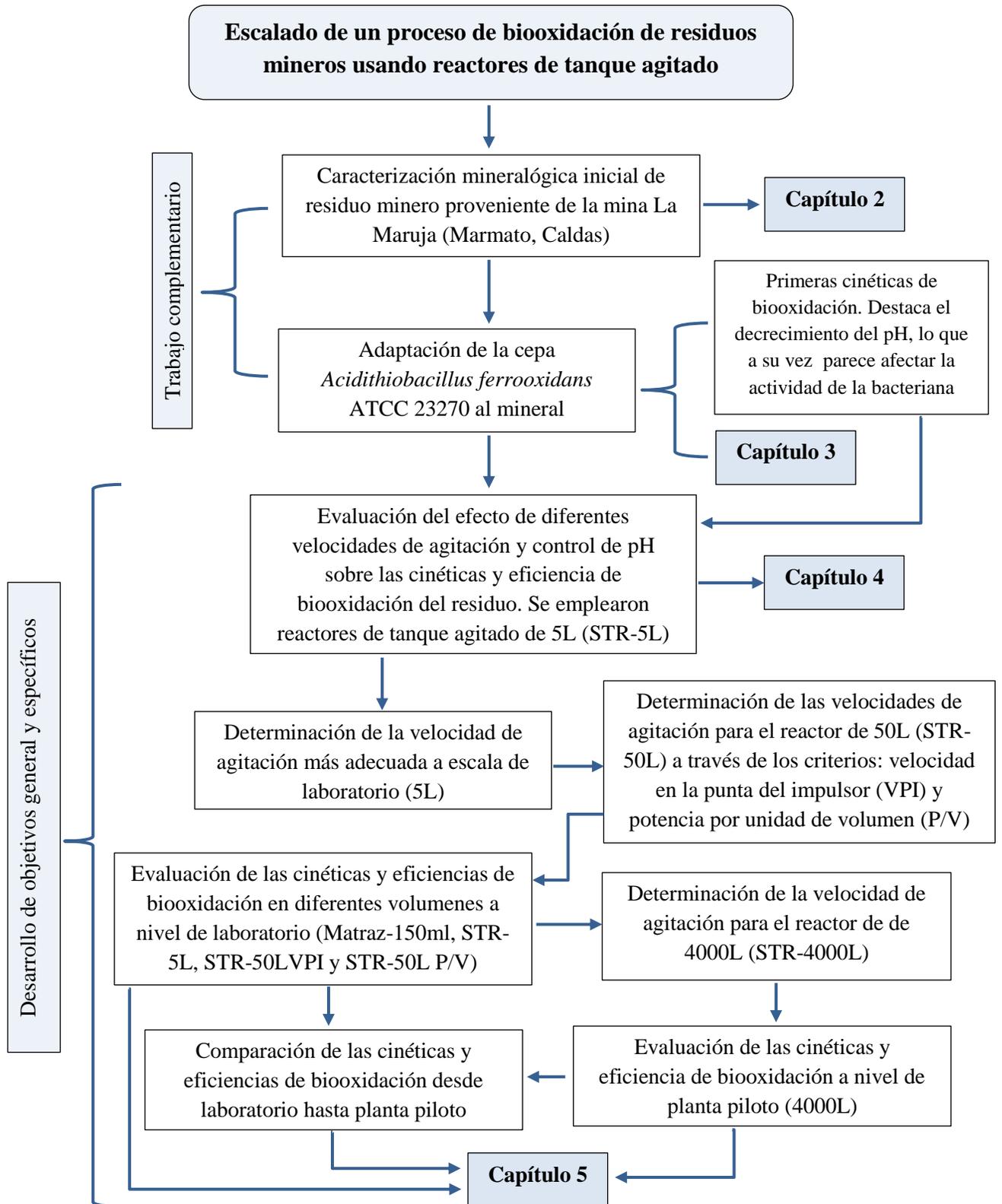
- Definir en reactores de tanque agitado, escala de laboratorio, la velocidad de agitación más adecuada para alcanzar altas tasas de disolución de sulfuros durante un proceso de oxidación biológica de residuos de minería aurífera empleando 10% de pulpa.
- Evaluar, a escala de laboratorio, criterios de escalado que permitan llevar hasta un nivel de planta piloto el proceso de biooxidación de colas de minería.
- Describir a nivel laboratorio y planta piloto las cinéticas asociadas a la disolución sulfuros durante la biooxidación de residuos mineros.

A partir de esta investigación, se espera obtener herramientas y/o conocimientos básicos preliminares, que en un futuro próximo contribuyan con la implementación en nuestro país de procesos de biooxidación de reservas secundarias a escala comercial.

Diseño metodológico global

En primer lugar, es necesario resaltar que en este trabajo se emplearon reactores de tanque agitado de diferentes volúmenes (5L, 50L y 4000L) disponibles en el Laboratorio de Biominería y Biohidrometalurgia (LBB), como agente biológico la cepa comercial *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 proporcionada por el mismo laboratorio, y residuos de minería provenientes de la explotación de oro en la mina La Maruja (Marmato, Caldas).

Durante el desarrollo de esta investigación, y como complemento fundamental para el escalado del proceso de biooxidación, se realizó un estudio inicial sobre las características mineralógicas del residuo, el cual permitió determinar la idoneidad del mineral como fuente de oro y sustrato para un proceso de biooxidación. Así mismo, a través de una adaptación preliminar del microorganismo, se obtuvo una cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con la capacidad de oxidar eficientemente el residuo de La Maruja. Los resultados de estos dos trabajos se resumen en los capítulos dos y tres. De acuerdo a los resultados mineralógicos y de adaptación, se determinó que el pH podía ser un parámetro determinante para la eficiencia global del proceso, por tanto se evaluó la necesidad de su control en reactores de tanque agitado de 5L; paralelamente en el mismo reactor, se estimó el nivel más adecuado de agitación a escala de laboratorio. Todo lo anterior se presenta en un cuarto capítulo. Partiendo de la velocidad de agitación establecida en el reactor de 5L, se definió entre dos criterios tradicionales de escalado, el más idóneo para llevar el proceso hasta un nivel de planta piloto. Los criterios de escalado fueron seleccionados con base en las necesidades del proceso de mantener una buena mezcla y bajos niveles de estrés hidrodinámico, para estos ensayos se empleó un reactor de 50L. Finalmente, con ayuda de la información obtenida en el laboratorio, se evaluó de manera preliminar la eficiencia del proceso de biooxidación de los residuos de La Maruja a escala piloto (4000L). Los resultados del ensayo en 4000L y una comparación de la biooxidación en los demás volúmenes de trabajo, serán descritos en el quinto capítulo. Cada uno de los capítulos presenta sus respectivas conclusiones y recomendaciones. Es importante resaltar que durante este trabajo, el seguimiento de diferentes cinéticas asociadas a parámetros básicos del proceso de biooxidación, fue esencial para la toma de decisiones. A continuación se presenta un diagrama de flujo que resume el diseño metodológico global implementado.



1. Marco teórico

1.1 Minerales refractarios

La extracción de oro está constituida por una serie de procesos que varían dependiendo del tipo y características del material a ser procesado. En general estos procesos secuenciales se dividen en: extracción del mineral desde su fuente, trituración, molienda, concentración gravimétrica, cianuración, recuperación y fundición (Maldonado *et al.*, 2002). En la cianuración, es usual encontrar dificultades durante la extracción del metal debido a la presencia de minerales refractarios, por lo que el oro se termina desperdiciando en vertederos mineros (Gentina y Acevedo, 2005).

Un mineral se considera refractario cuando la extracción de oro, usando métodos tradicionales, es menor al 60% del oro total en la mena. La refractariedad es ocasionada por la complejidad con que se aloja el metal valioso en el mineral y las características de los minerales de “la ganga” o minerales de bajo valor económico que acompañan. Entre las situaciones que dan origen a los minerales refractarios están: (i) oro finamente diseminado o encapsulado en matrices de sulfuros insolubles como la pirita, pirrotita, esfalerita, arsenopirita, calcopirita, galena, entre otros sulfuros y/o sulfosales asociados; (ii) oro asociado a telurios; (iii) oro contenido en sulfuros metálicos base, como plomo, cobre y zinc; (iv) oro en minerales con contenido de carbón orgánico (Bhappu, 1990; Gentina y Acevedo, 2005; Schippers *et al.*, 2013).

En la actualidad las investigaciones en minería se centran en la búsqueda y perfeccionamiento de tecnologías que permitan procesar estos minerales refractarios (primarios o en forma de “colas”), particularmente aquellos consistentes en matrices de sulfuros insolubles, de tal forma que se aproveche y extraiga la máxima cantidad de oro contenido en ellos. Entre los desarrollos alcanzados a la fecha están el proceso de tostación, que se presenta como el más extendido pero también el más contaminante, la oxidación química, la oxidación por presión y la biooxidación, esta última considerada como la tecnología más limpia y económica (Parga y Carrillo 1995; Gentina y Acevedo, 2005)

1.1.1 Sulfuros insolubles más abundantes

- La **pirita** o disulfuro de hierro (FeS_2) es el sulfuro más abundante en la corteza terrestre. Este mineral de bajo valor económico, puede estar asociado a otros sulfuros y suele tener inclusiones de metales valiosos como el oro, por lo que es común en vetas auríferas. Su estructura química está compuesta de hierro ferroso (Fe^{+2}) y el anión disulfuro S_2^{-2} . Como compuesto puede tener dos estructuras cristalinas, la de la pirita que es cúbica y la marcasita que se presenta como una estructura ortorrómbica menos estable. La oxidación de la pirita que resulta en la producción de ion ferroso, sulfatos, sulfuro de hidrogeno, hidróxido de hierro, entre otros, es uno de los factores, que no controlados, contribuye en mayor medida con la formación de drenajes ácidos, un problema ambiental actual (Marchand, 2003; Chandra y Gerson, 2010).
- La **arsenopirita** (FeAsS) es un mineral común en los depósitos de oro, donde este último frecuentemente se encuentra finamente incrustado. Este sulfuro es la fuente mineral de arsénico más amplia de la superficie terrestre. Es un compuesto estable, pero bajo ciertas condiciones puede oxidarse liberando el arsénico en las formas H_2AsO_4 , H_3AsO_3 y H_3AsO_4 (Márquez *et al.*, 2012). Superficialmente se puede disolver mediante la acción de ion férrico y el oxígeno (Ballester, 2005; Corkhill y Vaughan, 2009).
- La **esfalerita** (ZnS) es un mineral ampliamente distribuido en la naturaleza. Se encuentra asociado a la pirita y pirrotita, y otros sulfuros de cobre como la covelita, bornita y calcopirita. Es estable a amplios rangos de temperatura y presión. Al igual que los sulfuros anteriores es un mineral susceptible a ser oxidado por la acción del hierro férrico y el oxígeno. Generalmente se emplea como fuente de Zn (Lusk y Calder, 2004; Ballester, 2005).
- La **galena** (PbS) es un monosulfuro de plomo susceptible a la oxidación, durante la cual generalmente presenta un alto consumo de ácido (Bhatti *et al.*, 1993; Mejía, 2010). Se emplea como fuente de plomo y eventualmente puede presentar Ag de manera económica. Es común encontrarla como fase menor en depósitos de oro.
- La **calcopirita** (CuFeS_2) es un mineral formado por átomos de cobre, hierro y azufre. Su estructura cristalina consiste en una red tetragonal, con iones de sulfuro rodeados por cuatro metales de cobre y hierro. Es la fuente más abundante de cobre en el mundo, metal que se extrae principalmente por procesos pirometalúrgicos e hidrometalúrgicos, en este último campo la biolixiviación ha sido ampliamente estudiada y aplicada (Córdoba *et al.*, 2008).
- La **pirrotita** (Fe_{1-x}S) es un sulfuro con una estructura desordenada que resulta de la unión no estequiométrica del hierro y el azufre. Comprende varios intermediarios como el Fe_8S_9 , Fe_9S_{10}

$\text{Fe}_{10}\text{S}_{11}$ y Fe_7S_8 . Junto a la pirita es uno de los sulfuros de hierro más comunes en colas de minería aurífera. Puede ser oxidada por hierro férrico por lo que la biooxidación se convierte en una alternativa para su solubilización (Janzen *et al.*, 2000).

1.2 Biooxidación

La biooxidación es una tecnología que estudia y aplica las interacciones microorganismo – mineral para mejorar la explotación de metales de interés industrial (Rossi, 1990). Mediante este pretratamiento los sulfuros insolubles son disueltos por la acción microbiana, de tal manera que los metales preciosos alojados en la fase sólida quedan más disponibles y/o expuestos para ser extraídos por un agente químico, comúnmente el cianuro (Ballester, 2005; Rawlings, 2005; Hoque y Hobbard, 2011; Anjum *et al.*, 2012; Schippers *et al.*, 2013; Johnson, 2014; Mishra y Rhee, 2014).

1.2.1 Mecanismos de biooxidación

Desde hace varias décadas se propusieron dos mecanismos que explican el proceso de biooxidación, el directo y el indirecto. El primero supone la adhesión del microorganismo al mineral y la posterior oxidación enzimática de este. Entre tanto, el mecanismo indirecto involucra un ciclo de conversiones de hierro férrico/ferroso, donde el hierro ferroso es oxidado por los microorganismos, el ion férrico actúa como un oxidante sobre la superficie de los sulfuros, se reduce a ferroso quien nuevamente es biooxidado (Figura1-1) (Tributsch, 2001; Ballester, 2005; Sand *et al.*, 2001; Hoque y Hobbard, 2011; Kaksonen *et al.*, 2014a).

Aunque aún no está bien dilucidado el mecanismo real de biooxidación, los investigadores se inclinan cada vez más por el mecanismo indirecto (Liu *et al.*, 2011), el cual se ha llegado a dividir en dos submecanismos, el indirecto de contacto y el de no contacto. En el de contacto los microorganismos se adhieren a la superficie del mineral mediante sustancias poliméricas extracelulares, capa donde la bacteria genera hierro férrico, que es reducido nuevamente a hierro ferroso luego de su reacción con el mineral. En el mecanismo de no contacto las bacterias suspendidas oxidan el hierro ferroso en solución, el ion férrico resultante entra en contacto con la superficie del mineral y se reduce nuevamente para reiniciar el ciclo (Rawlings, 2002; Rohwerder *et al.*, 2003; Sand y Gehrke, 2006).

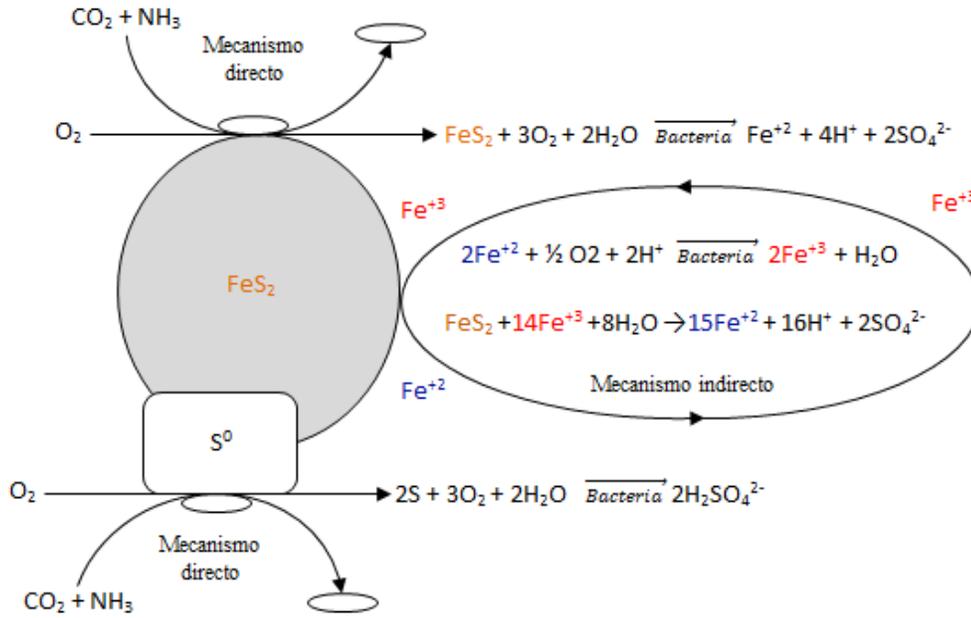


Figura 1-1: Mecanismos de biooxidación de la pirita: directo e indirecto. Tomado de Hoque y Hobbard (2011)

1.2.2 Mecanismos de reacción

Paralelo a los mecanismos generales de biooxidación, se han definido dos mecanismos de reacción asociados a la disolución de los sulfuros, ellos son el mecanismo vía tiosulfato y el polisulfuro, que toman lugar dependiendo de mineral a solubilizar (Figura 1-2) (Rohweder *et al.*, 2003; Kundu y Kumar, 2014; Simate y Ndlovu, 2014; Tao y Dongwei, 2014).

El mecanismo tiosulfato (Figura1-2A) es propio de sulfuros como la pirita (FeS_2), molibdenita (MoS_2) y la volframita (WS_2), cuyas bandas de valencia se forman por la combinación de orbitales procedentes solo de átomos metálicos, y sus enlaces son oxidados exclusivamente por el hierro férrico hexahidratado. Luego de determinadas reacciones sucesivas se libera tiosulfato como principal intermediario de la oxidación. Los productos finales de este mecanismo son ácido y sulfato. Por otro lado, el mecanismo polisulfuro se da con minerales que además de ser atacados por un oxidante como el hierro férrico, también pueden ser despojados de electrones por un ácido. Entre estos sulfuros se encuentran la esfalerita (ZnS), calcopirita (CuFeS_2), arsenopirita (FeAsS) y la galena (PbS), que a diferencia de los minerales del grupo de la pirita, poseen bandas de valencia formadas por orbitales procedentes tanto del metal como del azufre. Tras una serie de reacciones, los sulfuros metálicos son degradados a polisulfuros, intermediarios que dan lugar a uno de los productos más importantes de este mecanismo, azufre elemental (Rohwerder *et al.*, 2003;

Ballester, 2005; Sand y Gehrke, 2006; Sekhar *et al.*, 2009a; Kundu y Kumar, 2014; Tao y Dongwei, 2014).

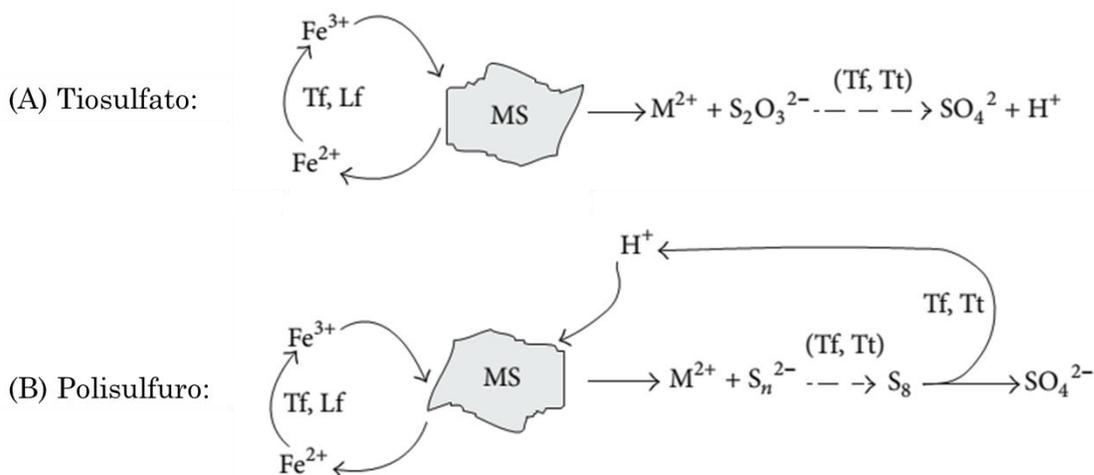


Figura 1-2: Comparación de los mecanismos de oxidación de los sulfuros. (A) Mecanismo tiosulfato; (B) Mecanismo polisulfuro. Tomado de Kundu y Kumar (2014).

1.2.3 Microorganismos

Las transformaciones naturales que sufrían ciertos compuestos de hierro y de azufre como consecuencia de la disolución de diversos minerales, supuso la existencia de un grupo especial de microorganismos que pudieron aislarse por primera vez en 1951 (Gómez y Cantero, 2005), desde entonces han sido extensivamente investigados y aplicados en el sector de la hidrometalurgia.

Estos microorganismos en su mayoría, se caracterizan por su habilidad de oxidar sulfuro inorgánico y/o hierro ferroso en presencia de O_2 para obtener energía, y fijar CO_2 como fuente de carbono, metabolismo quimiolitotrofo (Rawlings *et al.*, 2003). También están facultados para crecer en ambientes de extrema acidez y sobrevivir en presencia de ciertos metales pesados. De acuerdo a su tolerancia a la temperatura se les ubica en tres grupos, mesófilos ($25 - 35^\circ\text{C}$), termófilos moderados ($35 - 50^\circ\text{C}$) y termófilos extremófilos ($50 - 80^\circ\text{C}$) (Olso *et al.*, 2003).

Las mesófilas *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* se consideran las bacterias clásicas asociadas a los procesos de biooxidación, fueron las primeras en aislarse, y son de las más empleadas y estudiadas. Junto a la termófila moderada *Acidithiobacillus caldus* pertenecen al grupo de las Gram negativas γ -proteobacterias. *A. ferrooxidans* está dotada con un

amplio metabolismo, que le permite sobrevivir en ambientes aerobios y/o anaerobios, oxidando o reduciendo determinadas especies de hierro, sulfuros, entre otros compuestos como ácido fórmico e hidrogeno. Además de carbono, puede fijar nitrógeno atmosférico bajo ciertas condiciones, lo que confiere importancia en el tratamiento de drenajes ácidos y en los ciclos biogeoquímicos (Rohweder *et al.*, 2003; Valdés *et al.*, 2008). Otras proteobacterias usadas en los procesos de biolixiviación son las de las del género *Acidiphilum*, como *Acidiphilium acidophilum* (Rohweder *et al.*, 2003).

Leptospirillum (*L. ferrooxidans* y *L. ferriphilum*) es otro género microbiano que ha adquirido gran importancia en el campo de la biooxidación de minerales. Se ha encontrado que la especie *L. ferrooxidans* al crecer conjuntamente con *A. thiooxidans* puede oxidar la pirita mucho más rápido que *A. ferrooxidans*, y su resistencia a temperaturas de 45°C la hace más atractiva en procesos comerciales. Su principal limitante sin embargo, es el espectro reducido de sustratos que puede asimilar, solo crecen bajo condiciones aeróbicas oxidando hierro (Olson *et al.*, 2003; Arroyave, 2008).

Dentro de los termófilos moderados se encuentran las bacterias Gram-positivas del género *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* y *Sulfobacillus*, y en los termófilos extremos están las arqueobacterias *Sulfolobales*, *Sulfobulos*, *Acidianus*, *Metallosphaera* y *Sulfarisphaera* (Rohweder *et al.*, 2003).

Adicionalmente a las bacterias, Sarpong *et al.* (2011) le apuestan a la capacidad oxidante del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, este microorganismo además de generar peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de oxidar pirita y arsenopirita, también secreta enzimas oxidativas como la lignina y manganeso peroxidasa, catalizadores en las reacciones de degradación de materiales carbonáceos, característicos de minerales doblemente refractarios.

1.2.4 Factores que intervienen en un proceso de biooxidación

El grado de actividad que presenten los microorganismos durante una biooxidación y la efectividad global del proceso, dependerá en gran medida de las condiciones ambientales del sistema de reacción. A continuación se realiza una descripción breve de los factores más influyentes.

- **Temperatura:** La temperatura es un factor determinante en la actividad bacteriana y debe ser especialmente controlado debido a los intervalos óptimos permitidos por los diferentes grupos de bacterias (mesófilos, termófilas moderadas y extremas). De no crecer bajo condiciones

adecuadas de temperatura, los microorganismos se inhiben o mueren trayendo consigo una disminución de las tasas de oxidación (Hayward *et al.*, 1997). En la mayoría de los procesos comerciales se emplean bacterias mesófilas, principalmente las de los géneros *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum*, no obstante la tendencia actual es estudiar y aplicar bacterias termófilas debido a los elevados costos y difícil control de las altas temperaturas ocasionadas por las reacciones exotérmicas asociadas a la biooxidación (Arroyave, 2008; Haris *et al.*, 2009; Rivadaneira, 2011).

- **pH:** En su mayoría los microorganismos asociados al proceso de biooxidación viven en ambientes ácidos, y mantener el pH por debajo de 3 es esencial para que se dé la oxidación del ion ferroso (Das *et al.*, 1999; Gómez y Cantero, 2005). Tal como ocurre con la temperatura, también existen rangos óptimos pH que varían de acuerdo a la bacteria, mientras *A. ferrooxidans* tolera pH entre 1.0 y 2.5, *L. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* son activos a pH más bajos (Battaglia *et al.*, 1994; Dew *et al.*, 1997; Valdés *et al.*, 2008). Otro aspecto muy importante relacionado con este parámetro es la formación de subproductos no deseados como la jarosita, por lo general se prefiere y trata de trabajar a pH bajos tolerados por las bacterias, ya que a menor pH menor precipitación (Rivadaneira, 2011).
- **Potencial de óxido-reducción (Eh):** El potencial de óxido-reducción (Eh) es una medida de la tendencia de una solución a ser oxidada o reducida, es decir, su habilidad de capturar o ceder electrones. En la mayoría de los casos este parámetro es usado como una medida indirecta del crecimiento microbiano y la evolución del proceso de oxidación biológica. Por lo general cuando se emplea *A. ferrooxidans* el comportamiento del Eh tiende a crecer desde valores aproximados de 320mV hasta 580mV (Rossi, 1990; Kundu y Kamur, 2014). Normalmente la oxidación de sulfuros alcanza sus mayores velocidades cuando los valores de Eh superan los 400 - 450 mV (Acevedo y Gentina, 2005; Arroyave, 2008; Rivadaneira, 2011).
- **Nutrientes:** Como se mencionó previamente, la gran mayoría de los microorganismos involucrados en los procesos de biooxidación son quimiolitotrofos, es decir, obtienen su carbono del CO₂ atmosférico y la energía de compuestos inorgánicos como el Fe⁺² o S⁻², provenientes de los minerales. Los demás nutrientes básicos, N, Mg, P y K, se suministran en proporciones adecuadas al medio de cultivo en forma de sales, entre los medios sintéticos más utilizados se encuentran 9 K y el T&K. Cuando no hay mineral, el sustrato limitante es la fuente de energía adicionada en forma de sulfato ferroso. Al emplear minerales la situación se

torna compleja ya que coexiste más de un sustrato, lo que a su vez podría implicar la activación de controles metabólicos en los microorganismos que regulen el consumo de las diferentes fuentes de energía (Acevedo y Gentina, 2005).

- **Inhibidores:** En los concentrados minerales se presentan algunos compuestos que resultan tóxicos para las bacterias cuando sus concentraciones son más altas a las toleradas por los microorganismos. Algunos de estos inhibidores son cationes o aniones que resultan de la solubilización de los sulfuros, como el Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , AsO_4^{3-} , entre otros. Es posible que el efecto negativo de estas especies se pueda contrarrestar con una adecuada adaptación (Dopson, 2003; Acevedo y Gentina, 2005; Haghshenas *et al.*, 2009). Por otro lado, compuestos orgánicos como el extracto de levadura, peptona, aminoácidos, ácidos carboxílicos, detergentes, surfactantes catiónicos y compuestos de amonio, muchos de ellos empleados en la elaboración de medios de cultivo, afectan el crecimiento de *A. ferrooxidans* y su actividad oxidativa (Tuttle y Dugan, 1976). Este efecto inhibitorio de los compuestos orgánicos sobre la oxidación del ion ferroso por *A. ferrooxidans*, ha sido estudiado por Frattini *et al.* (2000) como una alternativa para prevenir la generación de drenajes ácidos. Finalmente, según Acevedo y Gentina (2005), los agentes de flotación interfieren en el crecimiento microbiano y la solubilización de minerales de forma más significativa que los mismos compuestos orgánicos.
- **Oxígeno y dióxido de carbono:** El O_2 y el CO_2 se consideran los dos componentes gaseosos de mayor importancia en un proceso de biooxidación, el oxígeno por ser el aceptor final de electrones y el dióxido de carbono la fuente principal de carbono (Acevedo y Gentina, 2005). Aunque algunas especies microbianas pueden responder en ambientes deficientes en oxígeno, las vías metabólicas alternativas conducen a resultados inversos al deseado, como ejemplo *A. ferrooxidans* en lugar de oxidar el Fe^{+2} , reduce el Fe^{+3} (Watling, 2011). Para evitar lo anterior es necesario que el oxígeno sea suministrado a una velocidad al menos igual a la demanda, algunos autores recomiendan mantener la concentración de oxígeno disuelto en el sistema, mínimo en 2 mg/L para *A. ferrooxidans* (Gómez y Cantero, 2005). Por otro lado, según Gericke (2009), la concentración crítica de OD para un proceso de oxidación de minerales es 1 mg/L. Respecto al CO_2 se ha sugerido, que las máximas tasas de crecimiento se obtienen cuando este compuesto se encuentra en un rango de concentración entre 7-8%, incrementos por encima del 8% pueden resultar inhibitorios para el crecimiento del cultivo (Gómez y Cantero, 2005; Watling, 2011).

- **Minerales e interacciones galvánicas:** La disolución de los distintos sulfuros no es idéntica y su solubilización depende de la estructura molecular interna de cada mineral (Rawlings *et al.*, 2003). Los sulfuros son considerados semiconductores en las reacciones de disolución y pueden actuar como cátodos o ánodos. Cada mineral tiene su propio potencial de electrodo dependiendo de factores como la estructura cristalina, la composición de la solución y la concentración de iones. En la interacción de minerales, el que tiene más alto potencial, cátodo, corroe u oxida al de menor potencial, ánodo; este es el caso de la pirita y la esfalerita, donde el primero incrementa por efecto galvánico, la disolución del segundo (Das *et al.*, 1999; Tao y Dongwei, 2014).
- **Densidad de pulpa:** La cantidad de mineral en el medio es un factor que depende en gran medida de la configuración del reactor seleccionada. Cuando se eligen columnas de percolación o pilas el porcentaje de mineral a tratar puede ser casi del 100% y los efectos negativos sobre los microorganismos se concentran en las condiciones ambientales cambiantes que se presentan en el interior de estos sistemas de oxidación, como ejemplo, altas temperaturas y baja concentración de oxígeno (Watling, 2011). En un reactor de tanque agitado, sin embargo, solo se admiten porcentajes máximos de 20% de pulpa, mayores cantidades de mineral precisan el aumento de la agitación, y con esta la fricción de los sólidos sobre las bacterias causando graves daños celulares. La concentración de oxígeno disuelto también se ve afectada con la densidad de pulpa al disminuir la velocidad de transferencia, lo que a su vez extiende los tiempos de biooxidación (Deveci, 2002).
- **Tamaño de partícula:** El tamaño de partícula es un parámetro crítico en la biooxidación que influye en la velocidad del proceso y los costos de molienda. Tal como sucede con la densidad de pulpa, dependiendo del reactor se requiere de un tamaño de partícula específico. Cuando se usa percolación, la dimensión de las partículas debe ser lo suficientemente grande para permitir la circulación del aire y los líquidos biolixiviados, mientras en reactores de tanque agitado se prefieren partículas más pequeñas con una área superficial mayor y por tanto más sitios activos donde se puede iniciar su oxidación (Acevedo y Gentina, 2005).
- **Subproductos:** Un proceso de biooxidación puede dar lugar a tres tipos de subproductos, yeso, compuestos de hierro precipitado y azufre. El yeso se genera a partir de la neutralización de carbonatos y silicatos muchas veces presentes en los concentrados de sulfuro. El hierro férrico producto de la oxidación bacteriana puede precipitar en compuestos como goethita,

jarosita o hematita, minerales que se forman de acuerdo a las condiciones de pH, Eh y la concentración del ion férrico. El azufre se produce durante la disolución de los minerales por el mecanismo polisulfuro y precipita en una capa densa, protectora y aislante sobre el mineral. En lo posible se deben controlar todas las condiciones de operación del proceso, principalmente el pH y la temperatura, para minimizar la producción de estos compuestos ya que estas capas de subproductos limitan las velocidades de disolución de los sulfuros (Das *et al.*, 1999).

- **Agitación:** Este factor toma particular importancia cuando se trabaja en reactores agitados. Se ha observado que un nivel inadecuado de la agitación en un proceso con *A. ferrooxidans*, conduce a la disminución de las tasas de oxidación, produce daños celulares en las bacterias suspendidas y reduce la adsorción de células en la superficie del mineral, adicional a esto, la actividad metabólica asociada al consumo de oxígeno, oxidación de hierro ferroso y la expresión de genes fundamentales del sistema oxidativo del hierro como el *rus*, sufren un decrecimiento (Deveci, 2002; Deveci, 2004; Sun *et al.*, 2012). Encontrar una velocidad de agitación adecuada, que equilibre aspectos como una adecuada mezcla entre las tres fases del sistema, velocidades de transferencia de masa y calor aceptables, buena suspensión de sólidos, y bajo estrés hidrodinámico, es imprescindible para cualquier proceso de biooxidación llevado a cabo en reactores de tanque agitado.

1.2.5 Configuraciones de biorreactores más empleados en biooxidación.

Una de las ventajas que ofrece el proceso de biooxidación, es que puede llevarse a cabo en diferentes configuraciones de biorreactores, entre los cuales destacan las biopilas y los reactores de tanque agitado (Watling, 2011; Sekhar *et al.*, 2012; Zammit *et al.*, 2012).

- **Biopilas:** La biopila consiste en una cama estática de mineral que es aireada e irrigada constantemente con una solución de nutrientes y otros compuestos indispensables para los microorganismos. Las bacterias crecen sobre la superficie de los sulfuros produciendo hierro férrico y ácido, principales agentes oxidantes de los minerales (Rawlings, 2005).

Entre los aspectos positivos de esta configuración destacan su economía y facilidades de montaje. No es indispensable inocular debido a que se emplean los microorganismos nativos presentes en el mineral, microorganismos que solo precisan de una aclimatación preliminar (proporcionarles las condiciones ambientales y de nutrientes necesarias para incentivar su crecimiento). Finalmente, esta configuración ofrece la posibilidad de tratar de manera

simultánea una concentración elevada de material. Entre las desventajas se encuentran su difícil control, no se conoce con certeza lo que ocurre el cada punto del sistema, cada lote toma muchos meses en tratarse, y se aplica principalmente para metales de bajo valor comercial como el cobre, cobalto, níquel y zinc de menas de bajo grado por lo que se prefiere para procesos de biolixiviación (Watling, 2011).

- **Tanques agitados:** Un reactor de tanque agitado consiste en un recipiente cilíndrico con fondo semiesférico, al que se acopla un impulsor cuyo diseño depende de las características reológicas del fluido y el tipo de células, un difusor de aire u oxígeno, accesorios como líneas de entrada y salida, serpentines o chaquetas para el control de la temperatura, y una serie de sondas para la medición permanente de las condiciones del proceso (Mc Cabe *et al.*, 2007; García *et al.*, 2011).

El principal reto de este tipo de configuración, es mantener una buena mezcla de la suspensión, evitando así zonas muertas en el interior del tanque. En el caso de un proceso de biooxidación, la suspensión consiste en un sistema de tres fases, una líquida compuesta por el medio de cultivo y las bacterias libres, una sólida consistente en el mineral a biooxidar, y una gaseosa formada por el O₂ y CO₂ necesarios en la respiración y crecimiento bacteriano. Para lograr una mezcla adecuada existe una serie de impulsores divididos en dos tipos, los de flujo axial y radial (Mc Cabe *et al.*, 2007), en el caso de los procesos biohidrometalúrgicos se prefieren los de flujo axial, puesto que permiten dispersar la fase gaseosa y suspender los sólidos al mismo tiempo (Nienow y Bujalki, 1997).

A diferencia de las pilas, el uso de reactores agitados requiere de un inóculo para que el proceso sea más eficiente y rápido (Doran, 1998; Watling, 2011). Esta configuración ofrece además múltiples ventajas como, (i) cortos tiempos de operación; (ii) permite monitorear y/o controlar parámetros como la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno disuelto garantizando unas condiciones adecuadas para los microorganismos y potenciando las velocidades de disolución; (iii) se pueden implementar procesos por lotes y/o en continuo de una o varias etapas. Paralelamente, como gran desventaja se tiene la concentración de sólidos a ser tratada, la cual no debe superar el 20% (Doran, 1998; Rawlings, 2005; Rawlings y Johnson, 2007; Sekhar *et al.*, 2012).

1.2.6 Biooxidación en la actualidad

Desde los años 70 se demostró que la biooxidación aumenta la recuperación de oro a partir de sulfuros, no obstante solo diez años después obtuvo el reconocimiento como tecnología viable en el tratamiento de minerales refractarios y se comenzó a emplear exitosamente a escala comercial (Rawlings *et al.*, 2003). Según Schippers *et al.* (2013), al menos 14 proyectos de biooxidación a nivel industrial pueden ser identificados en las bases de datos del Mineral Economics Group y en otras fuentes como el BGR databanks (Tabla 1-1). Hasta el 2010 estas industrias producían 84 t de oro, correspondiente al 3.3% de la producción mundial estimada en 2450 t (Schippers *et al.*, 2013).

Tabla 1-1: Estado de la producción anual de oro en los proyectos que emplean procesos de biooxidación. Datos consolidados hasta el año 2010. Tomada y adaptada de Sekhar *et al.* (2012), Brierley y Brierley (2013), Schippers *et al.* (2013), Kaksonen *et al.*, (2014a).

País	Operación	Operador del proyecto	Capacidad de procesamiento (t/día)	Au (oz/año)
Australia	Fosterville	UnEnergy Capital Ltd	211	112.000
Australia	Tasmania	BCD Resources NL	~ 70	80.000
Australia	Wiluna	Franco-Nevada Corp	158	120.000
China	Jiaojia		-	55.000
China	Jinfeng	Eldorado Gold	790	150.000
China	Laizhou	Shandong Tiancheng Biotechn	~100	65.000
Ghana	Bogoso-Prestea	Golden Star Resources	750	280.000
Ghana	Obuasi	Anglogold Ashanti	960	400.000
Kazakhstan	Suzdal	Nord Gold (Severstal)	196	72.000
New Zealand	Reefton	Royalco Resources Ltd	-	87.300
Peru	Coricancha (Previamente Tamboraque)	Nyrstar	60	15.000
Russia	Olimpiada	Polyus Gold Mining	-	839.000
South Africa	Fairview	Pan African Resources PLC	62	98.000
Uzbekistan	Kokpatas	Navoi Mining	1069	353.000

Todas las plantas industriales de biooxidación que se citan en el Tabla 1-1, trabajan con reactores de tanque agitado a través de los procesos BIOX o BacTech Bacox (Jaeheon, 2011; Sekhar *et al.*, 2012; Brierley y Brierley, 2013). El proceso BIOX fue desarrollado por Gencor y opera entre 40-45°C con bacterias mesófilas. Para el proceso BacTech Bacox se seleccionan termófilos moderados y se desarrolla entre 45 y 55°C (Sekhar *et al.*, 2012). Otros tipos de procesos diseñados para la biooxidación y/o biolixiviación de minerales a nivel comercial son: el MINBAC que usa

consorcios de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* y el GEOCOAT que se realiza en pilas, el Mintek, BioNIC/BioZinc y BioCOP (Gentina y Acevedo, 2005; Carretero *et al.*, 2011).

Por otro lado y debido al agotamiento de los depósitos primarios de metales valiosos, la producción actual depende en gran medida de los depósitos secundarios o de baja ley. Entre los minerales de baja ley se encuentran los residuos mineros, quienes a menudo contienen cantidades apreciables de metales valiosos que pueden ser recuperados mediante tratamientos de biooxidación y biolixiviación (Hoque y Hobbar, 2011; Schippers *et al.*, 2013). Un ejemplo exitoso del uso de residuos como fuente de metales, es el de la mina Kasese en Uganda, en esta se emplean reactores de tanque agitado a nivel industrial para la recuperación de cobalto desde 900 kt de colas de piritita cobaltífera, residuos generados entre 1956 y 1982 (Sekhar *et al.*, 2012). Respecto a la extracción de oro, Zahari *et al.* (2003) reportan recuperaciones del 65% y 44% desde los residuos de la mina Lubuk Mandi en Malaysia, empleando consorcios de *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *Caldibacillus ferrivorus*. Schippers *et al.* (2008) por su lado, lograron recuperaciones de oro y plata del 97% y 50% respectivamente, en este trabajo se seleccionaron los residuos de un vertedero localizado en la villa Ticapampa, Perú, y como agente biooxidante un consorcio de *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*.

1.3 Nociones generales sobre el escalado de bioprocesos

Pese al éxito de otros países en la implementación a gran escala de la biooxidación de sulfuros, en Colombia hasta ahora se comienzan a dar los primeros pasos con miras al escalado de este proceso desde laboratorio hasta planta piloto en reactores de tanque agitado (Arroyave, 2008).

El escalado ascendente de cualquier proceso biotecnológico en reactores de tanque agitado, implica importantes desafíos debido a la dificultad que precisa controlar en un reactor de grandes dimensiones todos los factores que afectan el crecimiento microbiano (Junker, 2003). Adicionalmente es imprescindible entender el proceso, las condiciones de operación, las interacciones entre los biocatalizadores, sustratos y el ambiente físico del reactor (Tufvesson *et al.*, 2010). Debido a que no existe una fórmula o modelo completamente eficaz con el que se logre escalar un proceso de manera efectiva, es necesario recurrir a modelos físicos de menores proporciones (reactores más pequeños), y con base en los resultados experimentales de estos, pasar a la escala deseada (Orozco, 2012).

El método tradicional que se emplea en el escalado de un bioproceso está basado en criterios empíricos que se mantienen constantes de un nivel a otro (Tabla 1-2). Su gran limitante, sin embargo, es que solo se relacionan con fenómenos de transporte inherentes al sistema y deja de lado la cinética celular, complicándose aún más cuando cambia el régimen de flujo (Hsu y Wu 2001). También es habitual y recomendado conservar la similitud geométrica en la configuración general de los reactores para procurar una duplicación de los patrones de mezcla (Gormeley, 1992).

Tabla 1-2: Criterios para cambio de escala en tanques geoméricamente similares con medio y propiedades físicas constantes ($N_{Re} > 10^4$, $N_p = \text{constante}$). Tomada de Quintero (1981).

Criterio		Relación
Potencia por unidad de volumen constante	$P/V \propto (N^3 D^2)$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{2/3}$
Flujo proveniente del impulsor por unidad e volumen constante	$Q/V \propto N$	$\frac{P_1}{P_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^5$
Velocidad tangencial constante	$\pi ND \propto K'$	$\frac{N_1}{N_2} = \frac{D_2}{D_1}$
Numero de Reynolds constante	$N_{Re} \propto ND^2$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^2$
Igual tiempo de mezcla	$f = t_M N^{2/3} D^{-1/6}$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{1/4}$
$k_L a$ constante	$k_L a \propto N^\alpha D^{2\alpha-1}$	$\frac{N_2}{N_1} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{2/3}$
$k_L a$ constante	$k_L a \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha$	$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{\frac{2\alpha-1}{\alpha}}$
$k_L a$ constante	$k_L a \propto \left(\frac{P}{D^3}\right)^\alpha V S^\beta$	$\frac{N_1 \alpha_1}{N_2 \alpha_2} = \left(\frac{D_1}{D_2}\right)^{\beta/3} \left(\frac{D_2 \alpha_2}{D_1 \alpha_1}\right)^{2/3}$ $\alpha \neq K; \beta \neq K$

La elección de los criterios (Tabla 1-2) depende del tipo de proceso, principalmente del material biológico, el medio de cultivo y el parámetro (potencia o consumo de energía, esfuerzos de corte, oxígeno disuelto, régimen de flujo, homogeneidad del fluido, etc.) más importante que favorezca la economía y productividad del proceso.

Otros métodos usados en el escalado se clasifican en (Ruiz, 2009; Orozco, 2012):

- Análisis dimensional
- Análisis de régimen y escalado descendente
- Tratamiento y error
- Modelos matemáticos usando la teoría del control

2. Evaluación de las características mineralógicas de residuos de minería aurífera, como materia prima para biooxidación.

Resumen.

Un residuo de minería aurífera proveniente del distrito minero de Marmato (Caldas) fue sometido a una caracterización mineralógica con el fin de establecer su potencial como fuente de oro, grado de refractariedad, y principalmente anticipar con base en sus características mineralógicas, los posibles inconvenientes durante su biooxidación con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Para esta caracterización se emplearon diferentes técnicas de análisis como Fluorescencia de rayos X (FRX), Difracción de rayos X (DRX), Microscopia Óptica de Luz Plana Polarizada (MOLPP/LR) y Microscopia Electrónica de Barrido (SEM/EDX). El análisis granulométrico del residuo indicó que en su mayoría está compuesto por partículas de 38 a 75 μm , mallas 325 y 200. El ensayo al fuego arrojó concentraciones de 1.74 g/t de Au y 37.42 g/t de Ag. Los elementos más abundantes fueron el S, Fe y Si con porcentajes de 28.7%, 24.5%, y 14.2%, respectivamente. Las fases minerales predominantes fueron la pirita (34.1%) y el cuarzo (25.1%). El oro se observó diseminado como partículas micrométricas ($<5\mu\text{m}$) en los granos de pirita, sugiriendo que el residuo presenta refractariedad física. No se encontraron evidencias de otros tipos de refractariedad. De acuerdo a lo anterior, el residuo de La Maruja resulta indicado para el uso de un pretratamiento oxidante como la biooxidación; no obstante, de acuerdo a sus características mineralógicas y alta concentración de pirita, se prevé que durante su biooxidación pueden ocurrir caídas considerables del pH y resistencia del mineral a ser oxidado, adicionalmente los metales pesados presentes (Pb, Zn, Cu, Fe y Ag) y la granulometría del mineral, eventualmente podrían afectar la actividad de *A. ferrooxidans*, por lo que se recomienda una adaptación preliminar de la cepa.

Palabras clave: biooxidación, caracterización mineralógica, refractariedad, residuos mineros.

Abstract

Mine tailings from Marmato (Caldas) were subjected to a mineralogical characterization in order to establish their potential as a gold source, refractoriness degree, and anticipate the potential drawbacks during biooxidation with *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on their mineralogical characteristics. In this characterization, different analysis techniques like X-ray fluorescence (XRF), X-ray diffraction (XRD), Optical Microscopy Polarized Light Plana (MOLPP / LR) and Scanning Electron Microscopy (SEM / EDX) were used. The sieve analysis indicated particles sizes of 38 to 75 microns. Fire assay produced concentrations of 1.74 g/t of gold and 37.42 g/t of silver. The most abundant elements were S, Fe and Si with percentages of 28.7%, 24.5% and 14.2% respectively. The predominant mineral phases were pyrite (34.1%) and quartz (25.1%). Gold was found disseminated in the pyrite grains, its size was <5microns, thus suggesting tailing's physical refractoriness, this was the only kind of refractoriness found. La Maruja's tailings becomes then a good candidate for use in a biooxidation process. However, based on its mineralogical characteristics and higher pyrite concentrations significant pH declines and resistance to be oxidized are to be expected during the biooxidation process of this mine tailings. It is also possible that *A. ferrooxidans* activity will be affected by the presence of heavy metals (Pb, Zn, Cu, Fe and Ag) and mineral particle size. Therefore, a preliminary adaptation of the strain to the mineral is recommended.

Keywords: biooxidation, mineralogical characterization, refractoriness, mine tailings.

2.1 Introducción

Una de las características mineralógicas con mayor influencia en la recuperación del oro es la refractariedad, un problema bien conocido y documentado mundialmente. Esta condición ocurre en minerales auríferos donde parte del oro está encapsulado o enlazado químicamente a diversos sulfuros dificultando su extracción (Hoque y Hobbard, 2011). Como consecuencia en Colombia, y particularmente en el distrito minero de Marmato, diariamente se depositan en vertederos una gran cantidad de residuos (aproximadamente 120 ton/día en una mina tecnificada) con concentraciones remanentes del valioso metal (Gordillo *et al.*, 2009; Hoque y Horbbard, 2011; Schippers *et al.*, 2013).

La biooxidación surge como una alternativa viable para la recuperación de metales preexistentes en residuos mineros refractarios, que se caracteriza por sus bajos costos de operación y reducida producción de residuos contaminantes (Karamanev *et al.*, 2001; Das y Sen, 2001; Hoque y Horbbard, 2011). Esta tecnología implica la solubilización de los sulfuros asociados al oro mediante el uso de microorganismos; después del pretratamiento el metal queda más disponible y

puede recuperarse con mayor eficiencia a través de los métodos hidrometalúrgicos convencionales (Morin, 1995; Climo *et al.*, 2000; Mishra y Rhee, 2014).

En todo proceso biotecnológico, la actividad microbiana está sujeta a las condiciones ambientales a las que son sometidas las células. En el caso particular de un proceso de biooxidación, esta actividad y el éxito del proceso, dependen entre muchos factores de la concentración de iones metálicos que pueden solubilizarse, la densidad de pulpa, el tamaño de partícula y los tipos de sulfuros y/o fases minerales presentes, en otras palabras de las características mineralógicas y químicas del concentrado mineral (Rossi, 1990; Das et al, 1999; Watling, 2011).

En línea con lo anterior, según Watling (2006) el impacto de la mineralogía sobre la biooxidación no puede ser ignorado, y dependiendo del análisis mineralógico inicial se debería diseñar el diagrama de flujo del proceso. Como ejemplo, Watling (2006) hace referencia a la biolixiviación en biopilas, donde el consumo de ácido por la ganga puede ser un parámetro clave que delimita el costo del proceso dado los altos requerimientos de ácido sulfúrico. De no prever la situación mediante una identificación preliminar de las fases minerales, y garantizar un nivel de pH adecuado, la oxidación microbiana del hierro y la oxidación química del sulfuro no podrían ocurrir o serían altamente ineficientes.

En el presente trabajo se caracterizó mineralógicamente un residuo de minería aurífera proveniente del distrito minero de Marmato (Caldas) proporcionado por la mina La Maruja. Esta caracterización se realizó con el fin de identificar la viabilidad del residuo como fuente potencial de oro, grado de refractariedad, y principalmente determinar con base en su mineralogía, los posibles inconvenientes y/o ventajas durante su biooxidación con una cepa comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Mineral

El mineral caracterizado en este trabajo y posteriormente empleado en un proceso de biooxidación, fue proporcionado por la empresa Mineros Nacionales S.A y provino de la mina La Maruja, ubicada en el sector el Llano (zona baja) del distrito minero de Marmato, departamento Caldas (Colombia) (Figura 2-1). Una vez llegó el mineral a las instalaciones de la Universidad (12 ton), se tomó una muestra representativa (800 kg), se dejó secar, se cuarteo y se tomaron

aproximadamente 2 kg para los análisis mineralógicos, el mineral restante fue empleado en ensayos de biooxidación.

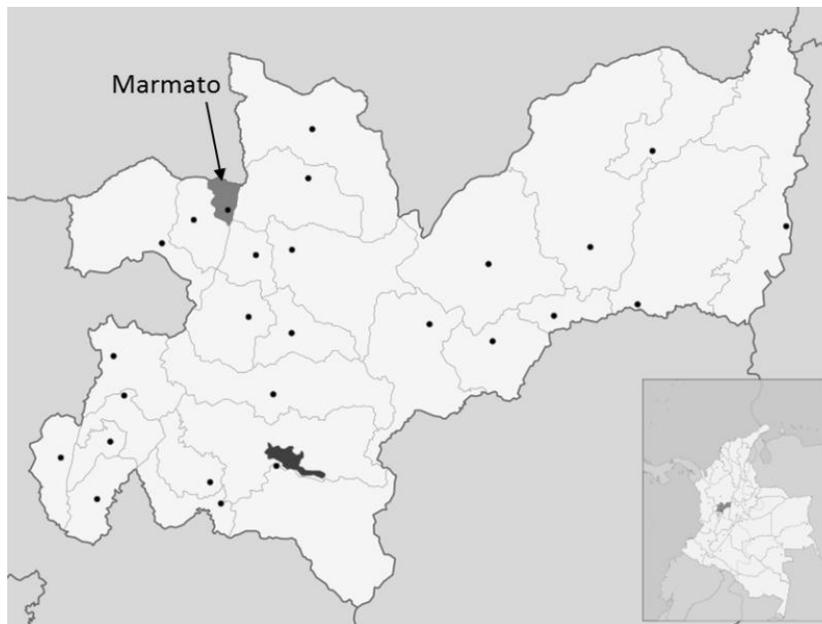


Figura 2-1: Ubicación de Marmato en Colombia.

2.2.2 Caracterización química

Para establecer y cuantificar el tipo de metales presentes en el residuo, este fue sometido a un análisis químico por Fluorescencia de Rayos X (FRX) llevado a cabo por el Centro de Investigación y Desarrollo Argos. Para dicho análisis se tomó una muestra de 10g, se maceró y tamizó hasta garantizar una distribución de tamaño de partícula pasante malla Tyler 325. En las instalaciones de Argos se realizó un análisis con la aplicación WROXI, perla fundida con 1.00 g de muestra y 10.80 g de fundente, además de un análisis de LOI (pérdidas por ignición) a 950 °C. La concentración de plata y oro remanentes, fue determinada mediante ensayos al fuego por el Instituto de Minerales CIMEX. Adicionalmente se determinó la concentración de azufre total según la norma ASTM D 4239, por el Laboratorio de Carbones de la Facultad de Minas.

2.2.3 Análisis Granulométrico

Para la determinación del tamaño de partícula, se realizó un análisis granulométrico pasando una muestra de 300g a través de un juego de tamices normalizados Tyler N° 16 (1180µm), 20 (850µm), 50 (300µm), 60 (250µm), 100 (150µm), 140 (106µm), 200(75µm), 325 (45µm) y 400

(38 μ m). Todos los tamices fueron colocados en forma descendente en un rottap marca Humboldt MFG, durante 20 min.

2.2.4 Caracterización mineralógica

La caracterización mineralógica se realizó mediante Microscopía Óptica de Luz Plana Polarizada, modo luz reflejada (MOLPP-LR), Difracción de rayos X (DRX) y Microscopía electrónica de Barrido (SEM: Scanning Electron Microscopy). A través de estas técnicas fue posible determinar el tipo de fases minerales presentes.

Para los análisis por DRX las muestras fueron maceradas en mortero de ágata y pasadas por malla Tyler 200. Se prepararon probetas de aproximadamente 3g de muestra y se analizaron en un difractor marca Rigaku Miniflex II, usando una radiación de Cu K α y monocromador de grafito, 30 kV voltaje y una corriente de 15 mA. Los difractogramas se realizaron bajo las mismas condiciones, modo paso a paso, con un tamaño de paso de 0.02, tiempo por paso de 2 s y un ángulo de barrido de 2 θ entre 3° y 70°. Los espectros se analizaron mediante el software X-Pert High Score Plus, el cual además se empleó para la cuantificación por refinamiento de Rietveld

La observación de minerales por MOLPP/LR fue realizada en un microscopio petrográfico Olympus BX41. Para esto se prepararon 12 secciones pulidas, y se observaron a través del objetivo en aire de 20X, y de inmersión en aceite de 40X y 100X. De estas mismas secciones se tomaron micrografías en un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca JEOL JSM 5910 LV usando modo BSE (Backscattering electron: electrones retroproyectados), con detector de estado sólido tipo EDX marca OXFORD para los análisis microquímicos. Previo a este último análisis las secciones fueron metalizadas con oro.

2.3 Resultados

2.3.1 Análisis granulométrico y caracterización química

El análisis granulométrico arrojó un D₆₀ igual a 60 μ m (Figura 2-2A) y según la Figura 2-2B, el 71.59% de los granos tienen diámetros entre 38 y 75 μ m, mallas 325 y 200. El análisis químico obtenido por FRX entregó un porcentaje de 24.99% de Fe, 0.41% de Zn, 0.08% de Cu, 0.06% de Pb y 14.2% de Si (Tabla 2-1). El análisis próximo mostró que el contenido de azufre total en el residuo fue de 28.7%. Los resultados correspondientes a los ensayos al fuego indicaron una concentración de Au de 1.74 g/t y una concentración de Ag de 37.42 g/t.

Tabla 2-1: Elementos más abundantes cuantificados por FRX

Concentración (%)														
Fe	Si	Al	Zn	Na	Ca	K	Mg	Ti	Ba	Mn	P	Cu	Pb	LOI
24.99	14.20	4.32	0.41	0.65	1.00	0.41	0.44	0.14	0.09	0.07	0.04	0.08	0.06	19.36

LOI: Perdidas por ignición

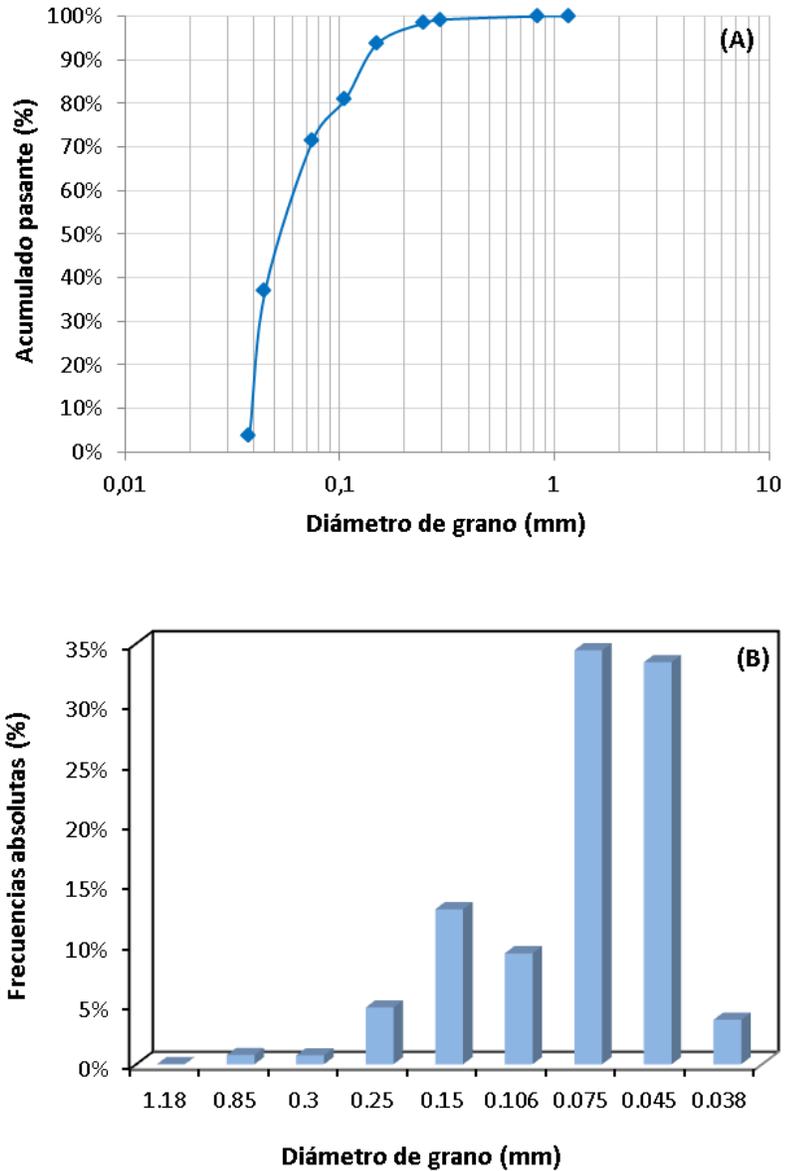


Figura 2-2: Análisis granulométrico: **(A)** Diagrama de porcentajes acumulados de partículas pasantes vs diámetro de grano. **(B)** Diagrama de barras con las frecuencias absolutas de cada tamaño de grano

2.3.2 Caracterización mineralógica

Los análisis realizados por DRX, MOLPP/LR y SEM/EDX (Figuras 2-3, 2-4 y 2-5) permitieron establecer el tipo de sulfuros presentes en el residuo de la mina La Maruja, entre ellos, pirita (FeS_2), galena (PbS), calcopirita (CuFeS_2), arsenopirita (FeAsS), esfalerita (ZnS) y pirrotita ($\text{Fe}_{0.8}\text{S}$). Por MOLP/LR se observó que la calcopirita, esfalerita y pirrotita pueden encontrarse en granos independientes o incluidas en granos de pirita (Figura 2-4C). La pirrotita no fue detectada en los difractogramas pero si se observó claramente en los análisis por MOLP/LR (Figura 2-4 C y D). En los análisis por EDX de esfalerita y galena se detectaron contenidos de Fe, para la esfalerita de 11.46 Wt% y para la galena de 0.93Wt%, seguramente en solución sólida (Figura 2-5 B y C)

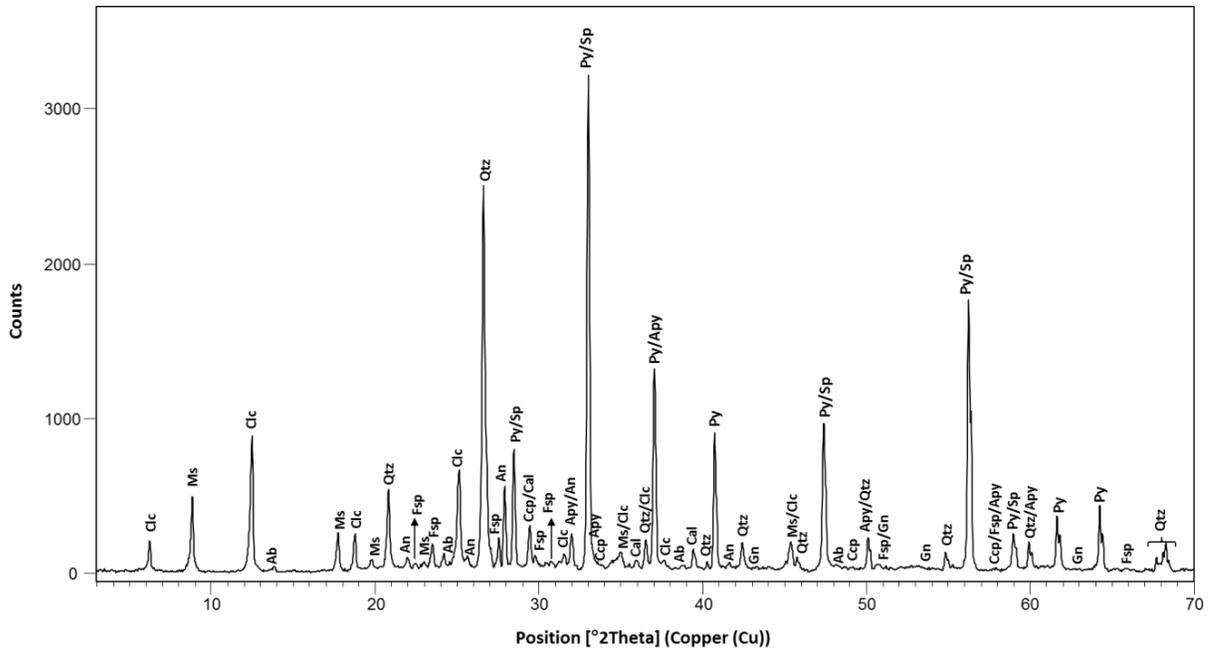


Figura 2-3: Difractograma. La nomenclatura designada para las fases minerales se estableció de acuerdo con Kretz (1983): albita (Ab), anortita (An), arsenopirita (Apy), calcita (Cal), calcopirita (Ccp), clinocloro (Clc), cuarzo (Qtz), esfalerita (Sp), feldespato (Fsp), galena (Gn), moscovita (Ms), pirita (Py).

Tanto en el difractograma (Figura 2-3) como en los análisis microquímicos (Figura 2-6) se detectaron silicatos como cuarzo (SiO_2), moscovita ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$), las plagioclasas albita ($\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$) y anortita ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$), clinocloro ($(\text{Mg},\text{Fe}^{2+})_5\text{Al}((\text{OH})_8/\text{AlSi}_3\text{O}_{10})$), feldespato potásico (KAlSi_3O_8) y el carbonato calcita (CaCO_3). De acuerdo a los análisis microquímicos

(SEM/EDX) la mayoría de los silicatos pueden estar presentes en un mismo grano (Figura 2-6 B, C y D)

De acuerdo a la cuantificación mediante refinamiento de Rietveld, la fase más abundante en el mineral de La Maruja fue la pirita con un 34.14% seguida del cuarzo con un 25.10 % (Tabla 2-2). Respecto a la pirita y de acuerdo a las imágenes obtenidas por MOLPP, es posible afirmar que en este residuo se trata de una pirita cristalina con granos euedrales y subedrales, es decir, se ven todas las caras o alguna.

Tabla 2-2: Proporciones relativas de fases minerales presentes en el residuo de La Maruja, determinadas a partir de DRX

Concentración de fases minerales más importantes (%)							
Sulfuros	Pirita	Esfalerita	Arsenopirita	Calcopirita	Galena		
	34.14	1.01	0.29	0.43	0.08		
Ganga	Cuarzo	Clinocloro	Albita	Moscovita	Feldespatos	Calcita	Anortita
	25.10	10.16	7.50	8.79	5.28	3.98	3.33

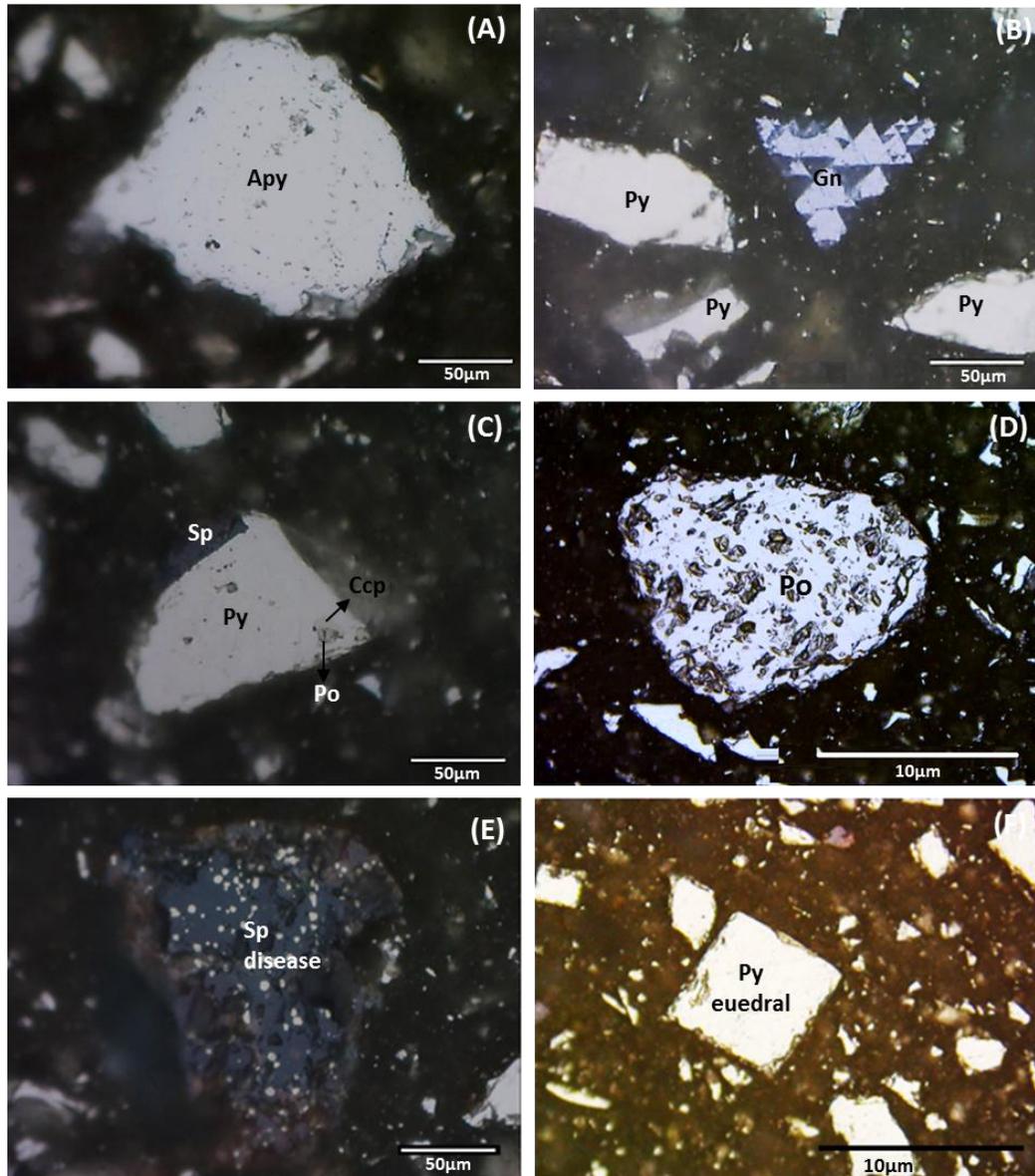


Figura 2-4: Imágenes de microscopía óptica de luz plana polarizada, modo luz reflejada (MOLPP/LR) para granos de diferentes sulfuros: (A) grano de arsenopirita; (B) granos de galena y pirita; (C) grano de pirita con inclusiones de esfalerita, calcopirita y pirrotita; (D) grano de pirrotita; (E) grano de esfalerita disease; (F) grano de pirita euedral. Nomenclatura: arsenopirita (Apy), calcopirita (Ccp), esfalerita (Sp), galena (Gn), moscovita (Ms), pirita (Py), pirrotita (Po).

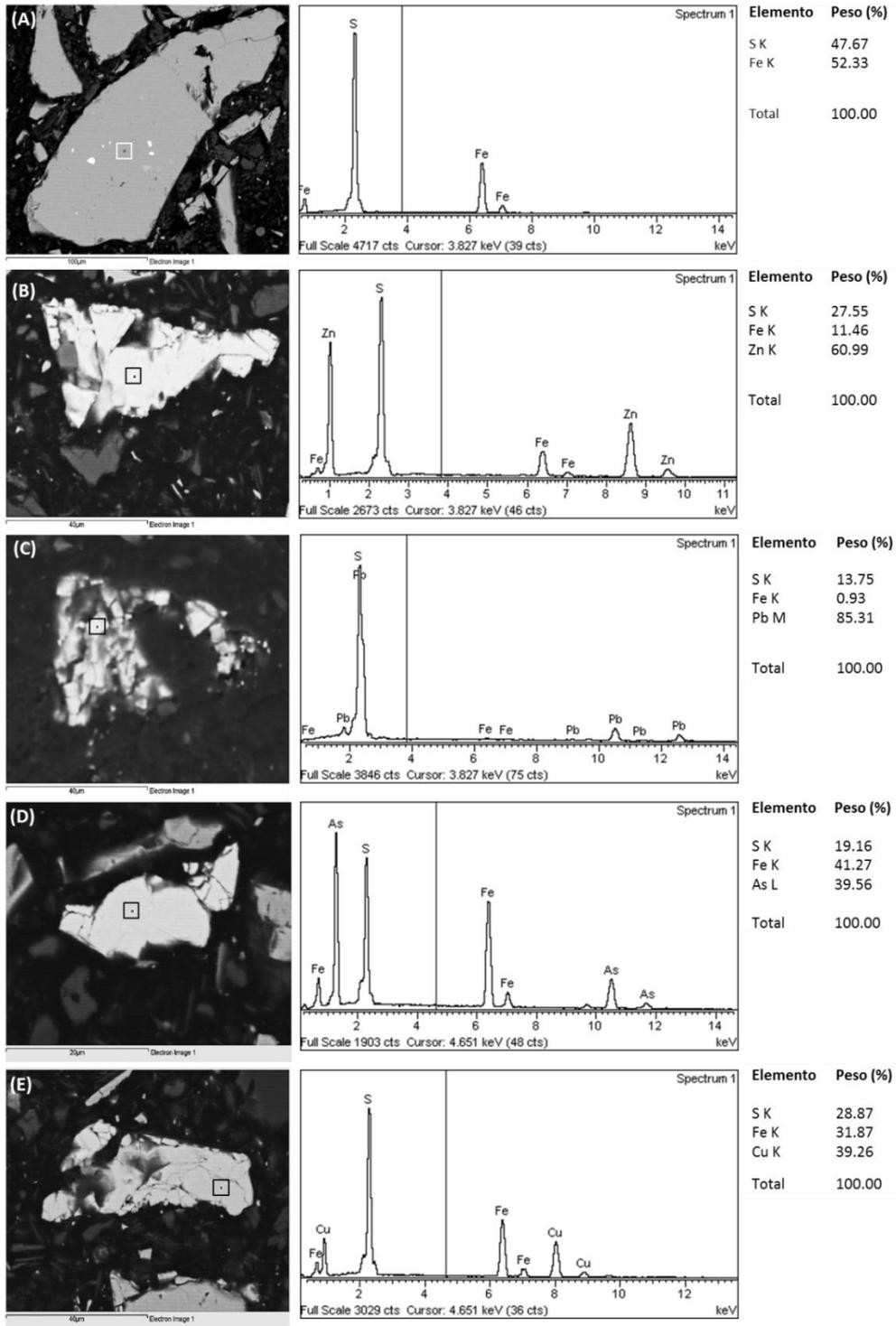


Figura 2-5: Análisis microquímico (SEM/EDX). Sulfuros: (A) pirita; (B) esfalerita; (C) galena; (D) arsenopirita; (E) calcopirita

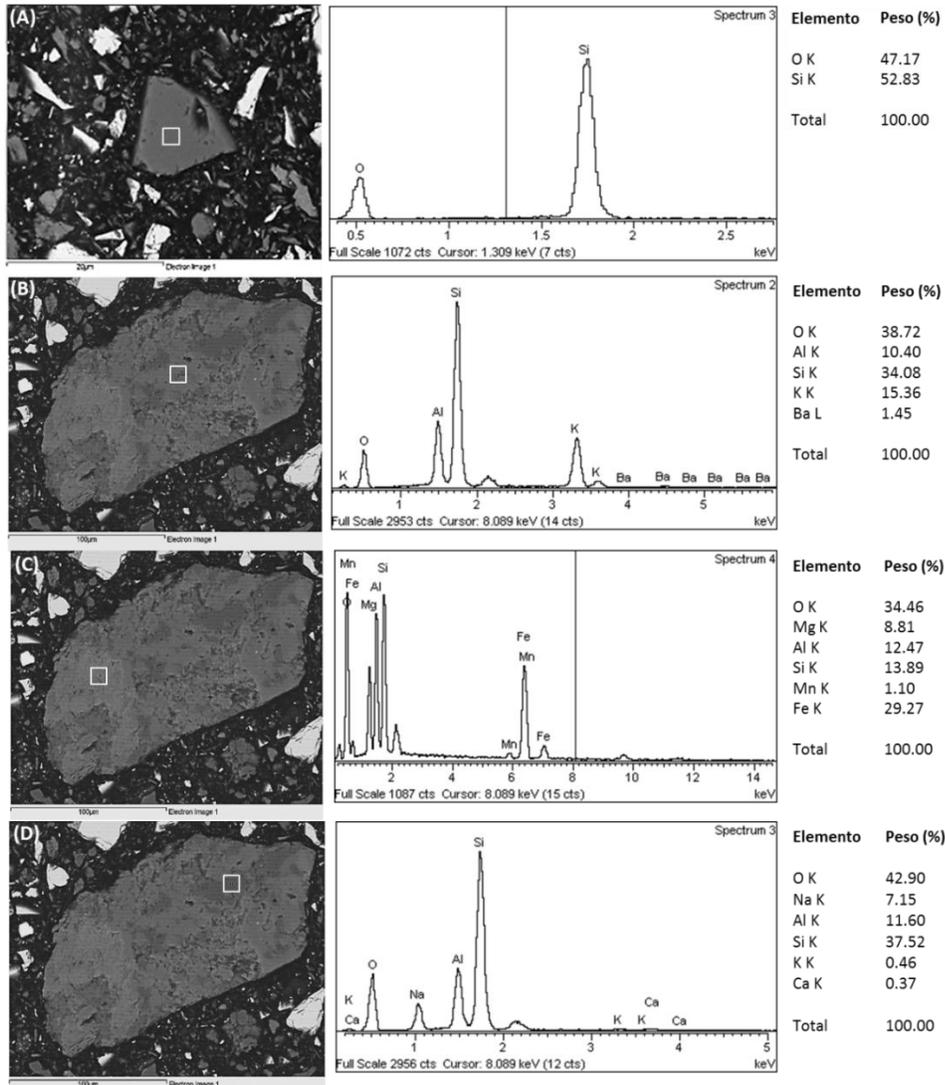


Figura 2-6: Análisis microquímico (SEM/EDX). Minerales de la ganga: (A) cuarzo; (B) grano compuesto por feldespato potásico; (C) grano compuesto por clinoclase; (D) grano compuesto por plagioclase

2.3.3 Oro micrométrico

En las secciones pulidas observadas mediante MOLPP/LR (Figura 2-7) se observó la presencia de partículas micrométricas de oro encapsuladas en los sulfuros, particularmente en granos de pirita. La cantidad del metal fue relativamente abundante. La Figura 2-8 muestra un diagrama del porcentaje asociado a los distintos tamaños de las partículas, donde cerca de un 46% presentó diámetros entre 1.0 y 1.9 μm y alrededor del 70% del oro presentó tamaños entre 1 y 3 μm .

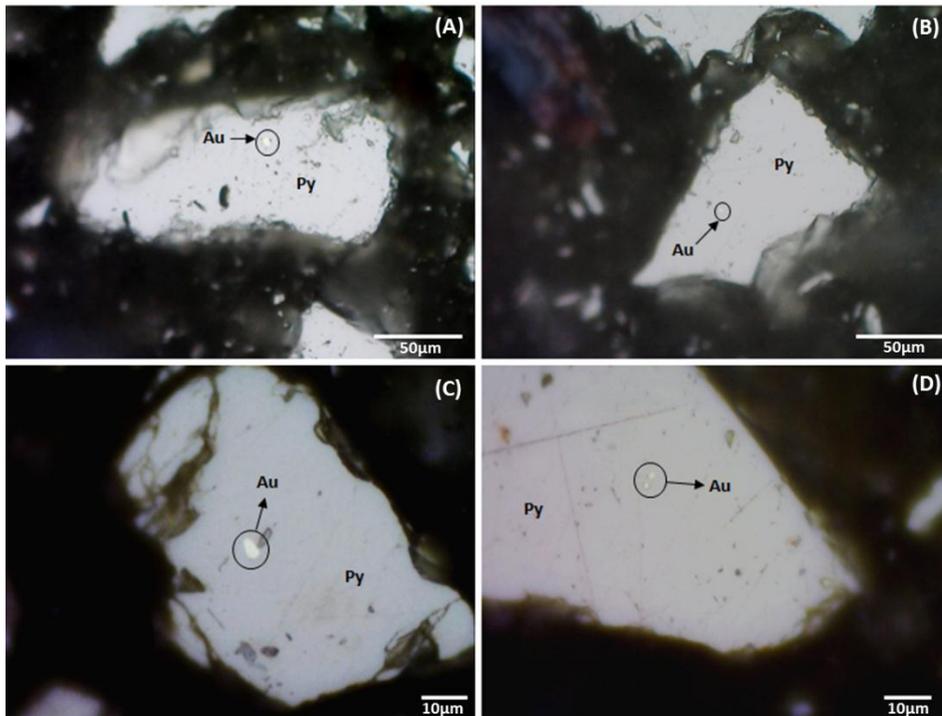


Figura 2-7: Partículas micrométricas de oro encapsuladas en pirita. (A) 3.9µm. (B) 1.6µm. (C) 3.4µm. (D) 1.2µm y 0.9µm. Pirita (Py), oro (Au).

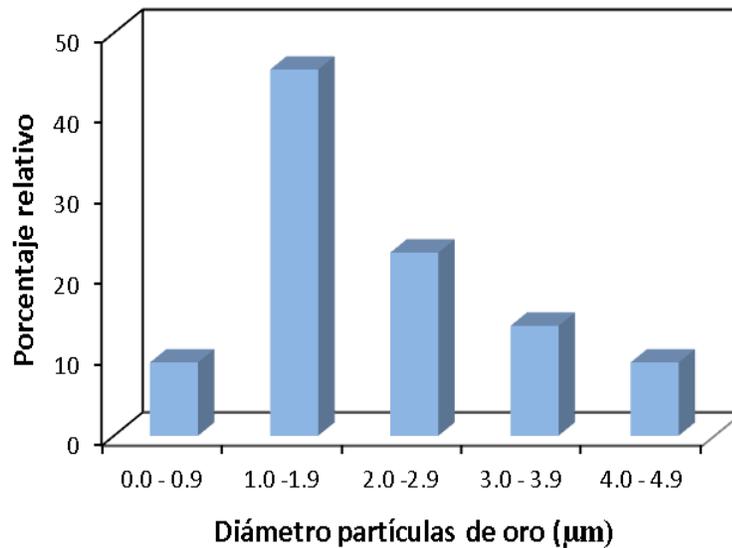


Figura 2-8: Porcentajes relativos asociados a los distintos tamaños de las partículas de oro.

2.4 Discusión

2.4.1 Efecto de las fases minerales sobre un proceso de biooxidación.

Todos los sulfuros encontrados en el mineral bajo estudio, pirita, esfalerita, arsenopirita, galena, pirrotita y calcopirita, presentan características que los hacen más, o menos idóneos para ser oxidados por *A. ferrooxidans* (Tributsch y Bennett, 1981). La mayoría de ellos son semiconductores y su reactividad superficial con especies electroquímicas se describe con base en potenciales electroquímicos, posiciones energéticas, bandas de valencia y propiedades de intercambio de electrones (Tributsch, 2001). Relacionadas con las propiedades anteriores, existen características inherentes a estos sulfuros que resultan determinantes durante su oxidación bacteriana. Según Tributsch y Bennett (1981), minerales con productos de solubilidad o K_{ps} altos, suelen ser buenos sustratos para oxidar, mientras que aquellos con K_{ps} bajos podrían ser sustratos pobres.

El potencial de electrodo es otro de los parámetros con mayor influencia en la disolución de este tipo de fases minerales. Usualmente cuando los sulfuros se encuentran en mezcla, se generan interacciones galvánicas en las cuales el mineral con mayor potencial de electrodo (menos susceptible a la oxidación) actúa como un cátodo, contribuyendo con la biooxidación preferencial del mineral con menor potencial o ánodo, como ejemplo la lixiviación acelerada del cobre de la calcopirita, a partir de la pirita, y la oxidación de la esfalerita a partir de la galena, calcopirita y pirita (Hutchins *et al.*, 1986; Jyothi *et al.*, 1989; Das *et al.*, 1999; Suzuki, 2001; Da Silva *et al.*, 2003; Nazari *et al.*, 2012).

La superficie y/o características específicas en la estructura cristalina de las fases también interfieren en su reactividad; en general la presencia de defectos como vacancias, dislocaciones y los bordes de grano, involucran sitios atómicos de baja coordinación haciendo que estas áreas adquieran mayor energía y se conviertan en sitios preferenciales para las reacciones y procesos de solubilización (Banfield y Hamers, 1997; Zapata, 2006; Xun *et al.*, 2014).

Un cuarto aspecto a tener en cuenta, es el mecanismo o vía de oxidación. De acuerdo a la conformación de sus bandas de valencia, los sulfuros se pueden disolver por dos mecanismos, el tiosulfato y el polisulfuro. Mediante el mecanismo tiosulfato, minerales como la pirita (FeS_2), cuyas bandas de valencia están formadas por la combinación de orbitales procedentes de átomos metálicos, solo pueden ser atacados por un agente oxidante, el Fe^{+3} , producto principal del

metabolismo energético de *A. ferrooxidans*. La oxidación de los minerales a través del mecanismo tiosulfato conlleva a la generación de H^+ y SO_4^{2-} . En el mecanismo polisulfuro, además del Fe^{+3} , los sulfuros también pueden ser atacados por un ácido, y como producto final se obtiene en un alto porcentaje S^0 . Entre los minerales que se solubilizan por esta última vía se encuentran la esfalerita (ZnS), calcopirita ($CuFeS_2$), galena (PbS) o arsenopirita ($AsFeS$) (Schippers y Sand, 1999; Tributsch, 2001; Sand *et al.*, 2001; Rohwerder *et al.*, 2003; Rawlings *et al.*, 2003; Ballester, 2005; Sekhar *et al.*, 2009^a; Kundu y Kumar, 2014; Tao y Dongwei, 2014).

Con base en lo antes expuesto, se esperaría que de los sulfuros presentes en el residuo de La Maruja, la pirrotita, esfalerita, galena y arsenopirita, cuyas concentraciones fueron relativamente bajas, serían los primeros en ser biooxidados. Éstos además de sus K_{ps} (Figura 2-9), resultan favorecidos por las interacciones galvánicas y/o los potenciales de electrodo estando en contacto con pirita. Adicionalmente al ser fases que se disuelven por el mecanismo polisulfuro, su proceso de solubilización comenzaría más rápido debido a la disponibilidad de dos agentes oxidantes. La premisa anterior concuerda con lo encontrado por Mason y Rice, (2002), quienes en la biooxidación de un concentrado de sulfuros con *A. ferrooxidans*, encontraron que el orden de oxidación fue: pirrotita > esfalerita > calcopirita > violarita > pentlandita > pirita.

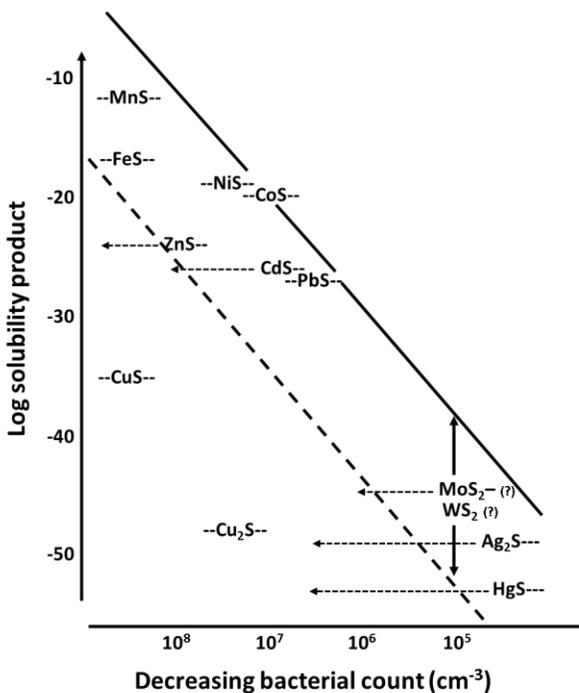


Figura 2-9: Gráfica del producto de solubilidad de varios sulfuros en función de los conteos celulares. Las flechas indican los cambios tras la adición de Fe^{+3} a los cultivos. Tomada de Tributsch y Bennett (1981b).

La pirita, el mineral más abundante, sería el más difícil de solubilizar tanto por su estabilidad como por poseer una de las cinéticas de disolución más bajas (Rossi, 1990; Tributsh, 2001). De acuerdo al mecanismo tiosulfato, su oxidación sólo comenzaría hasta que haya disponibilidad de Fe^{+3} en el medio, el cual debe ser producido en primer lugar por los microorganismos. Sumado a lo anterior, según Boon *et al.* (1999c) la morfología o estructura cristalina de la pirita influye su grado de reactividad, donde la pirita euedral (altamente cristalina) que se presenta en el residuo, es la más difícil de atacar.

Por otro lado, debido a las altas concentraciones de pirita, y conociendo que entre los productos de su degradación se encuentran el ion H^+ , es de esperarse que el pH del sistema pueda decaer considerablemente en caso que la biooxidación de esta fase resulte eficiente. Para este sulfuro se reporta una producción de 0.408 kg de H_2SO_4 /kg de mineral (Dew *et al.*, 1997; Acevedo y Gentina, 2005). Otras propiedades que se documentan para la pirita y que podrían ser tomadas en consideración en los próximos capítulos, son: calor de reacción de -12.88kJ/kg de mineral y -24.17kJ/kg de S^{-2} , y una de manda de oxígeno de 1.88kg de O_2 /kg de S^{-2} (Dew *et al.*, 1997).

Respecto a los componentes principales de la ganga, como silicatos y carbonatos, se considera que eventualmente podrían acarrear efectos adversos en una futura biooxidación. Se conoce que algunos de estos minerales, particularmente la calcita, pueden llegar a ser consumidores de ácido provocando aumentos en el pH, lo que a su vez interfiere en el crecimiento celular y favorece la producción de jarosita ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$), subproducto poco deseado que comienza a formarse a pH superiores a 2.0 (Ahonen y Touvinen, 1994; Stromberg y Banwart, 1999; Watling, 2006; Dopson *et al.*, 2009; Sekhar *et al.*, 2009^a; Nurmi *et al.*, 2010; Carretero *et al.*, 2011; Kaksonen *et al.*, 2014b). Otro aspecto que debe tenerse en cuenta, es que la disolución de estos minerales, al igual que la jarosita, conduce a la formación de películas que pueden inhibir el progreso de la biooxidación. Adicionalmente, estos precipitados, debido a que se dan en condiciones muy desventajosas energéticamente, pueden generar micro y nanopartículas que en suspensión podrían aumentar la viscosidad del medio de cultivo.

2.4.2 Efecto de los iones metálicos sobre un proceso de biooxidación

De acuerdo a los análisis químicos y mineralógicos, es posible afirmar que la mayoría de los elementos más abundantes en el residuo, corresponden a los constituyentes básicos de las fases minerales halladas. El Fe por ejemplo, estaría asociado a la pirita, calcopirita y arsenopirita, en menor proporción al clinocloro, galena y la esfalerita. En la esfalerita es común encontrar bajos

contenidos de Fe debido a la inserción del metal en la estructura cristalina del sulfuro durante su formación a determinadas condiciones de temperatura y presión (Doe *et al.*, 1961; Barton y Bethke, 1987). El Zn, Cu y Pb, son característicos de la esfalerita, calcopirita y galena respectivamente. El Si, se asocia al cuarzo, clinocloro, moscovita y plagioclasas. El Ca y el Na son típicos de las plagioclasas anortita y albita, y del carbonato calcita. El Al por lo general está presente en el clinocloro, la moscovita, los feldespatos y/o las plagioclasas. Según el análisis microquímico el Ba estaría presente en el feldespatos.

Algunos de los iones metálicos y/o elementos presentes en los minerales podrían resultar tóxicos para las bacterias, causando su inhibición y por ende retardando el proceso de biooxidación. Entre los más comunes se encuentran el Zn^{2+} , Cu^{2+} , As^{+3} , Pb^{2+} , Ag^{+1} e inclusive el Fe^{3+} en altas concentraciones (Rawlings *et al.*, 1999; Dopson, 2003). En el caso particular del Zn y el Cu, Acevedo y Gentina (2005), reportan que la tolerancia de *A. ferrooxidans* a estos metales se encuentra entre 15 - 72 g/L y 15 g/L respectivamente, mientras que Dopson *et al.* (2003) dicen que el máximo nivel es de 69.9 g/L y 50.8 g/L. Mazuelos *et al.* (2010) por su parte, encontraron un decrecimiento del 0.8% en las velocidades de biooxidación por cada g/L de Zn^{+2} , según ellos la presencia del Zn^{+2} desacelera la transferencia de oxígeno desde el gas a las células a causa de una disminución en la solubilidad del O_2 . Con base en lo anterior, se estima que las cantidades de Zn y Cu en el residuo son tan bajas (0.62 g/L y 0.12 g/L, considerando 15% de mineral en el medio de cultivo) que no generarían en principio, un efecto deletereo o inhibitorio sobre la bacteria, y la disminución sobre la velocidad de biooxidación no sería significativa.

Respecto al Pb, Aston *et al.* (2010) reportan que sólo 0,036 mg/L de Pb causa inhibición celular en cepa de *A. caldus*. Al emplear porcentajes del 10% y 15% del residuo de La Maruja, las concentraciones de Pb en el medio de cultivo ascenderían hasta 60 mg/L y 90 mg/L respectivamente, cantidades considerablemente altas que eventualmente podrían resultar tóxicas en otros tipos de bacterias acidófilas. No obstante, en trabajos sobre biooxidación de galena con *A. ferrooxidans*, se ha encontrado que el plomo precipita fácilmente en forma de anglesita ($PbSO_4$), un sulfato poco soluble (Makita *et al.*, 2004; Mejía *et al.*, 2007), por lo que es posible que este ion metálico se termine convirtiendo en un residuo inocuo.

De los elementos hallados, el As es uno de los que más afecta la actividad bacteriana ya que interfiere directamente en la formación del ATP, lo que a su vez afecta la velocidad de crecimiento (Havey y Crundwell, 1996). Este elemento puede existir como arsenito (As^{+3}) o arsenato (As^{+5})

donde el As^{+3} es el más tóxico y móvil, especialmente a pH ácidos (Tanaka *et al.*, 2014). La tolerancia hacia el As^{+3} depende de cada especie microbiana, las bacterias acidófilas por ejemplo suelen ser más resistentes que *Escherichia coli* (Dopson, 2003). En el caso de *A. ferrooxidans*, se han reportado diferentes rangos de concentraciones en las cuales el As^{+3} comienza a ser nocivo, entre 50 y 100mg/L según Tuovinen *et al.* (1971), 97.4 y 200mg/L de acuerdo a Braddock *et al.* (1984) y 5g/L según Collinet y Morin (1990), estos últimos autores también reportan una tolerancia al As^{+5} de hasta 40g/L. Es posible que las variaciones entre estos límites, dependan en gran medida del grado de adaptación de las cepas empleadas (Attia y Elzeky 1995). Pese a que no se cuenta con la cuantificación del arsénico en el residuo, si se sabe que la cantidad de arsenopirita no es muy alta, por ende no se espera una concentración significativa de este elemento que pueda alterar la actividad microbiana y consecuentemente el proceso de biooxidación de los minerales.

Aunque la plata (Ag) no es un constituyente básico de los minerales presentes en el residuo, si es común encontrarla atrapada en forma de partículas finas dentro de los sulfuros, y su liberación es posible durante los procesos de biooxidación (Dopson, 2003). La Ag al igual que muchos elementos resulta altamente tóxica para las bacterias. En el caso de *A. ferrooxidans*, el ion Ag^{+1} inhibe la oxidación del Fe^{+2} al unirse al sitio activo de la enzima encargada de esta reacción. Algunos trabajos reportan que la concentración de Ag nociva para *A. ferrooxidans* es de 0.1 mg/L (De *et al.*, 1996; Dopson, 2003); también se dice que 100 mg/L de Ag puede reducir significativamente la oxidación de pirita (Norris y Kelly, 1978; Dopson, 2003); De otro lado, Acevedo y Gentina (2005) hablan de un nivel inhibitorio <50 mg/L y tolerancias de 1mg/L. Con base en lo anterior, en un sistema de biooxidación con 15% (p/v) del residuo de La Maruja, la cantidad de Ag podría ascender hasta un máximo de 5.31mg/L, concentración que podría resultar crítica para la bacteria. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que parte de la plata en este residuo, esté asociada al oro mediante aleación o electrum (Allan y Woodcock, 2001; Chryssoulis y McMullen, 2005), de ser así este metal (Ag) no estaría disponible en solución afectando la actividad bacteriana.

El Fe en sus dos estados de oxidación (Fe^{+3} y Fe^{+2}) es uno de los elementos más importantes en un proceso de biooxidación, éste además de ser esencial para el crecimiento de bacterias como *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*, también es el principal agente oxidante de los sulfuros (Schippers y Sand, 1999; Tributsch, 2001; Sand *et al.*, 2001). No obstante, se ha encontrado que el Fe^{+3} en concentraciones muy elevadas (entre 2g/L y 20g/L) puede tener un efecto inhibitorio en la oxidación microbiana del Fe^{+2} e inclusive provocar lisis celular (Shrihari y Gandhi, 1990; Curutchet *et al.*, 1992; Boon *et al.*, 1999a; Boon *et al.*, 1999b; Dopson, 2003). Con base en las

altas fracciones de Fe determinadas para el residuo (0.25) y asumiendo altos porcentajes de biooxidación, es posible que este metal se acumule en tales cantidades (hasta 37.48g/L) que inhiban la actividad microbiana. De otro lado, el efecto adverso del Fe^{+3} cobra importancia cuando se emplean consorcios, ya que favorece el crecimiento de unas especies bacterianas sobre otras, particularmente el de *L. ferrooxidans* quien resulta menos inhibida por el Fe^{+3} (K_i : 3.1mM para *L. ferrooxidans* y K_i : 42mM para *A. ferrooxidans*) y tiene mayor afinidad por el Fe^{+2} (K_m : 0.24mM) que *A. ferrooxidans* (K_m : 1.34mM) (Norris y Kelly, 1978; Rawlings *et al.*, 1999).

2.4.3 Efecto del tamaño de partícula sobre un proceso de biooxidación

Una de los resultados más relevantes de esta caracterización, es la distribución de partículas asociadas al residuo de La Maruja, las cuales en su mayoría oscilaron entre 38 y 75 μm (mallas 325 y 200). El tamaño de partícula es un aspecto que cobra importancia en el sector hidrometalúrgico, ya que de éste depende la efectividad del proceso y el esquema de beneficio. En el campo específico de la biohidrometalurgia es un factor que determina las interacciones entre las bacterias, agentes oxidantes (Fe^{+3} y H^+) y el mineral, interviniendo en el desgaste físico de las cepas, la lixiviación del mineral y la transferencia de masa (Nemati *et al.*, 2000; Olubambi *et al.*, 2009).

Pese a la relación entre el tamaño de partícula y la biooxidación microbiana, existe cierta controversia sobre su efecto en el comportamiento global del proceso de biooxidación. Por un lado, varios autores reportan que con minerales de tamaño grueso, han obtenido altas recuperaciones de metales de interés (Shrihari *et al.*, 1991). En sistemas de lecho empacado estos mismos tamaños incrementan la regeneración del Fe^{+3} , puesto que las partículas finas obstaculizan la formación de los biofilms (Nikolov *et al.*, 1988; Mazuelos *et al.*, 2001). De forma similar en reactores de tanque agitado, se apreció que la viabilidad de las bacterias tiende a decrecer con la disminución del tamaño de partícula (Deveci, 2004). También se ha encontrado que la disolución de arsénico desde concentrados de arsenopirita fue mejor con partículas gruesas (Makita *et al.*, 2004; Olubambi *et al.*, 2009). Mejía (2010), observó que a menores tamaños de partícula (38 μm) la regulación del pH durante la oxidación de esfalerita, galena y calcopirita, se vió afectada; al parecer el tamaño de los granos, además de favorecer la disolución inicial de carbonatos, tuvo un efecto adverso sobre las bacterias, impidiéndoles neutralizar rápidamente el aumento inicial del pH.

De otro lado, con partículas finas se han reportado: (i) recuperaciones importantes de zinc desde concentrados de esfalerita, (Torma *et al.*, 1972; Hossain *et al.*, 2004); (ii) incrementos en las velocidades de disolución durante la biolixiviación de calcopirita por *A. ferrooxidans* (Pinches *et*

al., 1976); y (iii) mejoras en la cinética de disolución de pirita en biorreactores operados en discontinuo (Nemati *et al.*, 2000). Olubambi *et al.* (2009), durante la biolixiviación de minerales de baja ley, obtuvieron una recuperación alta de metales empleando partículas de 75 μ m. De acuerdo a González *et al.* (1999) las partículas finas ofrecen un incremento en el área superficial lo que a su vez se refleja en una mayor cantidad de sitios activos por los que se empieza a atacar el mineral.

2.4.4 Grado de refractariedad de los residuos de la mina La Maruja.

La presencia de partículas micrométricas de oro en los granos de pirita, evidencia el grado de refractariedad de los residuos de La Maruja. La refractariedad es un problema bien conocido y documentado mundialmente (Hoque y Hobbard, 2011). Una causa importante de refractariedad, es la oclusión o diseminación de partículas micrométricas de oro (< 10 μ m) en sulfuros como la pirita (FeS₂) y arsenopirita (FeAsS), y en ocasiones en silicatos como el cuarzo (SiO₂), todos ellos matrices insolubles difíciles de penetrar con soluciones de cianuro. También existe refractariedad de tipo químico que involucra la insolubilidad de minerales auríferos como telurios, auroestibnitas y aldonitas, la presencia de minerales que puedan descomponerse y reaccionar con el cianuro (NaCN), y de minerales consumidores de oxígeno (Gasparrini, 1993; Parga y Carrillo, 1995; Groudev *et al.*, 1996; Maddox *et al.*, 1998; Gentina y Acevedo, 2005). Con base en lo anterior y en los resultados de la caracterización mineralógica, se puede afirmar que los residuos de la mina La Maruja, son refractarios, y esta refractariedad es predominantemente de tipo físico.

La refractariedad por oclusión pudo ser una de las causas por las cuales no todo el oro presente en el residuo, pudo ser extraído durante el beneficio del mineral en las instalaciones de la mina La Maruja. Se considera que sulfuros como la pirrotita, catalogada por Gasparrini (1993) como cianicida, la galena (cianicida y consumidora de oxígeno), la arsenopirita (cianicida) y la calcopirita (cianicida), también pudieron influenciar sobre la recuperación inicial del oro, sin embargo debido a su escasa abundancia, se considera su efecto global fue poco importante.

Se espera que el proceso de biooxidación, desarrollado para superar el problema de refractariedad (Iglesias y Carranza, 1994; Groudev *et al.*, 1996), conduzca a la recuperación del oro remanente en el residuo de La Maruja. Con base en la caracterización mineralógica parece que la refractariedad de tipo químico no constituirá ningún problema dado que no hay presencia de compuestos cianicidas, por lo menos no en concentraciones significativas.

2.5 Conclusiones y recomendaciones

El residuo de la mina La Maruja presenta refractariedad física, es decir, oclusión o diseminación de partículas micrométricas de oro menores a $5\mu\text{m}$. Lo anterior lo convierte en un buen candidato para emplearse en un proceso de biooxidación y como fuente secundaria de oro.

Mineralógicamente el residuo analizado se caracterizó por su alto contenido de pirita, y concentraciones relativamente bajas de otros sulfuros como esfalerita, galena, calcopirita, arsenopirita y pirrotita. Esta mezcla particular de minerales podría conducir a un retardo en la oxidación del sulfuro más abundante debido a sus características electroquímicas y bandas de valencia. En general la abundancia de pirita en el residuo puede implicar que la oxidación del residuo para la consecuente liberación del oro y posterior lixiviación con cianuro sean más difíciles y posiblemente poco eficientes. Solo con los ensayos de biooxidación se podrá corroborar esta premisa.

Mientras las altas concentraciones de pirita en el mineral pueden conducir a una acidificación considerable del medio de cultivo, los minerales de la ganga podrían ocasionar un incremento del pH. Se recomienda durante las biooxidaciones iniciales del residuo, prestar atención a los cambios de pH y con base en ellos tomar decisiones sobre la necesidad y forma de controlarlo. Es posible que las caídas de pH por debajo de 1.8 favorezcan el proceso evitando la formación de jarosita, sin embargo también podrían afectar el rendimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

De acuerdo al tamaño fino de partícula ($D_{60} = 60\mu\text{m}$), y aunque en teoría las concentraciones de los metales pesados presentes en el residuo no resultan tóxicas para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, se recomienda una adaptación preliminar de la cepa comercial para asegurar su óptimo desempeño durante la biooxidación de los residuos.

3. Adaptación de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a residuos minería aurífera provenientes de la mina La Maruja

Resumen.

En este capítulo se presenta una estrategia de adaptación implementada para la cepa comercial *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 al residuo minero proveniente de la mina La Maruja (Marmato, Caldas). Para esta adaptación se emplearon dos residuos, uno de partículas gruesas procedente de la mina San Antonio (Marmato, Caldas) y el residuo de La Maruja constituido por partículas finas. La estrategia consistió en aumentar gradualmente la cantidad de mineral con partículas gruesas en el medio de cultivo y posteriormente realizar dos series de repiques sucesivos con cada uno de los residuos, empezando por el San Antonio (partículas gruesas) y terminando con el de La Maruja (partículas finas). El aumento gradual de mineral ocasionó un incremento en el periodo de latencia del microorganismo reduciendo la eficiencia de biooxidación del hierro ferroso (Fe^{+2}). Por otro lado, los repiques sucesivos y la disminución en el tamaño de grano mostraron ser una herramienta efectiva para optimizar la actividad oxidante del microorganismo y suprimir las fases de latencia ocasionadas por las concentraciones crecientes de mineral. De igual manera parece ser que el tamaño de partícula influyó significativamente en el porcentaje de oxidación de los sulfuros, donde el porcentaje de hierro disuelto desde el residuo de La Maruja (partículas finas) fue 5.3 veces más alto que el obtenido con el residuo de partículas gruesas proveniente de la mina San Antonio. En términos generales la estrategia de adaptación implementada en este trabajo permitió la obtención de una cepa de *A. ferrooxidans* estable y capaz de biooxidar de forma eficiente los residuos de la mina La Maruja.

Palabras clave: adaptación, residuos mineros, repiques sucesivos.

Abstract

In this study, an adaptive strategy was implemented on the commercial strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 to mine tailings originating in La Maruja mine located in Marmato, Caldas. Two mine tailings were used for the adaptation. One of coarse particles coming from the San Antonio mine (Marmato, Caldas), and the second one fine particles coming from La Maruja mine. This strategy consisted in gradual increase of the amount of coarse particles mineral in the culture medium, and the running of two sets of successive cultures with coarse particles (San Antonio) and fine mineral particles (La Maruja). The gradual increase in mineral caused an increase in the latency period of the process reducing the efficiency of ferrous iron biooxidation. Moreover, the successive cultures and the decrease in grain size proved to be an effective tool to achieve some stability in the oxidizing activity. In this way, it is possible to delete latency phases caused by the increase of mineral concentrations. It seems that particle size had a significantly influence on the rate of sulphides oxidation. Dissolution rates with fine particle residues were 5.3 times higher than dissolution rates with coarse particles. In general, the adaptive strategy used increases the efficiency of mine tailings biooxidation by *A. ferrooxidans*.

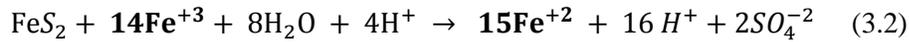
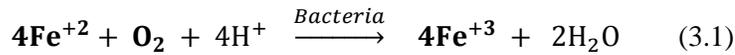
Keywords: adaptation, mine tailings, serial subculturing.

3.1 Introducción

En las últimas décadas la oxidación de sulfuros mediada por bacterias acidófilas, ha jugado un papel importante en el sector de la hidrometalurgia por sus bajos costos de operación y por ser una tecnología más amigable con el ambiente. Este pretratamiento se muestra además como un proceso promisorio para la extracción efectiva de metales valiosos desde residuos de minería o minerales de baja ley (Elzety y Attia, 1995; Hoque y Hobbard, 2011; Schippers *et al.*, 2013; Mishra y Rhee, 2014).

Acidithiobacillus ferrooxidans ha sido hasta hoy el microorganismo más estudiado y utilizado en los procesos de biooxidación. Esta bacteria se encuentra principalmente en ambientes conformados por minerales inorgánicos y se caracteriza por ser mesófila y acidófila, es decir, crecer a temperaturas entre los 25 – 35 °C y a pH por debajo de 2.0. Para la síntesis de sus componentes celulares fija el carbono desde el dióxido de carbono atmosférico y su fuente de energía proviene de las reacciones de óxido-reducción, donde el Fe^{+2} y el S^0 sirven como donadores de electrones y el oxígeno como aceptor. Durante los procesos de biooxidación de minerales, la bacteria utiliza el Fe^{+2} y el S^0 lixiviados a partir de los sulfuros. A continuación se describen las reacciones globales

relacionadas con la biooxidación de piritita (Rawlings, 2002; Mason y Rice, 2002; Ballester, 2005; Gómez y Cantero, 2005; Hoque y Hobbard, 2011; Simate y Ndlovu, 2014).



Es posible que la exposición de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a concentrados de sulfuros, inhiba o retarde la actividad de la bacteria, especialmente cuando se trabaja con altas concentraciones de pulpa y se emplean cepas comerciales. Entre los factores reportados como principales responsables de este comportamiento están la reducción en las velocidades de transferencia de oxígeno y dióxido de carbono, el daño a nivel celular provocado por las colisiones bacteria-mineral, el efecto tóxico de los iones metálicos que se lixivian, los cambios de pH que puedan generarse por las características mineralógicas de los concentrados y la idoneidad del mineral como fuente exógena de energía (Dopson, 2003, Deveci, 2004; Mousavi *et al.*, 2007; Gericke *et al.*, 2009; Haghshenas *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2011). Una forma de contrarrestar estos efectos adversos es mediante una adaptación preliminar de las bacterias al mineral, y con este al nuevo ambiente que se pueda generar en el medio de reacción (Mason y Rice, 2002; Xia *et al.*, 2008).

La adaptación a un ambiente particular, es un fenómeno natural de los seres vivos (Sonnleitner, 1998; Xia *et al.*, 2008). Los organismos adaptados son más fuertes y logran sobrevivir bajo condiciones que los organismos no adaptados no toleran. En la industria biohidrometalúrgica, la adaptación de los microorganismos al mineral y/o al ambiente específico de biooxidación se considera un paso fundamental, a través de ésta se puede mejorar la velocidad de disolución de los minerales, y por ende la eficiencia global del proceso de biooxidación. La forma más extendida y documentada para la adaptación de bacterias acidófilas es el montaje de cultivos seriales en los cuales se va aumentando de forma gradual la concentración de pulpa en el medio; sin embargo no existen protocolos específicos que delimiten las estrategias de adaptación, cada investigador es libre de elegir o diseñar su propio mecanismo, así mismo de seleccionar el criterio más idóneo con base en su proceso, bajo el cual considerara que la cepa está adaptada (Mason y Rice, 2002; Xia *et al.*, 2008, Haghshenas *et al.*, 2009).

Una estrategia de cultivos sucesivos con minerales de diferentes tamaños podría eventualmente resultar eficiente para la adaptación de *A. ferrooxidans*, especialmente a concentrados de granos finos. La idea de los subcultivos con minerales de granulometría distinta, radica en los efectos implícitos a cada tamaño de partícula. Se ha encontrado, que las partículas finas dejan más

disponibles fases como carbonatos, aluminosilicatos o sulfuros, que contribuyen con el incremento del pH hasta valores nocivos para *A. ferrooxidans* (García *et al.*, 1995; Da Silva, 2004; Sampson *et al.*, 2005; Mejía *et al.*, 2011). Esta granulometría fina, también aumenta el área superficial de cada grano facilitando la disolución de elementos tóxicos e incrementando la cantidad de interacciones específicas con otros minerales (Makita *et al.*, 2004; Olubambi *et al.*, 2009). Todo lo anterior hace del medio de cultivo un ambiente más complejo para las células, y su adaptación al mineral podría resultar más lenta. Se considera que comenzar la adaptación con un mineral grueso, contrarrestaría en cierto grado los efectos adversos asociados al mineral, al tiempo que se sometería el microorganismo a la presencia de partículas que además contribuirían en la adaptación de la bacteria a los esfuerzos cortantes ocasionados por los sólidos en suspensión (Deveci, 2002 y 2004).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se implementó una estrategia de adaptación de tres etapas, cada una de ellas constituida por cultivos seriales, para la cepa comercial *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 al residuo de la mina La Maruja (Marmato, Caldas). Dicha estrategia requirió el uso de dos tipos de residuos, el de interés, residuo de La Maruja, y un residuo con granulometría mayor, también procedente de Marmato. El fin último de esta adaptación fue obtener una cepa estable, con la capacidad de oxidar eficientemente los sulfuros presentes en el mineral de La Maruja.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Mineral

Para la adaptación de *Acidithiobacillus ferrooxidans* se seleccionaron los residuos de dos minas de oro ubicadas en el distrito minero de Marmato (Caldas). El primer residuo fue tomado de la mina San Antonio, con capacidad de producción típica de la pequeña minería de la zona, generando un residuo característicamente de una granulometría mayor ($D_{60} = 150\mu\text{m}$). El segundo residuo fue proporcionado por la mina La Maruja, propiedad de la empresa Mineros Nacionales S.A. Este proviene de una operación con ingeniería bien llevada, capacidad en planta considerablemente mayor y una partícula más fina ($D_{60} = 60\mu\text{m}$) (Capítulo 2).

Ambos residuos fueron caracterizados mineralógica y químicamente, a través de Difracción de rayos X (DRX), Microscopía Óptica de Luz Plana Polarizada (MOLPP/LR), Fluorescencia de rayos X (FRX) y ensayos al fuego. En la Tabla 3-1 se presenta un resumen de la caracterización inicial de los dos residuos, esta incluye la composición de elementos más abundantes y minerales.

Los detalles de los métodos analíticos empleados en las caracterizaciones mineralógica y química se muestran en el capítulo 2.

Tabla 3-1: Composición química y mineralógica de los residuos

Elemento	Contenido (%)		Mineral	Contenido aproximado (%)	
	San Antonio	La Maruja		San Antonio	La Maruja
Au	3.65 (g/t)	1.74 (g/t)	Pirita	59.77	34.14
Ag	1.51 (g/t)	37.42 (g/t)	Calcopirita	0.09	0.43
Fe	37.45	24.99	Arsenopirita	0.24	0.29
Cu	0.04	0.08	Esfalerita	1.74	1.01
Zn	0.74	0.41	Galena	0.02	0.08
Pb	0.01	0.06	Cuarzo	17.37	25.10
Si	5.92	14.20	Moscovita	6.65	8.79
Al	1.29	4.32	Clinocloro	8.88	10.16
Na	0.31	0.65	Feldespato	4.96	5.28
Ca	0.26	1.00	Calcita	0.25	3.98
K	0.16	0.41	Albita	-	7.50
Mg	0.13	0.44	Anortita	-	3.33
Mn	0.04	0.44	Total	100	100

3.2.2 Material biológico y medio de cultivo

Para este estudio se seleccionó la cepa comercial *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, suministrada por el Laboratorio de Biomineralogía y Biohidrometalurgia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Se decidió trabajar con ésta cepa comercial debido a su disponibilidad y particularmente a las dificultades legales que supone el uso de microorganismos nativos en Colombia. Ésta bacteria fue activada y adaptada en el medio de cultivo T&K modificado, constituido por 0.4 g/L de $(\text{SO}_4)\text{NH}_4$, K_2HPO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Tuovinen y Kelly, 1972). Como fuentes de energía se emplearon soluciones de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y mineral (Tabla 3-2).

3.2.3 Adaptación del microorganismo al mineral

Con el fin obtener una óptima actividad de la cepa comercial y altas velocidades de biooxidación del residuo de La Maruja, se implementó una estrategia de adaptación consistente en tres etapas. Para la primera etapa se seleccionó el mineral de granulometría gruesa (residuo de San Antonio) cuya concentración, a través de diferentes subcultivos, se fue aumentado de forma gradual en el medio de cultivo, al tiempo que se disminuyó la fuente de energía fácil de asimilar por la bacteria (Tabla 3-2) (Chandraprabha *et al.*, 2002). Posteriormente en una segunda etapa, se realizaron

ocho repiques sucesivos con 15% (p/v) de pulpa y 0.333g/L de sulfato ferroso. Finalmente, en la tercera y última etapa se cambió el mineral por el de tamaño de grano fino (residuo de La Maruja) y se efectuaron diez repiques sucesivos igualmente con 15% (p/v) de pulpa y 0.333g/L de sulfato ferroso. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Tabla 3-2: Concentraciones crecientes de mineral y decrecientes de sulfato ferroso durante los subcultivos de la primera etapa de adaptación.

Componente	Concentraciones					
	Activación	Adaptación				
% Mineral (p/v)	0	1	4	6	8	10
FeSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	33.33	29.9	19.9	13.3	6.7	3.3
Fe ⁺² proveniente del FeSO ₄ .7H ₂ O (mg/L)	6666.7	5999.9	3999.9	2666.7	1333.3	666.7

El pH del medio base y de las soluciones de sulfato ferroso, fue ajustado con H₂SO₄ (98%) hasta 1.6 ± 0.1 . Tanto el medio como el mineral fueron esterilizados a 120°C y 15 PSI por 20 min. Las soluciones de FeSO₄.7H₂O se esterilizaron por filtración con membrana de nitrocelulosa de 0.45µm. Todos los ensayos de adaptación fueron realizados en erlenmeyers de 500ml con un volumen efectivo de 150 ml. Se empleó 10% (v/v) de inóculo con concentraciones celulares de 10⁸ células/ml. La concentración de mineral al igual que la de sulfato ferroso, se varió de acuerdo a la etapa de adaptación. Todos los cultivos fueron incubados durante 12 días, a 30°C y 180 r.p.m. También se corrieron controles abióticos para determinar la biooxidación química por los componentes del medio de cultivo. Periódicamente se adicionó a cada cultivo agua destilada para compensar la pérdida por evaporación.

3.2.4 Análisis químicos

Todos los ensayos fueron monitoreados con mediciones periódicas (cada 72 h) de pH y potencial de óxido-reducción (Eh), usando un potenciómetro de pH/ORP Hach HQ 40d multi y electrodos de pH y Eh con electrolito de Ag/AgCl. En la primera etapa que consistió en el aumento gradual de mineral, se cuantificó la concentración de hierro ferroso (Fe⁺²). En los repiques sucesivos se midió además la concentración de hierro férrico (Fe⁺³) y hierro total (Fe total), este último principal indicador del proceso global de biooxidación. Las mediciones de Fe⁺² y Fe total se realizaron en un espectrofotómetro GENESYS UV 10 usando el método colorimétrico de la orto-fenantrolina, de

acuerdo a la norma ASTM 3500-Fe B. La concentración de Fe^{+3} se estimó como la diferencia entre el Fe total y Fe^{+2} . Se calculó el porcentaje de hierro solubilizado presente en solución (θ) a través de la ecuación 3.3, donde V es el volumen de trabajo, C_f concentración final de Fe total en solución, C_i concentración inicial de Fe total en solución, F fracción de Fe total en el mineral, W masa de mineral en el medio de cultivo.

$$\theta(\%) = \frac{V(L) \times (C_f - C_i) \left(\frac{mg}{L}\right)}{F \times W(mg)} \times 100 \quad (3.3)$$

Según Haghshenas *et al.* (2009) se han reportado diversos criterios bajos los cuales una cepa de *A. ferrooxidans* se ha considerado adaptada a un mineral, entre ellos: (i) cuando las velocidades de oxidación de Fe^{+2} son similares a las velocidades de oxidación del mismo ion en un medio libre de mineral; (ii) cuando la concentración celular al final del proceso a una concentración determinada de pulpa alcanza 10^7 células/ml; (iii) cuando se aprecian cantidades significativas de iones disueltos (Fe, Cu, Zn, según el mineral biooxidado) y la relación $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ es menor a uno; (iv) cuando la velocidad de disolución de un metal en dos repiques consecutivos es similar. En este caso se consideró que la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 23270 estuvo adaptada a cada residuo, cuando desaparecieron las fases de latencia y los porcentajes de hierro total en solución, luego de 12 días de cultivo, entre al menos tres repiques consecutivos no presentaron variaciones significativas (Mason y Rice, 2002). Para evaluar las diferencias entre repiques se realizó un análisis estadístico.

3.2.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos de manera independiente para la segunda y tercera etapa de adaptación con el propósito de identificar las diferencias entre repiques. Se seleccionó un diseño experimental completamente al azar, donde cada repique constituyó un tratamiento diferente. Como variable respuesta se empleó el porcentaje de Fe total disuelto en solución, ya que de los parámetros medidos, es el que entrega información más concisa sobre el proceso global de biooxidación. Todos los datos fueron sometidos a pruebas de distribución y homogeneidad de varianzas (Shapiro-Wilk y Barlett test), con el fin de probar los supuestos del análisis de varianza (ANOVA), posteriormente se aplicó el ANOVA. Las diferencias significativas encontradas, se analizaron a través de la prueba de comparación de medias Tukey. En todas las pruebas se asumió un nivel de significancia de 0.05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el software de libre distribución R Project versión 2.15.2.

3.3 Resultados

3.3.1 Adaptación primera etapa: Aumento gradual de mineral en el medio de cultivo

En la Figura 3-1 se presentan tres cinéticas de biooxidación (pH, potencial redox y Fe^{+2}) inherentes a la primera etapa de adaptación. Para el pH (Figura 3-1A), se encontró un comportamiento directamente proporcional entre la cantidad de mineral adicionada al medio y la aparición de picos máximos. En los ensayos con 1%, 4% y 6% de pulpa, los picos máximos son alcanzados los días tres, seis y nueve respectivamente, en los cultivos con 8% y 10% los valores máximos de pH fueron logrados alrededor del día nueve. Otro aspecto característico es la magnitud del valor máximo de pH con el aumento del porcentaje de pulpa, la cual inicialmente parece disminuir y después aumenta así: 1,8 (1%), 1,76 (4%), 1,77 (6%), 1,85 (8%), 1,98 (10%). En cuanto al pH final, en todos los ensayos cayó significativamente por debajo del pH máximo, en los montajes con 6%, 8% y 10% se apreciaron pH entre 1.65 y 1.75, mientras que con 1% y 4% de mineral, estos bajaron hasta 1.54 y 1.57 respectivamente.

En las gráficas de potencial redox y concentración de Fe^{+2} se observaron tres fases, una fase de latencia, una exponencial y otra estacionaria (Figura 3-1 B y C). Particularmente la fase de latencia fue más larga a medida que aumentó la concentración de mineral y disminuyó la de sulfato ferroso, como ejemplo, en el ensayo con 1% de pulpa el proceso de oxidación inicia el primer día, en el que contiene 4% inicia a los tres días y con 6% y 8% al microorganismo le toma aproximadamente seis días comenzar a oxidar el hierro ferroso de la solución. En general los valores máximos de potencial de óxido-reducción coinciden en el tiempo con los valores máximos de pH en cada ensayo. En todos los ensayos, pese a la presencia fase lag, se alcanzaron valores de potenciales redox altos y caídas considerables en las concentraciones de Fe^{+2} indicando actividad microbiana. La fase estacionaria inicia alrededor del tercer día en el subcultivo con 1% de mineral, en el sexto día con 4%, y en el día nueve para los demás subcultivos. En los repiques con 10% de pulpa el tiempo latencia comienza a disminuir, en la gráfica de potencial redox (Figura 3-1B) se aprecia que su duración solo fue de tres días. Con esta cantidad de pulpa también se observó el aumento más significativo del pH y un incremento leve en la concentración de Fe^{+2} al tercer día del proceso.

Por último se puede decir, que en los controles no se observaron cambios significativos de las variables medidas, solo un leve incremento en el pH y el potencial redox.

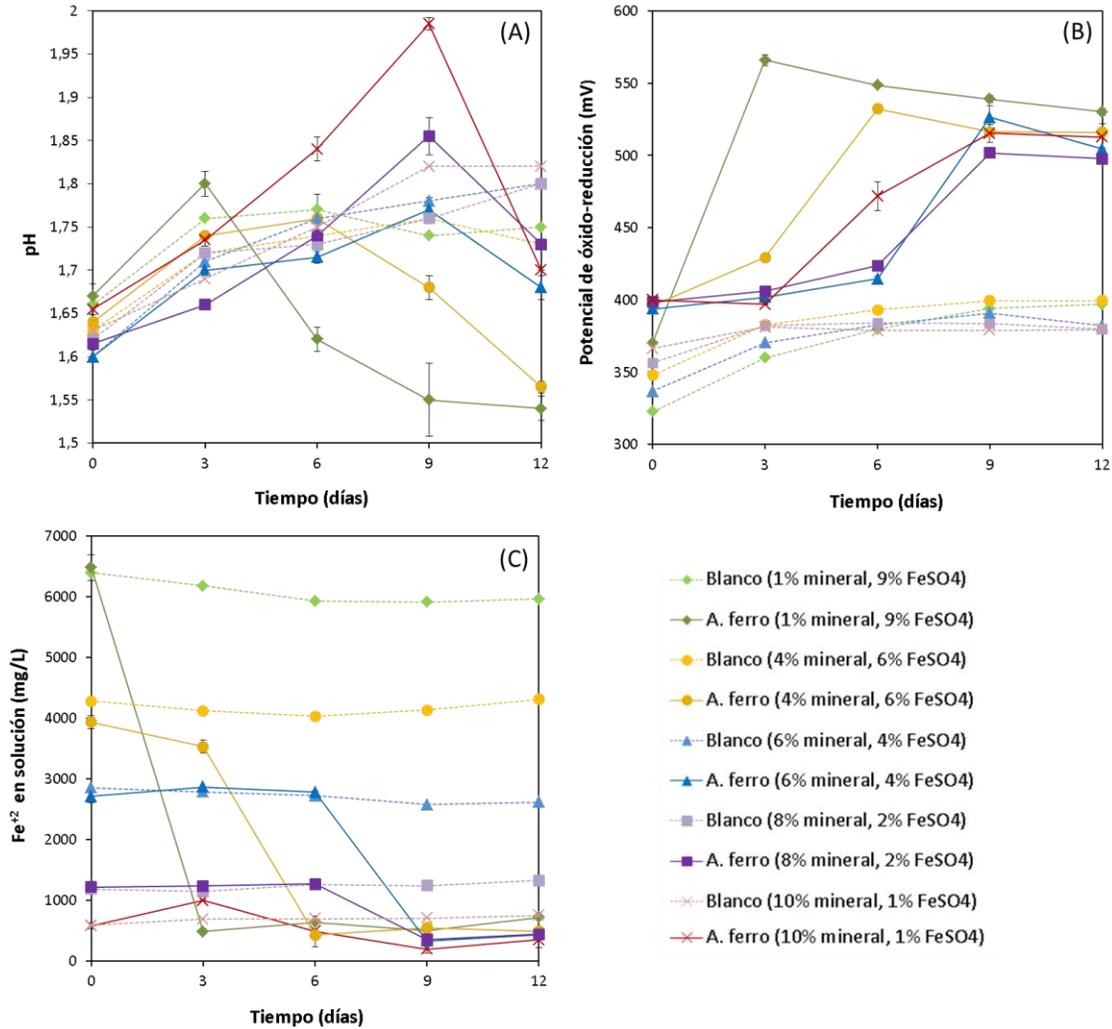


Figura 3-1: Cinéticas de los parámetros físicos y químicos determinados en la etapa inicial de adaptación: concentraciones crecientes de mineral y decrecientes de sulfato ferroso. (A) pH vs tiempo (%). (B) Potencial redox vs tiempo (mV). (C) Concentración de Fe⁺² vs tiempo.

3.3.2 Adaptación segunda etapa: repiques sucesivos con mineral de partícula gruesa

Para la etapa 2 de adaptación, las cinéticas de pH (Figura 3-2A) presentaron comportamientos similares a los de la primera etapa, el pH subió hasta su punto máximo para luego decaer de forma continua hasta el final del proceso. En el día seis alcanzaron sus valores máximos de pH los

repiques 1 (2.14), 2 (2.13), 3 (1.99), 6 (2.05) y 7 (1.97); Los máximos pH para los repiques 4 (1.92), 5 (1.99) y 8 (1.95) fueron apreciados en el día tres. Consistentemente, en los últimos cinco repiques, el pH alcanzado el último día del proceso osciló entre 1.50 y 1.46, inferior al pH inicial cuyo valor se mantuvo alrededor de 1.6. En los repiques 1,2 y 3 pH final permaneció entre 1.55 y 1.60 sugiriendo una menor solubilización del residuo respecto a los últimos repiques.

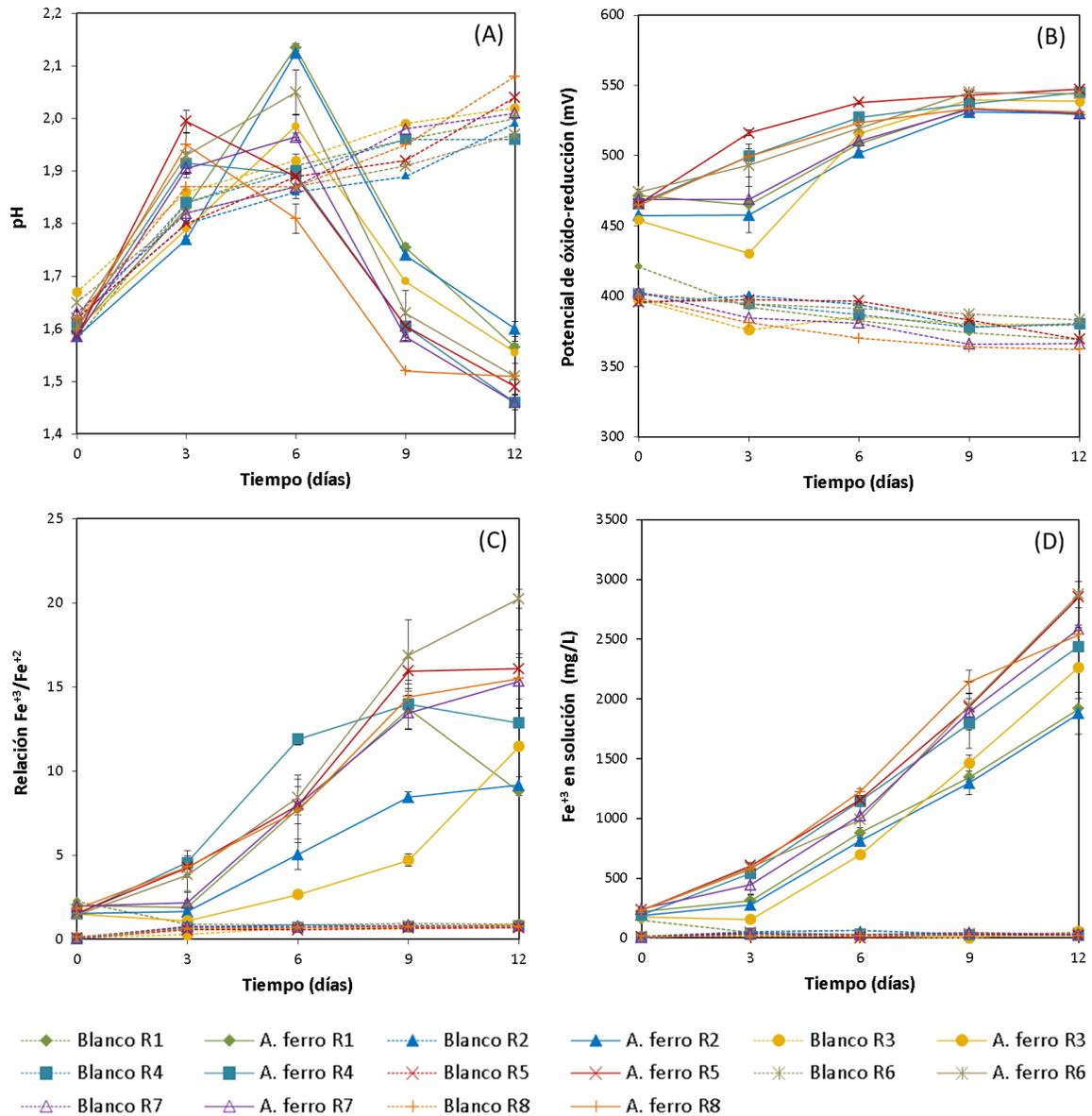


Figura 3-2. Cinéticas asociadas a la segunda etapa de adaptación: Repiques sucesivos con residuos de partículas gruesas. (A) pH vs tiempo. (B) Potencial redox vs tiempo. (C) Relación Fe^{+3}/Fe^{+2} vs tiempo. (D) Concentración de Fe^{+3} en solución vs tiempo.

En las cinéticas de potencial de óxido-reducción y relación $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ (Figuras 3-2 B y C) se observaron fases de latencia de 72 h en los tres primeros repiques y el repique 7. Estas fases indican que las relaciones entre el Fe^{+3} y el Fe^{+2} no cambiaron durante los primeros tres días, es decir, que aparentemente no hubo actividad oxidativa. Después de este periodo, las razones comienzan a aumentar hasta el noveno día con una velocidad de conversión menor en los repiques 1 y 3. Finalmente se entra en una tercera fase caracterizada por comportamientos distintos en los primeros tres repiques, cayendo en el 1, estabilizándose en el 2 y aumentando en el 3. En los demás repiques se apreció un aumento gradual desde el inicio del proceso hasta el día nueve. Entre el noveno y doceavo día se presentó una inflexión acompañada de ligeros disminuciones en la conversión Fe^{+2} a Fe^{+3} , con algunas diferencias menores.

Tal como se apreció en las gráficas de potencial redox y relación $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, las cinéticas del Fe^{+3} en solución (Figura 3-2D) también presentaron una fase de latencia para los repiques, 1, 2, 3 y 7, seguidas de fases exponenciales hasta el final del proceso. Los repiques 1 y 2 presentaron las velocidades de generación del ion férrico más bajas y consecuentemente las menores concentraciones finales de Fe^{+3} en solución, 1917.5 mg/L y 1880.0 mg/L respectivamente. Por otro lado, en los repiques 4, 5, 6 y 8, el Fe^{+3} comenzó a aumentar desde el primer día de proceso, donde los repiques 5 y 6 alcanzaron las concentraciones finales más altas de Fe^{+3} , 2853.3 mg/L y 2876.3 mg/L respectivamente.

Las cinéticas asociadas a los controles fueron consistentes en todos los repiques (Figura 3-2), presentando incrementos en el pH a través del tiempo, caídas leves en los potenciales redox y cambios poco significativos en las relaciones $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ y concentraciones de Fe^{+3} en solución.

La Figura 3-3 presenta un diagrama correspondiente a los porcentajes promedio de Fe total disuelto alcanzados con cada repique. En esta grafica se aprecian que las diferencias entre los ocho repiques son consecuentes con lo antes descrito en las cinéticas. Los repiques 1 y 2, cuyas cinéticas fueron las más lentas, particularmente las del Fe^{+3} , presentaron los porcentajes más bajos de Fe total solubilizado, 3.24 % y 3.17% respectivamente. En el repique 3, aunque hubo un crecimiento en el porcentaje de solubilización, 3.87%, fue el tercero más bajo, en este montaje se apreciaron las caídas iniciales más pronunciadas de potencial redox y $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$. En el repique 4 desapareció por primera vez la fase de latencia y el porcentaje de hierro continuo en aumento hasta 4.12%. Luego están los repiques 5 y 6 con los más altos porcentajes de hierro disuelto, 4.71% y 4.68%, respectivamente. Reaparece la fase de latencia en el repique 7 y consecuentemente decae el

hierro solubilizado hasta 4.26%. Aunque en el repique 8 no se presentaron retardos en las cinéticas de oxidación, el porcentaje de hierro total no incrementó, este fue de 4.18%.

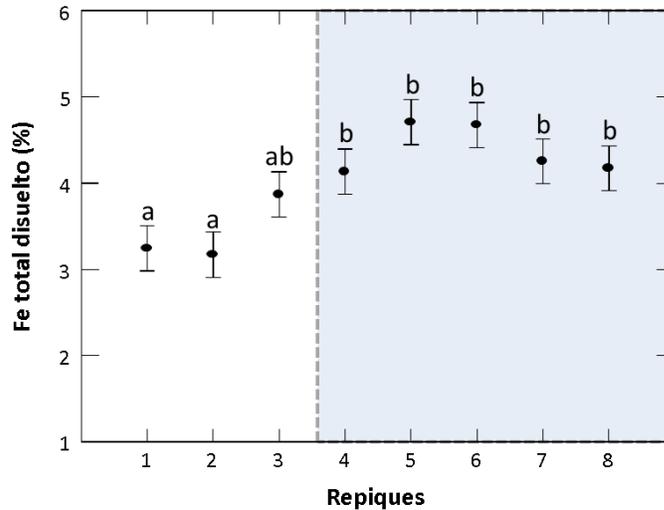


Figura 3-3: Repiques etapa 2. Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de hierro total en solución con intervalos de confianza del 95%. Las letras minúsculas indican las diferencias entre los repiques según la prueba de Tukey

Para establecer si las diferencias entre los porcentajes de hierro total disuelto asociados a los repiques fueron o no significativas, se realizó un análisis estadístico. En primer lugar, el análisis de los supuestos mostró que los porcentajes de hierro tienen una distribución normal y varianzas homogéneas, obteniéndose valores p de 0.3980 y 0.3566 respectivamente. El análisis de varianzas arrojó un valor p de 7.53×10^{-5} , indicando diferencias significativas en el porcentaje de hierro total solubilizado entre al menos dos de los ocho repiques. Un análisis de diferencia de medias de Tukey permitió determinar puntualmente las similitudes y diferencias entre los repiques. Los repiques 1 y 2 se dividieron en un solo grupo, “a”, y corresponden a los repiques con más bajos porcentajes de solubilización. El porcentaje de hierro del repique 3 fue estadísticamente similar al de los repiques 1, 4, 7 y 8, por lo que se clasificó como “ab”. Se formó un último grupo, “b”, con los repiques 4, 5, 6, 7 y 8, en este conjunto se presentaron las más altas disoluciones de hierro.

Pese a las diferencias observadas en las cinéticas de los repiques 4, 5, 6, 7 y 8, estadísticamente estos cinco repiques presentaron porcentajes muy similares de hierro total disuelto, es decir, grados cercanos de oxidación. Por lo anterior y de acuerdo al criterio de adaptación establecido, la cepa

logró adaptarse al residuo de la mina San Antonio, a partir de este resultado se determinó pasar a los cultivos sucesivos con el mineral de interés, el residuo de la mina La Maruja.

3.3.3 Adaptación tercera etapa: Repiques sucesivos con mineral de partícula fina

Igual que en la etapa 2, para esta etapa con el residuo de La Maruja, se determinaron las cinéticas de parámetros como el pH, potencial redox, relación Fe^{+3}/Fe^{+2} y Fe^{+3} en solución (Figura 3-4). En el caso del pH (Figura 3-4A) solo se presentaron puntos máximos alrededor del tercer día en los repiques 1 (2.65) y 2 (2.27). A partir del repique 3 los incrementos de este parámetro fueron casi nulos y el pH comenzó a decaer, en la mayoría de los repiques, desde el día tres. En el repique 7 se observó una caída significativa del pH desde el primer día de proceso. En general a medida que aumentó en el número de repiques, el incremento del pH durante los primeros tres días fue desapareciendo.

Comparando los resultados del pH de la segunda y tercera etapa de adaptación (Figuras 3-2A y 3-4A) se observa que las cinéticas del pH variaron significativamente, estas diferencias se evidencian en los controles los cuales en la tercera etapa (Figura 3-4A) alcanzan valores máximos alrededor de 3.5. Adicionalmente al final de esta misma etapa, pero en los ensayos con microorganismo, se alcanzaron valores mínimos cercanos a 1.3.

Tal como ocurrió en la segunda etapa de adaptación, durante los dos primeros repiques con el residuo de La Maruja (partículas finas) también se apreció una fase de latencia en las cinéticas de potencial redox, relación Fe^{+3}/Fe^{+2} , y concentración de Fe^{+3} en solución (Figura 3-4 B, C y D).

En todos los repiques, excepto el 1, el potencial de óxido reducción (Figura 3-4B) alcanzó valores máximos entre 528 y 546 mV durante el día seis y luego comenzó a decaer hasta finalizar cada ensayo. En el ensayo 1, el aumento del Eh se prolonga hasta el día nueve, alcanzando un valor máximo de 546.15 mV. Estos comportamientos son consistentes con lo hallado para la relación Fe^{+3}/Fe^{+2} (Figura 3-4C), la cual en la mayoría de los repiques también aumenta significativamente hasta día 6 y luego cae paulatinamente, y en los repiques 1 y 10 el aumento de la razón Fe^{+3}/Fe^{+2} se prolonga hasta el día 9. En la razón Fe^{+3}/Fe^{+2} el cambio en el comportamiento es más evidente, por la caída abrupta.

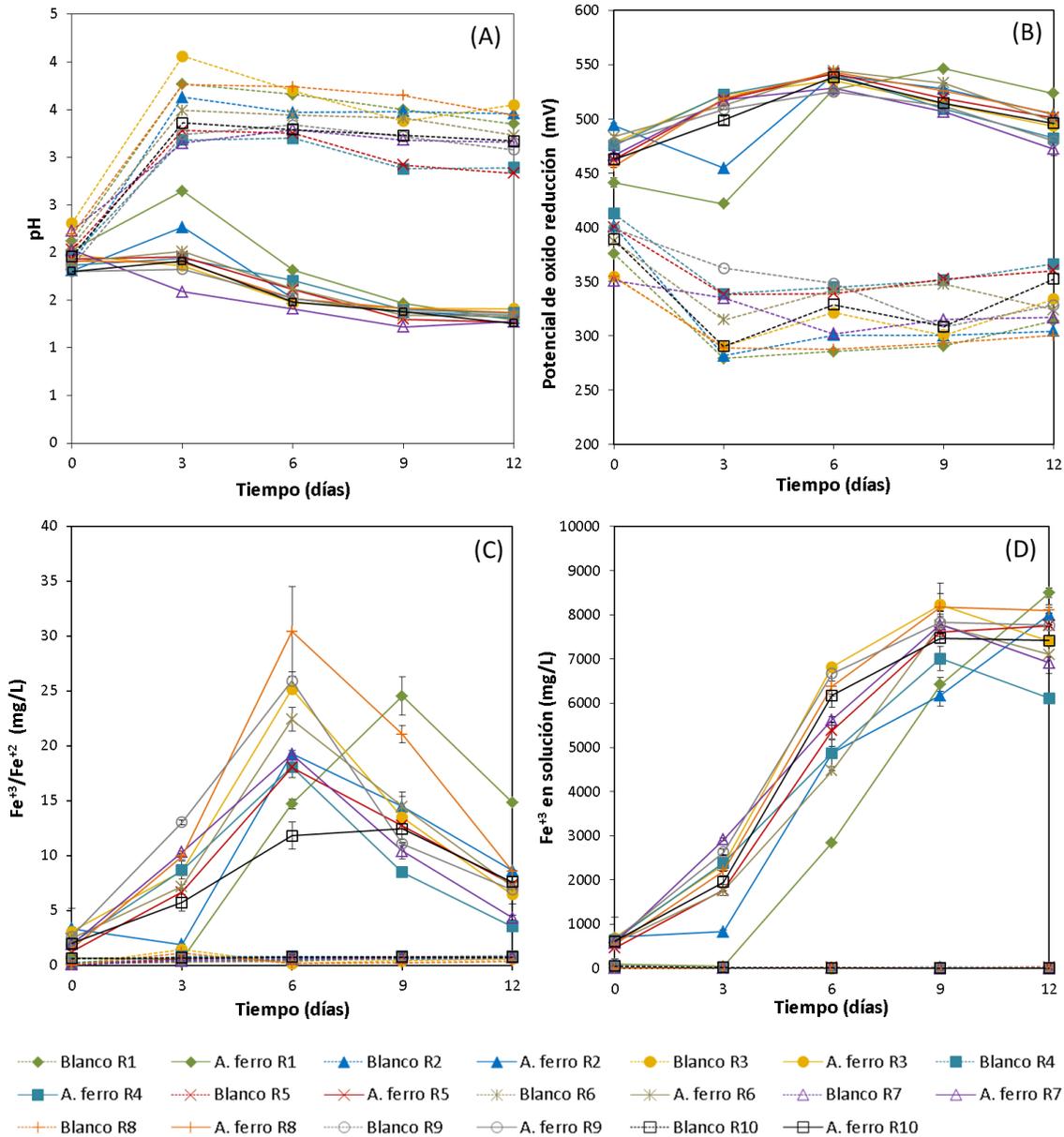


Figura 3-4: Cinéticas asociadas a la tercera etapa de adaptación: Repiques sucesivos con residuos de partículas finas. (A) pH vs tiempo. (B) Potencial redox vs tiempo. (C) Relación Fe^{+3}/Fe^{+2} vs tiempo. (D) Concentración de Fe^{+3} en solución (mg/L).

De acuerdo a las cinéticas del Fe^{+3} en solución (Figura 3-4D) de los últimos ocho repiques, la mayor oxidación se presentó entre los días cero y nueve, haciéndose máxima entre los días tres y seis. A partir del día nueve aparece una nueva fase en la que decae la velocidad de oxidación,

particularmente y de forma más pronunciada en los repiques 3, 4 6 y 7. En los repiques 1 y 2 la oxidación inicio desde el día tres y se extendió hasta el día 12. Pese a la fase de latencia inicial, los repiques 1 y 2 fueron quienes alcanzaron la mayor concentración de hierro férrico al final del proceso, 8495.83 mg/L y 7998.13 mg/L respectivamente. En el día nueve donde se presentó el pico máximo para los demás repiques, el repique 3 sobresalió con 8224.79 mg/L, seguido del repique 8 con 8168.96 mg/L. El repique 4 presentó la concentración de Fe^{+3} más baja 7012.71 mg/L, lo anterior estimado en el día nueve.

La Figura 3-5 presenta los porcentajes promedio de hierro total disuelto en los repiques de la etapa 3. En esta grafica se observa una diferencia notoria del porcentaje de hierro total disuelto asociado al repique 1, el cual fue relativamente alto (23.67%), una diferencia similar se apreció con anterioridad en las cinéticas de Fe^{+3} donde el mismo repique alcanzó la más alta concentración de Fe^{+3} . Otros de los repiques que resalta en la Figura 3-5 es el 3, con un porcentaje total de hierro solubilizado de 22.17%. Por otro lado los repiques con las más bajas disoluciones fueron los repiques 4 y 6, con un 19.84% y 19.70%. En general se observaron ciertas oscilaciones en los porcentajes de hierro total disuelto a lo largo de los repiques de esta etapa, particularmente en los primeros seis.

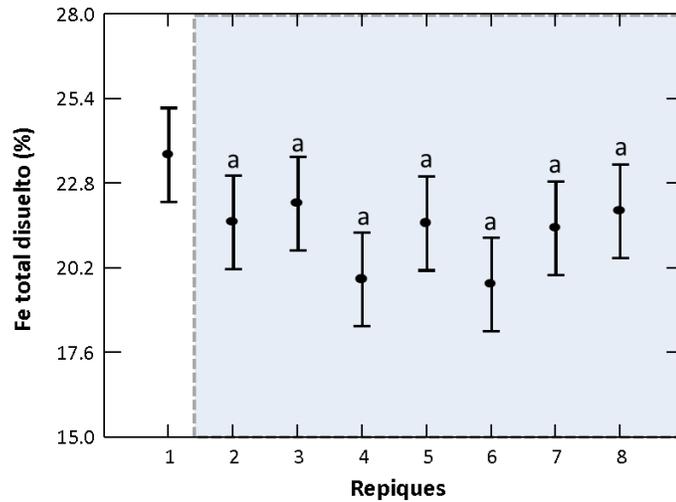


Figura 3-5: Repiques etapa 3. Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de hierro total en solución con intervalos de confianza del 95%. Las letras minúsculas indican las diferencias entre los repiques según la prueba de Tukey.

Para determinar las diferencias “reales” entre los repiques de esta etapa, se procedió con un análisis estadístico. Los porcentajes de hierro total disuelto presentaron normalidad (valor p: 0.5955) y

varianzas homogéneas (valor p: 0.0815). El ANAVA sugirió diferencias significativas entre al menos dos de los repiques (valor p: 0.0271). A través de la prueba de Tukey se determinó que estadísticamente las diferencias en porcentajes de hierro disuelto solo se dieron entre los repiques 1 y 4, y 1 y 6, los demás repiques presentaron porcentajes de disolución similares entre sí. Lo anterior permite concluir que en los últimos nueve repiques, el porcentaje de oxidación fue cercano y la cepa logró adaptarse y estabilizar su actividad en un medio de cultivo cuya fuente de energía fue el residuo de la mina La Maruja.

Finalmente se tiene la Figura 3-6, en la que se compara el porcentaje promedio de hierro total disuelto desde los conjuntos de repiques de las etapas 2 y 3. En ésta gráfica se aprecia la diferencia en disolución de hierro lograda con ambos tipos de residuos. Con el mineral de partícula gruesa (San Antonio) se lograron solubilizaciones hasta de 4.03%, mientras que con el mineral de partícula fina (La Maruja) se logró una lixiviación de hierro del 21.49%, es decir 5.3 veces más alta. En los controles abióticos o blancos, las diferencias no fueron grandes, sin embargo la solubilización fue un poco más alta con el residuo de La Maruja. Esta gráfica también muestra el efecto de las bacterias sobre el mineral. En los ensayos no inoculados el medio de cultivo solo logró oxidaciones incipientes del mineral (0.47% con el residuo San Antonio y 0.70% con el residuo La Maruja), mientras que en aquellos inoculados *A. ferrooxidans* la oxidación fue significativamente alta.

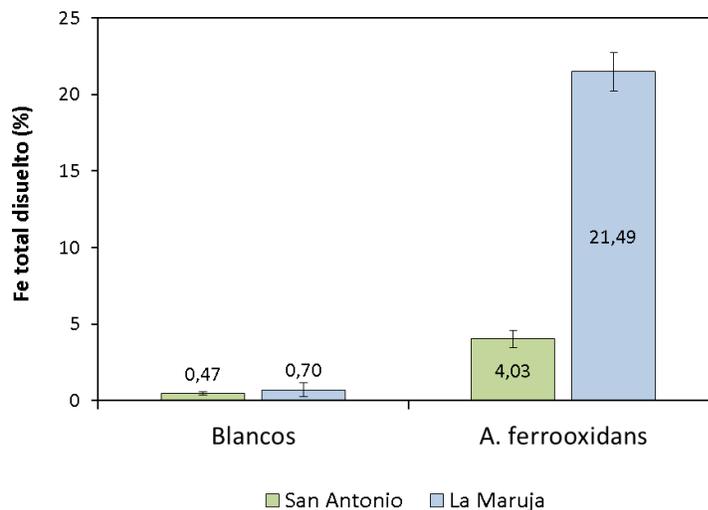


Figura 3-6: Comparación porcentajes de hierro total disuelto, repiques con residuos de San Antonio y La Maruja

3.4 Discusión

3.4.1 Efecto del aumento gradual de mineral

El consumo de hierro ferroso, pH y potencial de óxido-reducción son considerados buenos indicadores en un proceso de biooxidación, estos además de entregar información relevante sobre el proceso global de disolución de minerales, dan cuenta de la actividad microbiana, aspecto de gran importancia durante la adaptación de un microorganismos a un ambiente particular, en este caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a concentraciones crecientes de un residuo minero (Xia *et al.*, 2008; Zapata, 2006; Haghshenas *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2011).

Durante la adaptación de *A. ferrooxidans* a un mineral, con frecuencia se dan incrementos iniciales del pH debido a tres factores: al consumo de ácido por las fases carbonatadas y ganga presente en los concentrados (Ahonen y Tuovinen, 1994; Sampson *et al.*, 2005; Stromberg y Banwart, 1999; Carretero *et al.*, 2011), al consumo H^+ por monosulfuros como la galena, esfalerita, pirrotita y calcopirita (García *et al.*, 1995; Da Silva, 2004; Ballester, 2005) y a la oxidación biológica del Fe^{+2} (Sand *et al.*, 2001). En este trabajo, y particularmente en la primera etapa de adaptación, se observaron aumentos del pH (Figura 3-1A), sin embargo no siempre ocurrieron al inicio del proceso tal como lo reporta la literatura, estos aumentos estuvieron directamente relacionados con el incremento del potencial redox y el consumo del Fe^{+2} . Se considera, que este fenómeno fue debido principalmente a las reacciones bioquímicas del proceso, donde el microorganismo oxidó el Fe^{+2} disponible, al tiempo que consumió H^+ incrementando el pH; a su vez la oxidación del Fe^{+2} generó mayores concentraciones Fe^{+3} y consecuentemente potenciales redox más altos. Por otro lado, la baja influencia de los minerales de ganga o los monosulfuros, la cual también se ve reflejada en los valores de pH alcanzados en los controles abióticos, podría estar asociada a la mineralogía de los residuos de la mina San Antonio. Mejía *et al.*, (2011) encontraron que tamaños finos de partícula, favorecen la exposición y disolución de carbonatos y/o fases silicatadas debido al incremento del área superficial. En esta parte de la adaptación, el mineral empleado además de estar compuesto por partículas relativamente gruesas, contiene concentraciones bajas de ganga y monosulfuros.

De otro lado, el comportamiento consistente de las cinéticas de pH, Eh y Fe^{+2} (Figura 3-1), evidencia la influencia del incremento gradual de mineral sobre la actividad de *A. ferrooxidans*, reflejada en un aumento cada vez más prolongado de la fase de latencia, principalmente en los primeros tres repiques (1%, 4% y 6% de pulpa). Estos comportamientos son comprables con lo

encontrado por Chandraprabha *et al.* (2002) y Haghshenas *et al.* (2009) en sus trabajos de biooxidación de sulfuros con *A. ferrooxidans*. Se presume que la aparición de la fase de latencia en un proceso de biooxidación de minerales es consecuencia de múltiples factores, entre ellos la lixiviación de metales tóxicos (Mason y Rice, 2002; Haghshenas *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2011). De manera particular, aumentos graduales del residuo proveniente de la mina San Antonio, implican mayores concentraciones de metales pesados como el Pb y la Ag, que de entrar en la solución durante las primeras horas del proceso podrían provocar retardos en el crecimiento de *A. ferrooxidans* debido a su interferencia sobre las rutas bioquímicas inherentes a la oxidación del Fe^{+2} (Dopson, 2003; Cabrera *et al.*, 2004; Akcil *et al.*, 2007; Gericke *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2011). Otro de los factores que influye en la aparición de la fase lag, es el esfuerzo cortante ocasionado por la agitación y principalmente por el mineral en suspensión (Haghshenas *et al.*, 2009). Deveci, (2002) y Xia *et al.*, (2008) observaron, que el aumento de la concentración de sólidos conduce al decrecimiento en la viabilidad *A. ferrooxidans* y su capacidad de oxidar el ion ferroso, debido a que el roce de las partículas sólidas con la bacteria tiende causar daños en las membranas celulares. También está la reducción en las velocidades de transferencia de O_2 y CO_2 , asociada al incremento en la concentración de pulpa (Gericke *et al.*, 2009; Haghshenas *et al.*, 2009).

Con base en lo anterior, se puede decir que a medida que incrementa la concentración de sólidos en el medio, a la bacteria le toma más tiempo adaptar su metabolismo al nuevo ambiente cada vez más adverso (Sonnleitner, 1998; Madigan, 2010). Según Sonnleitner (1998), la adaptación significa que las células varían su composición intracelular con el fin de hacer frente de manera eficaz, a las condiciones que se presentan en el ambiente circundante. Estos cambios pueden estar reflejados en la expresión de enzimas o el uso de rutas metabólicas alternativas para la metabolizar los nuevos sustratos, en este caso concentraciones crecientes de mineral. Adicionalmente si las bacterias están expuestas a compuestos inhibitorios o tóxicos, ellas deben expresar otras enzimas que les permitan sobrevivir a estos. De no encontrar una vía para mejorar las condiciones del microambiente comienzan a sufrir e incluso mueren (Sonnleitner, 1998).

Mejía *et al.* (2011) argumentan que el retardo en cinéticas como la del potencial redox, puede ser consecuencia de la deficiencia en fuentes de Fe^{+2} fáciles de asimilar. Cabe recordar que en la primera etapa de adaptación, el incremento en la concentración de pulpa conlleva a la disminución del sulfato ferroso, por tanto las bacterias se ven obligadas a utilizar como fuente de energía los iones provenientes del mineral, proceso que implica cinéticas más lentas (Rodríguez *et al.*, 2003;

Xia *et al.*, 2008); una vez comienza la liberación de este ion, la biooxidación se acelera y es ahí donde comienza la fase exponencial (Rawlings, 2002; Sand; 2001; Xia *et al.*, 2008).

Al observar las fases de latencia en las cinéticas del potencial de óxido-reducción y oxidación del Fe^{+2} , se podría pensar que esta primera etapa de adaptación no fue exitosa, sin embargo se debe considerar que esta fase es un paso crucial de la adaptación, donde la bacteria adquiere resistencia a los distintos factores que pueden causar su inhibición (Tuovinen *et al.*, 1971; Haghshenas *et al.*, 2009). Independiente de la concentración de mineral en el medio y la duración de la fase lag, en todos los ensayos se presentaron fases exponenciales a través de las cuales se alcanzaron valores de potenciales redox altos y bajas concentraciones de Fe^{+2} , es decir, el microorganismo logró adaptarse a las condiciones ambientales a las que fue expuesto en cada ensayo. El grado de adaptación también se pudo apreciar en el repique con 10% de pulpa, donde el tiempo de latencia en las cinéticas de Eh y Fe^{+2} solo duró tres días.

3.4.2 Efecto de los repiques sucesivos

Pese al importante papel que desempeña la fase de latencia en la adaptación de una bacteria acidófila a concentraciones crecientes de pulpa (Tuovinen *et al.*, 1971), no se puede desconocer que la presencia de dicha fase retarda la oxidación de los minerales, haciendo de la biooxidación un proceso ineficiente en el tiempo. Con el fin de minimizar y/o eliminar la fase lag e incrementar las velocidades de disolución de los minerales asociados a los residuos de la mina La Maruja, se realizaron dos series de cultivos sucesivos empleando una concentración fija de mineral y dos granulometrías diferentes.

De acuerdo a las cinéticas de pH, potencial redox y Fe^{+3} en solución obtenidas en las dos series de repiques sucesivos (Figuras 3-2 y 3-4), es posible afirmar que esta fue una estrategia de adaptación idónea que permitió mejorar la eficiencia del proceso de biooxidación de los residuos mineros provenientes de Marmato. El éxito de estas etapas se vio reflejado en la reducción significativa o eliminación de las fases de latencia observadas durante la primera etapa (Mason y Rice, 2002), y en la obtención de porcentajes de hierro solubilizado estadísticamente similares entre repiques (Figuras 3-3 y 3-5) (Haghshenas *et al.*, 2009; Molaei *et al.*, 2011). Se considera que estos resultados, son consecuencia de la tolerancia adquirida por la cepa al efecto tóxico de algunos de los elementos solubilizados (Haghshenas *et al.*, 2009; Mason y Rice, 2002; Xia *et al.*, 2008). Algunos autores reportan que a través de los subcultivos, es posible la selección de mutantes resistentes al daño celular provocado por el roce de las partículas y a altas concentraciones de

metales pesados (Shehata y Whitton, 1982; Xia *et al.*, 2008). La tolerancia adquirida por las células, como se sugirió antes, se atribuye a la activación de rutas bioquímicas alternativas que le permiten a la bacteria seguir creciendo bajo condiciones adversas (Nies, 1992; Sonnleitner, 1998; Molaei *et al.*, 2011).

Aunque no fue determinado, es posible que con los repiques sucesivos también se haya incrementado la capacidad de la cepa para adherirse al mineral. Según Sand *et al.* (2001) y Rawlings, (2002) de este factor puede depender la extracción inicial rápida de Fe^{+2} , fuente principal de energía para *A. ferrooxidans* y precursor del Fe^{+3} . Una mayor capacidad de adherencia de las células al sulfuro, podría explicar hasta cierto punto, por qué a pesar de la baja concentración de sulfato ferroso (100 veces menor a la concentración de sulfato ferroso propuesta para el medio T&K (Tuovinen y Kelly, 1972)), la oxidación de mineral y generación de Fe^{+3} luego de varios repiques comenzó desde el primer día de cultivo. El incremento en capacidad de adherencia de las células, fue demostrado por Xia *et al.* (2008) quienes observaron que el porcentaje de absorción de una bacteria adaptada fue, en la mitad del tiempo, 15% más alto que el de una bacteria no adaptada, indicando una fuerte afinidad de la primera bacteria por el mineral. En general, esta adherencia puede generar microambientes con altos potenciales redox debido a la formación de SPE- Fe^{+3} (SPE: Sustancias poliméricas extracelulares), lo cual mejora la lixiviación química e incrementa las velocidades de reacción de la pirita y otros sulfuros (Kinzler *et al.*, 2003; Olson *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2008).

3.4.3 Efecto del tipo de residuo

De otro lado, entre los resultados más relevantes obtenidos desde los cultivos sucesivos, se encuentran las marcadas diferencias entre los repiques con los dos tipos de residuos (Figura 3-6). En principio se podría pensar que por tratarse de minerales provenientes de la misma zona geográfica, compuestos por el mismo tipo de sulfuros, pirita principalmente, las cinéticas de oxidación en ambos deberían ser similares; sin embargo el residuo proveniente de la mina La Maruja se solubilizó de forma más rápida y eficiente. Éste resultado es comparable con lo reportado por Baldi *et al.* (1992) quienes encontraron variaciones significativas en las velocidades de lixiviación de hierro desde diferentes fuentes de pirita, dos de ellas procedentes de la misma región. De igual manera Cruz *et al.* (2006), demostraron a través de un análisis electroquímico (voltametría cíclica) las diferencias en reactividad y los potenciales requeridos por piritas provenientes de seis sitios mineros.

Según la literatura, las diferencias en reactividad de las piritas se deben, entre otros aspectos, a la morfología, área superficial, a las imperfecciones que aparecen en los cristales y a las otras fases minerales que las acompañan, ya sea en inclusiones o sueltas (Caruccio, 1970; Smith, 1942; Wiersma y Rimstidt, 1984; Pollack *et al.*, 1991; Baldi *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2006). En el caso específico de los residuos usados, ambas piritas presentaban una estructura cristalina con granos eudrales, y la mezcla de minerales acompañantes fueron muy similares, por lo cual se cree que la diferencia en las cinéticas estuvo determinada por el área superficial y/o tamaño de partícula.

El efecto del tamaño de partícula en los procesos de biooxidación ha suscitado cierta controversia respecto a cuál es el óptimo. Analizando los resultados de Nemati *et al.* (2000), Olubambi *et al.* (2009) y Mejía *et al.* (2011) quienes evaluaron simultáneamente el efecto partículas finas y gruesas, se podría concluir el tamaño más adecuado oscila alrededor de 75µm, partículas lo suficientemente pequeñas para lograr un incremento en el área superficial del mineral y un aumento en el número de sitios activos desde los cuales se inicia la disolución de los sulfuros (González *et al.*, 1999), y lo suficientemente grandes para evitar la influencia adversa del mineral muy fino sobre las estructuras celulares (Nemati *et al.*, 2000; Deveci, 2004). En este sentido se puede decir que el tamaño de partícula del residuo de La Maruja es (D60 = 60µm) se acerca bastante al tamaño idóneo.

Otra diferencia marcada entre los residuos se apreció en las cinéticas de pH de los blancos, quienes aumentaron de forma considerable en el residuo de La Maruja. Este aumento puede estar igualmente relacionado al tamaño de partícula, el cual deja más disponible las fases silicatadas, carbonatos y monosulfuros, todos consumidores de ácido (Mejía, 2010), a la concentración de la ganga en el mismo residuo, considerablemente mayor a la del residuo San Antonio, y a la alta cantidad de calcita en el mineral de La Maruja. El leve incremento en porcentaje de hierro solubilizado en los controles abióticos con el mineral de La Maruja también se atribuye al tamaño de partícula y disolución de los monosulfuros por el ácido del medio.

Pese a la alta solubilización de hierro obtenida en los repiques con el residuo de La Maruja, también se observaron ciertos efectos que eventualmente pueden afectar la actividad de *A. ferrooxidans*, entre ellos un decrecimiento más pronunciado del pH previsto desde la caracterización inicial del residuo. Este fenómeno es común en minerales con altas proporciones de sulfuros productores de ácido como la pirita (Ecuación 3.2) (Schippers y Sand, 1999; Rohwerder *et al.*, 2003; Cruz y Monroy, 2006; Sekhar *et al.*, 2009a; Simate y Ndlovu, 2014). Con base en lo anterior, se considera que el pH pudo ser uno de los tantos causantes de la caída en la relación

$\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ en los repiques con el mineral de La Maruja. Se cree que al alrededor del día seis, donde el pH bajo hasta 1.4, las condiciones del medio se comenzaron a tornar adversas, y a la bacteria le fue difícil oxidar eficientemente el Fe^{+2} disuelto, el cual se comenzó a acumular. *Acidithiobacillus ferrooxidans* y otras bacterias acidófilas, pueden ser afectadas por cambios considerables de pH debido a que a nivel biológico, este interviene en la velocidad de crecimiento interfiriendo en los grupos ionizables presentes en las enzimas del citoplasma y periplasma (Gómez y Cantero, 2005; Rivadeneira, 2011). Otras causas de la acumulación de Fe^{+2} pueden estar asociadas a: (i) el efecto inhibitorio del Fe^{+3} descrito previamente en el capítulo 2; (ii) a las velocidades de solubilización del residuo, donde la cantidad de Fe^{+2} generado por lixiviación llega a ser tan alta que las bacterias no lo alcanzaron a oxidar eficientemente; (iii) la disponibilidad de oxígeno disuelto en el sistema, el cual puede verse limitado en cuando se trabaja en erlenmeyers (Das *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2004).

Finalmente, haciendo un análisis global de la disolución del residuo de La Maruja, y dejando de lado los problemas que pudieron presentarse, se considera los porcentajes de hierro disuelto fueron favorables. Zhang *et al.* (2008) presentan porcentajes de hierro lixiviado inferiores a 20% durante la biooxidación de pirita con *A. ferrooxidans* luego de 18 días de proceso. Lui *et al.* (2011) por su parte, obtuvieron porcentajes de biolixiviación de pirita (tamaño de partícula 74 μm) inferiores al 15%, en un proceso de biooxidación de 12 días con *A. ferrooxidans*. En el presente trabajo en solo nueve días se obtuvieron porcentajes de hierro disuelto iguales o superiores a 20%.

3.5 Conclusiones y recomendaciones

El principal efecto de los cultivos sucesivos con concentraciones crecientes del residuo de San Antonio, es la aparición de fases de latencia cada vez más largas que retardan la eficiencia del proceso de biooxidación, no obstante, es durante esta fase que la bacteria comienza a adaptar su metabolismo a un ambiente complejo como lo es un sistema de biooxidación.

Los repiques sucesivos con una concentración definida de mineral y diferentes tamaños de grano, demostraron ser una estrategia efectiva a través de la cual se pudo mejorar el proceso de biooxidación y lograr cierta estabilidad en la cepa, disminuyendo las fases de latencia y mejorando los porcentajes de hierro disuelto en solución.

El residuo de la mina La Maruja resultó más reactivo que el de la mina San Antonio debido al incremento en el área superficial de sus partículas. No obstante las altas disoluciones de este

mineral, provocaron caídas considerables del pH que parecieron interferir con la actividad celular y consecuentemente con la oxidación del Fe^{+2} . Se recomienda evaluar si el control del pH durante la biooxidación de estos residuos, eventualmente puede evitar la pérdida de actividad microbiana y en particular incrementar la disolución de los sulfuros.

Con base en las cinéticas de generación de Fe^{+3} y el tiempo de aparición de la fase estacionaria, es posible que solo 10 días de cultivo sean suficientes para obtener datos representativos sobre la biooxidación de los residuos de La Maruja, que den explicación sobre el efecto de factores o parámetros fijos que a futuro se deseen evaluar.

4. Efecto de la velocidad de agitación y control de pH en reactores de tanque agitado (5 Litros), sobre el proceso de biooxidación de los residuos de minería aurífera de la mina La Maruja

Resumen

Con el fin de encontrar una velocidad de agitación idónea y determinar la importancia de controlar el pH durante la biooxidación del residuo de la mina La Maruja (Marmato, Cadas), se planteó un diseño experimental 2x3 en el cual se analizaron dos condiciones de control de pH (con y sin control) y tres velocidades de agitación (300 r.p.m, 500 r.p.m y 700 r.p.m). Todos los tratamientos fueron evaluados a nivel de laboratorio en reactores de tanque agitado de 5L (volumen efectivo), empleando como agente biológico una cepa comercial de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (previamente adaptada al mineral), y como medio base el medio T&K modificado. Estadísticamente no se encontraron interacciones significativas entre los dos factores, tampoco se apreciaron diferencias entre el control o no de pH, sin embargo la agitación fue un factor determinante en la eficiencia del proceso. Con 300 r.p.m se obtuvieron los más bajos porcentajes de hierro y sulfatos solubilizados, en promedio 8.60% y 9.61% respectivamente. Entre 500 r.p.m y 700 r.p.m no se encontraron diferencias significativas, logrando una solubilización promedio de 21.05% de Fe y 24.42% de SO_4^{-2} con 500 r.p.m y 22.97% de Fe y 23.97% de SO_4^{-2} con 700 r.p.m. Los análisis por difracción de rayos X (DRX), corroboraron la disolución de pirita, cuya concentración disminuyó notablemente en los ensayos con las mayores disoluciones de hierro y sulfatos, entre 24.13 % y 26.77% con 500 r.p.m, y 28.82% y 30.87% con 700 r.p.m. Los difractogramas obtenidos por DRX en conjunto con los espectros de FTIR, evidenciaron la formación de una nueva fase catalogada como jarosita. Debido a los costos inherentes al consumo de potencia y a la posible reducción en el estrés hidrodinámico, se recomienda emplear una velocidad de agitación de 500 r.p.m, y dependiendo de la duración del proceso y las cinéticas del pH, no controlarlo, de esta manera se mantendrían las eficiencias del proceso y se disminuirían los costos de operación en un futuro escalado.

Palabras clave: agitación, biooxidación, control de pH, reactor de tanque agitado, residuos mineros.

Abstract

In this study was evaluated the importance of pH control and the best stirring speed in the mine tailings biooxidation. A factorial design was adopted to study pH (with and without pH control) and stirring speed (300 r.p.m, 500 r.p.m and 700 r.p.m). The batch experiments were carried out in stirred-tank reactors with a working volume of 5L. The mine tailings were provided by La Maruja mine. *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 was selected as biological agent. No significant statistical differences were found between the two factors. No differences were found between pH control or not control. On the other hand, the stirring speed was a determining factor in the process efficiency. Stirring speed of 300 r.p.m had the lowest solubilization of iron and sulfate (8.60% and 9.61%, respectively). Stirring speeds of 500 r.p.m and 700 r.p.m did not show significant differences with values of 21.05% Fe and 24.42% SO_4^{-2} at 500 r.p.m, and 22.97% Fe and 23.97% SO_4^{-2} at 700 r.p.m. X-ray diffraction analysis (XRD) corroborated pyrite dissolution, with levels of concentration significantly reduced, in addition to displaying the formation of jarosite. Due to the costs involved in power consumption and hydrodynamic stress, it was recommended to use a 500 r.p.m stirring speed, and, depending on processing time and pH kinetics, not to control it. Thus maintaining process efficiency of the process and reducing operating costs of a prospective scale-up.

Keywords: biooxidation, mine tailings, pH control, speed stirred, stirred tank reactor.

4.1 Introducción

Los reactores de tanque agitado (STR: Stirred Tank Reactor) son una de las configuraciones de reactor más empleadas a nivel biotecnológico debido a las ventajas técnicas y económicas que ofrece (Doran, 1998). En el campo de la biohidrometalurgia, esta configuración disminuye de forma considerable los tiempos de operación, ya que facilita el contacto de los agentes oxidantes con el mineral, y permite monitorear y/o controlar de cerca factores como el pH, la temperatura y la aireación (Rawlings, 2005; Sekhar *et al.*, 2012). Son muchos los procesos que actualmente se llevan a cabo en reactores de tanque agitado, entre ellos la biooxidación de minerales refractarios para la recuperación de oro (Rossi, 1990; Watling, 2011; Sekhar *et al.*, 2012; Brierley y Brierley, 2013).

La agitación podría considerarse uno de los parámetros clave cuando se trabaja en reactores de tanque agitado, particularmente en procesos biooxidativos que precisan de la interacción de tres fases, sólida, líquida y gaseosa (Rossi, 2001; Sun *et al.*, 2012). Una buena mezcla mejora la transferencia de masa desde la fase gaseosa a la líquida, mantiene la transferencia de calor en un nivel adecuado y necesario para que se den las reacciones biológicas, y determina el contacto entre

la fase líquida y el mineral, acelerando o desacelerando la disolución de los sulfuros (Rossi, 1991; Wang *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2012).

Si bien mantener una mezcla adecuada es ideal, un nivel alto de agitación también podría limitar el crecimiento microbiano (Deveci, 2004; Sun, *et al.*, 2012). Diversos autores han sugerido que la exposición de los microorganismos a altos esfuerzos de corte, inhibe el crecimiento de la biomasa, la síntesis de productos, desnaturaliza las proteínas extracelulares, reduce la expresión de genes esenciales, cambia la morfología de la célula, entre otros (Doran, 1998; Trujillo y Valdez, 2006; García *et al.*, 2011; Sun, *et al.*, 2012). d'Hugues *et al.* (1997) sugirieron que la turbulencia excesiva durante la biooxidación de pirita (a 450 r.p.m), afecta la eficiencia de proceso debido a una limitación en la interacción bacterias-sulfuro. Por otro lado Deveci, (2002 y 2004) mostró que la viabilidad de *A. ferrooxidans* se ve disminuida por la fricción o roce con las partículas minerales. Todo lo anterior manifiesta la necesidad de encontrar un nivel adecuado de agitación a través del cual la solubilización del mineral se pueda realizar de manera eficiente y las bacterias no sufran de forma excesiva el rigor de la agitación.

Como se mencionó anteriormente, una de las ventajas que ofrecen los reactores de tanque agitado es un mejor control y monitoreo de diversos parámetros, entre ellos el pH. El pH es un factor de gran relevancia en un proceso de biooxidación tanto por sus implicaciones mineralógicas como biológicas. Desde el punto de vista mineralógico, pH por encima de 2.0 dan lugar a una mayor precipitación de fases minerales como la jarosita, afectando negativamente la oxidación de los sulfuros (Gómez y cantero, 2005; Nurmi *et al.*, 2010; Rivadeneira, 2011; Kaksonen *et al.*, 2014b). A nivel biológico el pH interviene en la velocidad de crecimiento de las bacterias acidófilas interfiriendo en los grupos ionizables presentes en las enzimas del citoplasma y periplasma (Gómez y Cantero, 2005; Rivadeneira, 2011). Los iones H^+ juegan un papel importante en el metabolismo energético de *A. ferrooxidans*, participando como reactivo en la oxidación del ion ferroso, por tanto este hidrogenión se considera un nutriente esencial para el microorganismo (Apel y Dugal, 1978; Das *et al.*, 1999; Mason y Rice, 2002; Gómez y Cantero, 2005; Molaei *et al.*, 2011). Según Amaro *et al.* (1991) dependiendo de la concentración de H^+ se activan ciertos mecanismos de regulación que dan lugar a la síntesis de diversos componentes celulares como proteínas. Se estima que el rango de pH en que puede sobrevivir *A. ferrooxidans* oscila entre 1.2 y 2.5, y a nivel comercial usualmente es controlado entre 1.2 y 1.8 mediante la adición de cal (Battaglia *et al.*, 1994; Dew *et al.*, 1997; Valdés *et al.*, 2008; Rivadeneira, 2011). Finalmente, a nivel global, el control pH podría convertirse en un factor determinante en la economía del proceso (Watling, 2006).

En el presente trabajo se evaluaron distintas velocidades de agitación y el control o no del pH durante la biooxidación de un residuo minero procedente de la mina La Maruja (Marmato, Caldas). Lo anterior se realizó con el fin de encontrar un nivel adecuado de agitación y determinar si es completamente necesario controlar el pH para lograr altas eficiencias de biooxidación del residuo minero. La realización de este trabajo constituye el punto de partida para el posterior escalado de este bioproceso.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Mineral

Para la realización de este estudio se seleccionó un residuo de minería aurífera proveniente de la mina La Maruja, localizada en el municipio de Marmato (Caldas). La caracterización química inicial arrojó concentraciones importantes de Fe (24.99%), S (28.70%), Si (14.25%), Al (4.32%) y Ca (1.00%). Los análisis mineralógicos indicaron altas concentraciones de pirita (~34.14%) y cuarzo (~25.10%), baja presencia de esfalerita, pirrotita, calcopirita, galena y arsenopirita, concentraciones considerables de algunos aluminosilicatos como clinocloro y moscovita, las plagioclasas albita y anortita, y el carbonato calcita. Mediante un análisis granulométrico se determinó un D_{60} igual a $60\mu\text{m}$ (pasante malla 200). Todos los detalles de la caracterización mineralógica del residuo (metodología y resultados) se presentan en el capítulo 2. Adicionalmente cabe resaltar que este tipo de material se caracteriza por sus altas densidades, generalmente entre 2 y 4 g/cm^3 .

4.2.2 Material biológico

Como agente biológico fue empleada la cepa comercial *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 suministrada por el Laboratorio de Biomineralogía y Biohidrometalurgia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín y previamente adaptada al mineral (capítulo 3).

4.2.3 Diseño experimental

El diseño experimental se planteó teniendo en cuenta que al emplear reactores de tanque agitado uno de los factores más relevantes es la velocidad de agitación, de ésta depende la mezcla del sistema trifásico y el estrés hidrodinámico que pueda generarse sobre el microorganismo (Sun *et al.*, 2012; Deveci, 2004). Adicionalmente la determinación de un nivel de agitación adecuado es un

aspecto que toma importancia para un futuro escalado a partir de criterios tradicionales (Quintero, 1981; García y Gómez, 2009).

Por otro lado, es conocido que el pH juega un papel fundamental tanto en las reacciones bioquímicas como en la mineralogía del proceso de biooxidación (Gómez y Cantero, 2005; Ballester, 2005). Según lo observado durante la adaptación de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a los residuos de La Maruja, el bajo pH que se alcanza tras la disolución de la pirita, podría estar provocando un decrecimiento en la actividad de la bacteria y consecuentemente interfiriendo en la eficiencia del proceso global de biooxidación, por lo que se recomendó evaluar el efecto del control de pH.

Con base en lo anterior se diseñó un experimento a través del cual se evaluó el efecto conjunto de la velocidad de agitación y el control del pH empleando un reactor de tanque agitado de 5L (Figura 4-1). El diseño consistió en un factorial 3x2, en el que se analizaron tres niveles de agitación 300 r.p.m, 500 r.p.m y 700 r.p.m, seleccionados con base en los resultados de otros trabajos (Arroyave, 2008; Sun *et al.*, 2012), y el control o no de pH durante el transcurso del proceso. Se fijó como pH inicial y/o a controlar 1.8 ± 0.05 , para lo que se usaron soluciones de NaOH (9N) y H₂SO₄ (16N). Se evaluaron seis tratamientos cada uno con dos réplicas. También se incluyeron blancos o controles abióticos, con el fin de evaluar la oxidación del mineral por los componentes del medio de cultivo. En total se realizaron 18 bioensayos incluidos los controles abióticos.

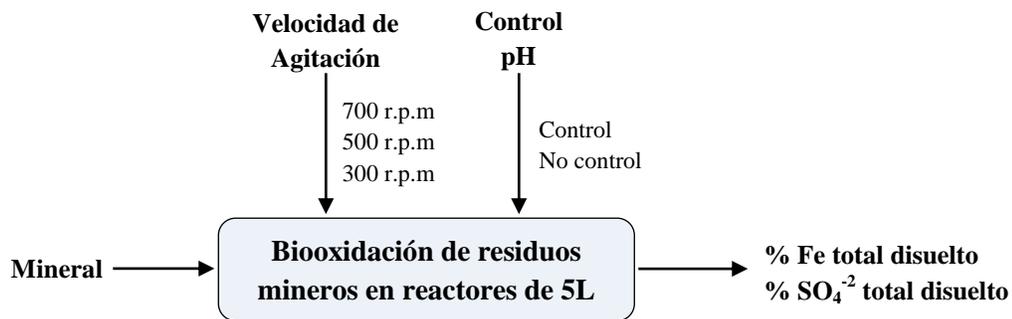


Figura 4-1: Diagrama general del proceso de biooxidación

4.2.4 Montaje de bioensayos

Para los ensayos de biooxidación se emplearon dos biorreactores de tanque agitado de 5L (volumen efectivo), operados en modo discontinuo. De acuerdo al diseño experimental planteado, fue necesario el montaje de 18 ensayos (incluidos los blancos) distribuidos aleatoriamente en el

tiempo. Para cada ensayo se prepararon 4.5L del medio base T&K modificado compuesto por 0.4 g/L de $(\text{SO}_4)\text{NH}_4$, K_2HPO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Tuovinen y Kelly, 1972). Como fuente de energía se usaron 0.3g/L de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 10% (p/v) de mineral. Se inoculó con 500 ml de suspensiones celulares con una concentración aproximada de 10^8 células/ml. El pH del medio y de las soluciones de sulfato ferroso fue ajustado con H_2SO_4 (98%) hasta 1.6 ± 0.1 . Tanto el medio como el mineral fueron esterilizados a 120°C y 15 PSI, por 20 min, la solución de sulfato ferroso se esterilizó por filtración con membrana de nitrocelulosa de $0.45\mu\text{m}$. Se suministraron 0.5 vvm de aire a través de un difusor ubicado debajo del impulsor. La temperatura fue ajustada en 30°C a través de un sistema de calentamiento compuesto por una chaqueta y un controlador. El tipo de impulsor consistió en una turbina de seis palas planas inclinadas 45° . Las condiciones de pH y agitación fueron variadas de acuerdo al diseño experimental previamente descrito. El agua perdida por evaporación en cada uno de los ensayos fue compensada de forma periódica. Cada montaje fue incubado durante diez días.

4.2.5 Monitoreo de bioensayos

Todos los ensayos fueron monitoreados con mediciones periódicas (cada 48 h) de parámetros químicos de gran importancia para este tipo de procesos. El pH y potencial de óxido-reducción fueron medidos a través de un potenciómetro Hach HQ 40d multi y electrodos de pH y Eh con electrolito Ag/AgCl. La concentración de células en suspensión fue determinada mediante conteo en cámara de Neubauer de acuerdo a Zapata (2004). Se cuantificó la concentración de hierro ferroso (Fe^{+2}) y férrico (Fe^{+3}) a través del tiempo y consecuentemente el consumo de sustrato y generación de producto por el microorganismo. También se midió la concentración de hierro total (Fe total) y sulfatos (SO_4^{-2}) en solución como principales indicadores del proceso global de biooxidación. Las mediciones anteriores se realizaron en un espectrofotómetro GENESYS UV 10 usando el método colorimétrico de la orto-fenantrolina de acuerdo a la norma ASTM 3500-Fe B para el hierro y el método turbidimétrico según la norma ASTM D516-02 para los sulfatos. Los porcentajes de hierro y sulfatos precipitados fueron determinados al final de cada bioensayo. Para ello se emplearon digestiones ácidas usando soluciones 50 ml de HCl 4.8M y de 500 mg de mineral, calentadas durante 30 minutos a $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Carlson *et al.*, 1992).

Con las concentraciones de hierro y sulfatos estimadas al inicio y final de cada proceso, y haciendo uso de los valores de hierro y azufre obtenidos en la caracterización inicial (capítulo 2), se calcularon los porcentajes de hierro y sulfato total disuelto desde el mineral. El cálculo de estos

porcentajes se realizó a través de la ecuación 4.1, donde V es el volumen de trabajo, C_f la concentración final de hierro o sulfato en solución, C_i la concentración inicial de hierro o sulfatos en solución, F es la fracción de hierro o azufre total en el mineral, W la masa de mineral en el medio de cultivo, P el porcentaje de hierro o sulfatos precipitados.

$$\theta(\%) = \left(\frac{V(C_f - C_i)}{F W} \times 100 \right) + P \quad (4.1)$$

4.2.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se eligieron como variables respuesta el porcentaje de hierro total disuelto y el porcentaje de sulfato total disuelto, ya que dan cuenta del proceso global de biooxidación. Todos los datos fueron sometidos a pruebas de distribución y homogeneidad de varianzas (Shapiro-Wilk y Barlett test), con el fin de probar los supuestos del análisis de varianza (ANOVA), posteriormente se aplicó el ANOVA. Las diferencias significativas se analizaron a través de la prueba de comparación de medias Tukey. En el análisis estadístico no se incluyeron los blancos o controles abióticos. En todas las pruebas se asumió un nivel de significancia de 0.05. Todo el análisis fue realizado en el software de libre distribución R Project versión 2.15.2.

4.2.7 Determinación de parámetros hidrodinámicos y potencia

Se calcularon parámetros hidrodinámicos como el Número de Reynolds, encargado de definir el régimen de flujo dentro del reactor (Ecuación 4.2). Dónde: ρ es la densidad del medio, μ la viscosidad del medio, N_i la velocidad rotacional del impulsor en revoluciones por segundo (r.p.s) y D_i el diámetro del impulsor (Doran, 1998; Mc Cabe *et al.*, 2007).

$$Re = \frac{\rho N_i D_i^2}{\mu} \quad (4.2)$$

La escala de turbulencia o tamaño de los remolinos Eddy, relacionado con la intensidad de las fuerzas cortantes que se dan en el régimen turbulento sobre los microorganismos (Ecuación 4.3). Dónde: ν es la viscosidad cinemática y ε la velocidad de disipación de energía por unidad de masa (Deveci, 2002).

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (4.3)$$

El esfuerzo de corte, definido por Trujillo y Valdéz (2006) como la fuerza por unidad de área aplicada en forma paralela sobre cada célula o partícula biológica. Este parámetro se define matemáticamente mediante la ecuación 4.4 (Maranga *et. al.*, 2004, Arroyave, 2008).

$$\tau = \left(\frac{\varepsilon}{\nu}\right)^{1/2} \cdot \mu \quad (4.4)$$

En el cálculo de la velocidad de disipación de energía por unidad de masa (ε) se empleó la ecuación 4.5, donde N_p corresponde al número de potencia que a su vez depende del tipo de impulsor y el número de Reynolds (Mc.Cabe *et al.*, 2007).

$$\varepsilon = N_p N_i^3 D_i^2 \quad (4.5)$$

Para la cuantificación de los parámetros anteriores se realizaron mediciones de viscosidad y densidad al final de cada ensayo. La viscosidad fue determinada en el laboratorio de Crudos y Derivados de la Facultad de Minas, mediante un viscosímetro marca Fann modelo 35; cada medición requirió cerca de 500ml de muestra y fue realizada según el manual del equipo. La densidad fue determinada a través de un picnómetro de 25ml.

Finalmente se determinó el consumo de potencia para cada velocidad de agitación, mediante la ecuación 4.6 (Mc Cabe *et al.*, 2007; Gericke *et al.*, 2009).

$$P = N_p N_i^3 D_i^5 \rho \quad (4.6)$$

4.2.8 Determinación de coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) y consumo de oxígeno

Para las mediciones de oxígeno disuelto (OD) se empleó un potenciómetro Hach HQ 40d multi con una sonda luminiscente. Estas mediciones fueron realizadas de manera periódica (cada 48 h) en todos ensayos de biooxidación. El método seleccionado para la determinación de los $k_L a$ y las velocidades de consumo de oxígeno fue el método dinámico del cual se derivan las ecuaciones 4.7 y 4.8 (Doran, 1998; García y Gómez, 2009).

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) - q_0 X \quad (4.7)$$

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{C_{AL}^* - C_{AL1}}{C_{AL}^* - C_{AL2}}\right)}{(t_2 - t_1)} \quad (4.8)$$

Donde C_{AL} corresponde a la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido, C_{AL}^* a la concentración de equilibrio o solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo, k_{La} es el coeficiente de transferencia de oxígeno y q_0X la velocidad de consumo de oxígeno.

4.2.9 Caracterización mineralógica del residuo biooxidado

Al final de cada ensayo se realizó una caracterización mineralógica para determinar el grado de oxidación de las muestras a través de la aparición y posible desaparición de fases minerales, particularmente fases como la jarosita. En esta caracterización se utilizaron dos técnicas de análisis, Difracción de Rayos X (DRX) y Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR). Para los análisis por DRX las muestras fueron maceradas en mortero de ágata y pasadas por malla Tyler 200. Se prepararon probetas de aproximadamente 3g de muestra y se analizaron en un difractómetro marca Rigaku Miniflex II, usando una radiación de $CuK\alpha$ y monocromador de grafito, 30 kV voltaje y una corriente de 15 mA. Todos los difractogramas se realizaron bajo las mismas condiciones, modo paso a paso, con un tamaño de paso de 0.02° , tiempo por paso de 2 s y un ángulo de barrido de 2θ entre 3° y 70° . Los espectros se analizaron en el software X-Pert High Score Plus. Los análisis por FTIR requirieron la elaboración de pastillas con 1 mg de muestra y 100 mg de KBr. Las mediciones fueron realizadas en un espectroscopio Shimadzu 8400S, utilizando el modo Transmitancia(%), con apodización Happ-Genzel, 24 escaneos, una resolución de 4 cm^{-1} , en un intervalo de longitudes de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . Los resultados fueron analizados en el software IRSolution versión 1.3.0.

4.3 Resultados

4.3.1 Efecto de las diferentes velocidades de agitación y control de pH sobre las cinéticas del proceso de biooxidación

En la Figura 4-2 se aprecia el comportamiento del pH en los ensayos en los que no se controló. Inicialmente todas las curvas presentaron un incremento hasta valores cercanos a 2.0. Posteriormente y de acuerdo a la velocidad de agitación, se apreciaron caídas en el pH hasta valores de 1.68 con 300 r.p.m, 1.45 con 500 r.p.m y 1.35 con 700r.p.m. En los blancos el pH se tornó más alcalino dependiendo de la agitación, alcanzando valores por encima de 2.8 para 500 y 700 r.p.m y alrededor de 2.4 para 300 r.p.m.

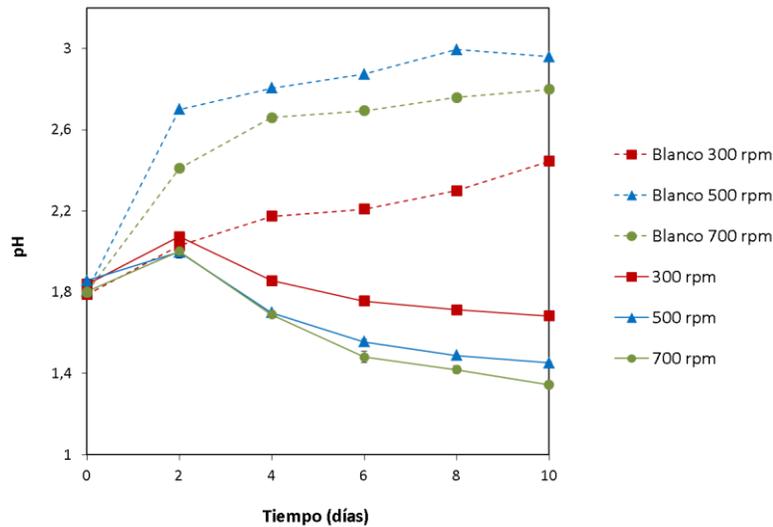


Figura 4-2: pH vs tiempo para diferentes velocidades de agitación sin control de pH.

Respecto al potencial de óxido reducción (Figura 4-3), no se observan diferencias significativas entre los ensayos con o sin control de pH, sin embargo, si se presentan ligeros incrementos al disminuir agitación, como ejemplo se citan los máximos potenciales promedio alcanzados en los ensayos sin control de pH, 580 mV con 300 r.p.m, 570mV con 500 r.p.m y de 557mV con 700 r.p.m. Los blancos no presentaron tendencias marcadas de acuerdo a los tratamientos aplicados

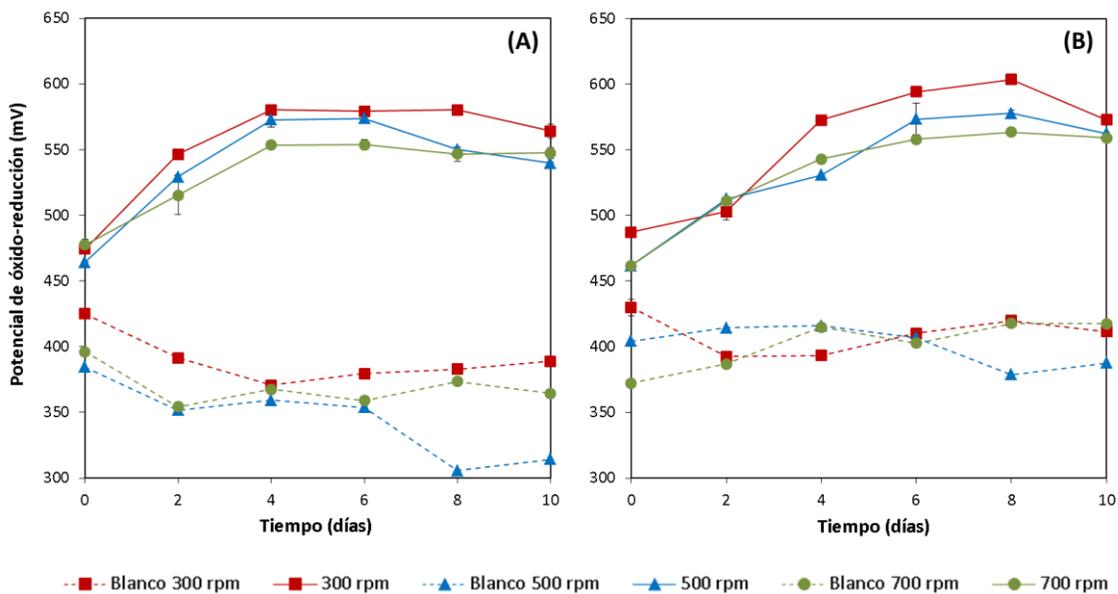


Figura 4-3: Potencial de óxido-reducción vs tiempo para diferentes velocidades de agitación. (A) Sin control de pH. (B) Con control de pH.

La Figura 4-4 presenta los logaritmos de las concentraciones celulares asociados a cada uno de los tratamientos. En todos los ensayos se observa una fase de aceleración durante las primeras 48 h, después de la cual comienza la fase exponencial. Al sexto día, aunque disminuye la velocidad de crecimiento, la concentración celular sigue aumentando levemente hasta el final, especialmente en los ensayos con control de pH. Respecto al efecto de la velocidad de agitación, se observó que la cantidad de bacterias es ligeramente menor en los ensayos agitados a 300 r.p.m, y dependiendo del factor control de pH fue mayor con 500 r.p.m o 700 r.p.m. La concentración celular alcanzada en todos los ensayos de biooxidación estuvo por el orden de 10^9 células/ml.

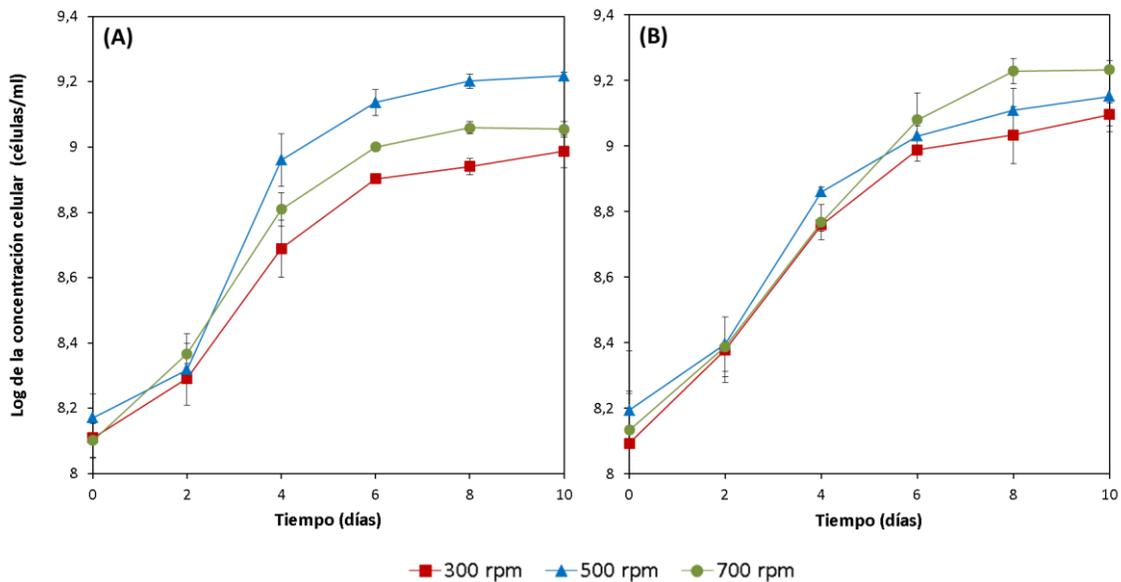


Figura 4-4: Logaritmo de la concentración celular vs tiempo para diferentes velocidades de agitación. (A) Sin control de pH. (B) Con control de pH.

En la Figura 4-5 se presenta las cinéticas relacionadas con el consumo de sustrato (Fe^{+2}) y generación de producto (Fe^{+3}) en los 12 tratamientos evaluados. En todas las cinéticas asociadas al consumo de sustrato, se observó una disminución inicial del ion ferroso, sin embargo a partir del cuarto día, la concentración aumento levemente en los ensayos sin control de pH, particularmente en los agitados a 700 r.p.m (Figura 4-5A), y se tornó constante en aquellos donde el pH fue controlado (Figura 4-5B). En estos últimos las cantidades de Fe^{+2} se mantuvieron entre 41.25 mg/L y 66.40 mg/L para los agitados a 300 r.p.m y 500 r.p.m, y alrededor de 115.62 mg/L en los que se usaron 700 r.p.m. Las concentraciones iniciales (día cero) estimadas de Fe^{+2} fueron en promedio 166.40 mg/L para los ensayos con 300 r.p.m, 228.25 mg/L con 500 r.p.m y 342.34 mg/L en 700 r.p.m.

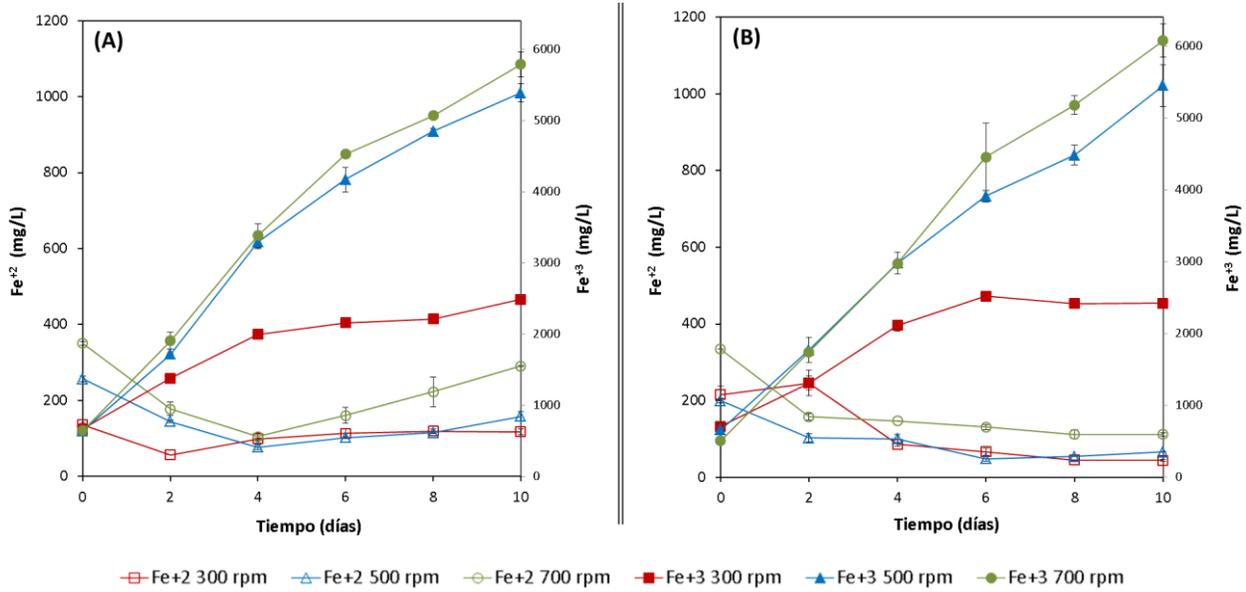


Figura 4-5: Concentración de Fe⁺² y Fe⁺³ en solución vs tiempo para diferentes velocidades de agitación. (A) Sin control de pH. (B) Con control de pH.

Las cinéticas de generación de Fe⁺³ (Figura 4-5) mostraron comportamientos ligeramente distintos en los ensayos con y sin control de pH, con incrementos no muy evidentes y/o notorios en los ensayos donde se controló. Estas diferencias también se apreciaron en las velocidades de generación de Fe⁺³ (Tabla 4-1), las cuales fueron más altas en los montajes con pH ajustado y particularmente en los agitados a 700 r.p.m.

Tabla 4-1: Velocidades de producción y concentraciones totales generadas de cada producto en los tratamientos evaluados.

Condiciones		Velocidad de generación (mg/L.h)			Concentración total en solución (mg/L)		
Agitación (r.p.m)	Control pH	Fe ⁺³	Fe total	SO ₄ ⁻²	Fe ⁺³	Fe total	SO ₄ ⁻²
300	-	7.60	7.52	25.14	1823.75	1805.31	6034.55
300	+	7.16	6.44	26.59	1717.81	1546.25	6382.11
500	-	19.80	19.38	82.60	4750.21	4651.46	19817.07
500	+	19.96	19.40	75.10	4790.73	4656.67	18023.37
700	-	21.44	20.98	70.60	5146.67	5034.18	16935.98
700	+	23.21	22.27	81.64	5569.69	5346.88	19593.50

Nota: - sin control de pH; + con control de pH. Las velocidades se estimaron como el promedio del cambio en concentración de cada uno de los productos cada 48 h. Se empleó este método ya que no todos los datos exhibieron tendencias lineales (Arroyave, 2008).

En la Tabla 4-1 se observa, que pese a las variaciones que generó el control de pH, las diferencias más importantes para el Fe^{+3} estuvieron determinadas por la velocidad de agitación, donde los ensayos agitados a 300 r.p.m generaron las más bajas cantidades de Fe^{+3} . Bajo las velocidades de 500 r.p.m y 700 r.p.m las concentraciones de Fe^{+3} fueron claramente más altas y no se observaron grandes diferencias en las tendencias de las curvas, sin embargo la cantidad de Fe^{+3} producido es ligeramente mayor en los ensayos agitados a 700 r.p.m. Consecuente con los resultados anteriores, los ensayos realizados a 500 r.p.m y 700 r.p.m presentaron las velocidades de producción de Fe^{+3} más altas, aproximadamente tres veces superiores a las velocidades de producción alcanzadas a 300 r.p.m.

En las Figuras 4-6 y 4-7 se presentan las cinéticas asociadas a la generación de Fe total en solución (que incluye el Fe^{+2} y el Fe^{+3}) y la generación de SO_4^{-2} en solución, ambos productos globales del proceso de biooxidación de sulfuros. Las cinéticas de Fe total (Figura 4-5) presentaron comportamientos muy similares a las cinéticas del Fe^{+3} , apreciándose nuevamente grandes variaciones en la cantidad y velocidad de generación Fe total con el cambio de la agitación desde 300 r.p.m hasta 500 r.p.m y 700 r.p.m (Tabla 4-1).

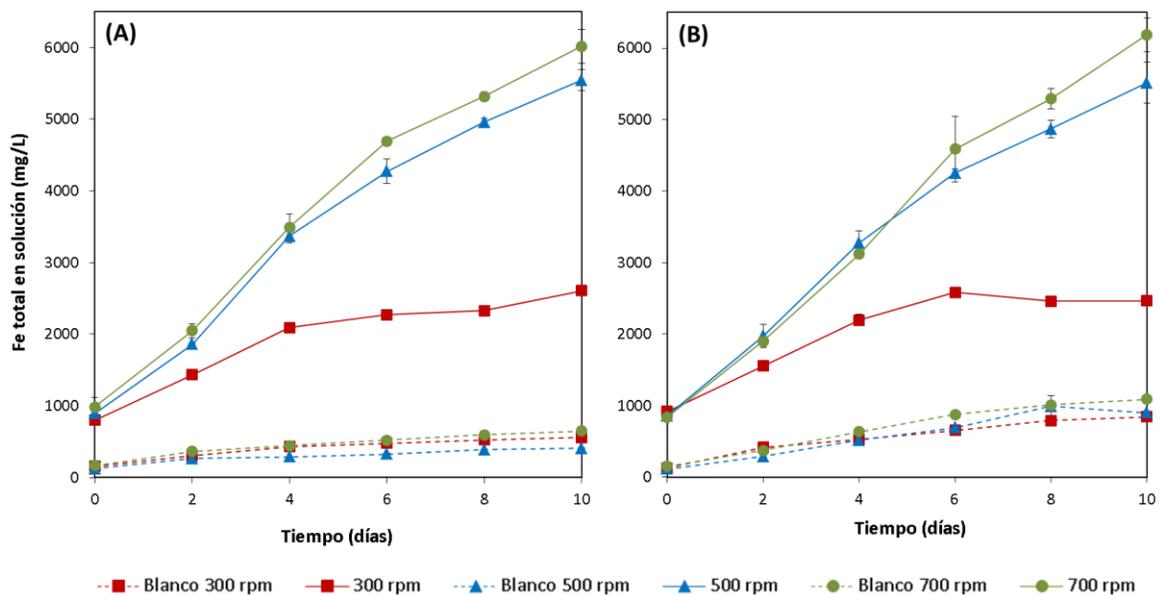


Figura 4-6: Concentración de hierro total en solución vs tiempo para diferentes velocidades de agitación. (A) Sin control de pH. (B) Con control de pH.

Las cinéticas de los sulfatos también mostraron diferencias marcadas por la agitación. Para este producto al igual que para el Fe total, las concentraciones fueron considerablemente bajas al

trabajar con 300 r.p.m (Tabla 4-1). Contrario a los resultados del Fe total, la concentración promedio de sulfatos fue ligeramente mayor en los sistemas agitados a 500 r.p.m (18920.22 mg/L) comparado con los de 700 r.p.m (18264.74 mg/L). Nuevamente, solo se aprecia un efecto del control de pH en los ensayos a 700 r.p.m, donde la velocidad de generación de este producto fue más alta en los ensayos con control. Las velocidades de disolución para los sulfatos (Tabla 4-1) tuvieron comportamientos comparables con las obtenidas para el hierro.

De manera general, la mayoría de las curvas asociadas a la generación de productos en los ensayos agitados a 500 r.p.m y 700 r.p.m (Figuras 4-5, 4-6 y 4-7), presentaron crecimientos exponenciales desde el primer día hasta el final del proceso. En los ensayos agitados a 300 r.p.m se presentó una tendencia exponencial durante las primeras 96 h, seguida de una fase estacionaria hasta el último día de biooxidación.

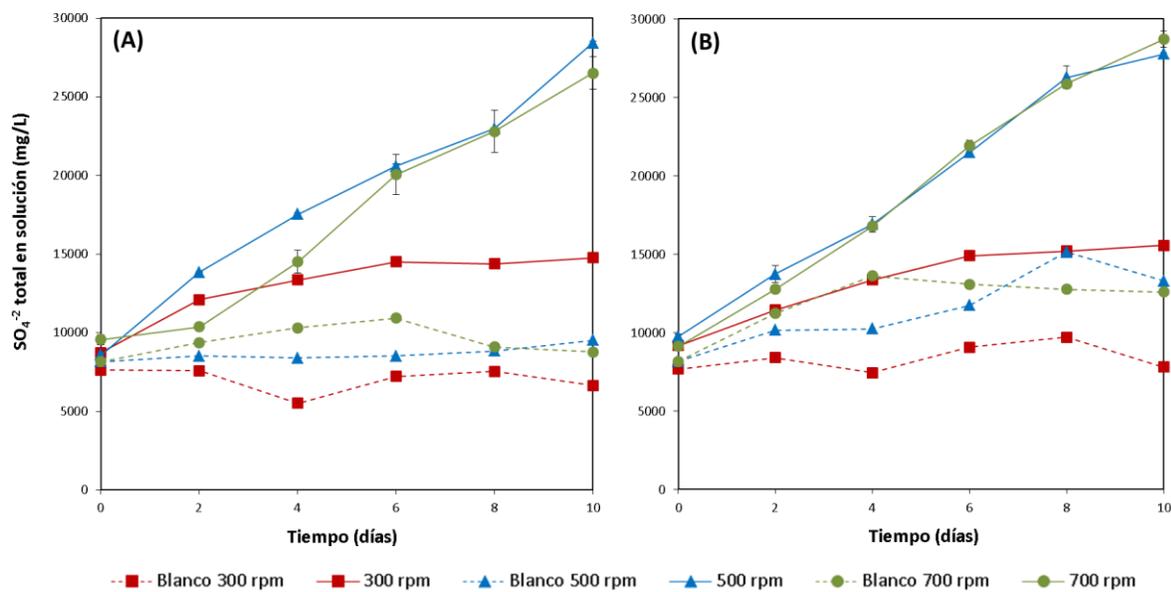


Figura 4-7: Concentración de sulfatos en solución vs tiempo para diferentes velocidades de agitación. (A) Sin control de pH. (B) Con control de pH.

Respecto a las gráficas de los blancos, se observó que el control de pH es quien tiene un efecto más influyente sobre su comportamiento (Figura 4-6). Como ejemplo, al controlar el pH y manteniendo una agitación de 300 r.p.m, la concentración de Fe total disuelto fue de 715 mg/L, mientras que en los ensayos en los que no se intervino el pH, la concentración solo llegó hasta 401.23 mg/L. De manera similar con 700 r.p.m controlando pH, se obtuvieron 938.12 mg/L y sin controlar 483.33 mg/L. En la Figura 4-7 las tendencias no son tan claras, sin embargo se aprecian pequeños

incrementos al aumentar la agitación y controlar el pH. La mayor parte del hierro solubilizado en los blancos se encontró con este estado de oxidación +2. Pese a todo lo anterior y como se espera para este tipo de montajes, los resultados de oxidación de los blancos no son comparables con resultados obtenidos para los ensayos con microorganismos, donde las concentraciones de Fe total y SO_4^{-2} disueltos fueron considerablemente más altas y la mayor parte del hierro en solución es Fe^{+3} .

4.3.2 Resultados estadísticos del diseño experimental.

Para determinar de manera concreta el efecto de los factores agitación y control de pH sobre la biooxidación a escala de laboratorio, se realizaron análisis de varianza (ANAVA) empleando como variables respuesta los porcentajes de hierro y sulfato total disuelto, variables que incluyen la suma de los productos presentes en solución y precipitados. Los valores obtenidos para estas variables a partir de la ecuación 4.1 se presentan en la Tabla 4-2. Los resultados de los controles abióticos no fueron incluidos en el análisis estadístico.

Tabla 4.2: Porcentajes de hierro y sulfato total disuelto en los 18 ensayos evaluados.

Tratamiento	Condiciones		Hierro total disuelto (%)	Sulfato total disuelto (%)
	Agitación (r.p.m)	Control pH		
1	500	+	20.27	24.40
2	500	-	21.45	25.22
3	700	-	20.71	24.53
4	700	+	23.27	24.74
5	300	+	8.60	9.80
6	300	-	9.10	10.50
7	500	+	22.12	23.21
8	500	-	20.39	24.88
9	300	-	9.05	9,00
10	300	+	7.65	9.15
11	700	+	23.35	23.43
12	700	-	24.56	23,16
	300	-	3.34	0
	300	+	3.62	1.16
Controles abióticos	500	-	2.24	2.85
	500	+	5.08	7.07
	700	-	3.44	1.97
	700	+	4.42	6.29

- **Variable respuesta: porcentaje de hierro total disuelto.** Una vez se probaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas para los datos correspondientes al

porcentaje de hierro total disuelto (valores p: 0,876 y 0,3346), se procedió con el análisis de varianza. Los valores p del ANAVA se presentan en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Valores p asociados al ANAVA para porcentaje de hierro total disuelto

	Valor p	
Agitación	8.41e-06	Significativo
pH	0.995	No significativo
Agitación:pH	0.673	No significativo

Nivel de significancia: $\alpha=0.05$

De acuerdo a los valores p, no se presenta interacción significativa entre los factores agitación y pH, y tampoco existen diferencias significativas en los promedios de porcentaje de hierro disuelto con o sin control de pH (Figura 4-8A). Para el factor agitación si se presentaron diferencias significativas entre los porcentajes de hierro obtenidos a través de las tres velocidades de agitación. La evaluación de los efectos principales mediante la prueba de Tukey, mostró que los tres niveles de agitación se dividen en dos grupos, un grupo “a” correspondiente a 300r.p.m, y un grupo “b” en el que se encuentran 500r.p.m y 700r.p.m, es decir que con estas dos últimas velocidades de agitación la cantidad de hierro solubilizado desde los minerales es estadísticamente similar (Figura 4-8B).

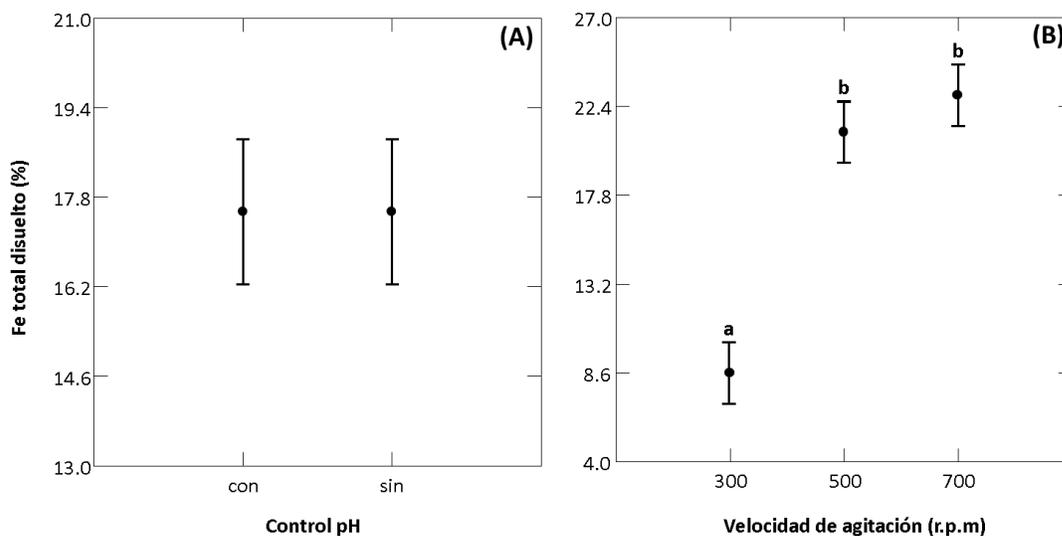


Figura 4-8: Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de hierro total disuelto con intervalos de confianza del 95%. (A) Bajo dos condiciones de control de pH. (B) Bajo diferentes niveles de agitación. Las letras minúsculas en la Figura 4-8B indican las diferencias entre las velocidades de agitación de acuerdo a la prueba de Tukey.

- **Variable respuesta: porcentaje de sulfato total disuelto.** Los datos asociados a la variable porcentaje de sulfato total disuelto, también cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas (valores p: 0,071 y 0,924). Adicionalmente el ANAVA entregó los valores p que se presentan en la Tabla 4-4.

Tabla 4-4: Valores p asociados al ANAVA para porcentaje de sulfato total disuelto

	Valor p	
Agitación	3.17e-7	Significativo
pH	0.395	No significativo
Agitación:pH	0.464	No significativo

Nivel de significancia: $\alpha=0.05$

Para la variable porcentaje de sulfato total disuelto, tampoco se obtuvo una interacción significativa entre los dos factores evaluados, y no se encontraron diferencias entre los promedios de sulfato al controlar o no el pH del medio (Figura 4-9A). Igual que para la variable porcentaje de hierro, se hallaron diferencias entre la cantidad de sulfatos solubilizados a través de las diferentes velocidades de agitación, donde el porcentaje de sulfato obtenido con 300 r.p.m fue considerablemente menor al logrado con 500 r.p.m y 700 r.p.m (Figura 4-9B). El análisis de diferencias de medias de Tukey para esta variable, agrupó las velocidades de agitación de la misma manera que lo hizo para el hierro.

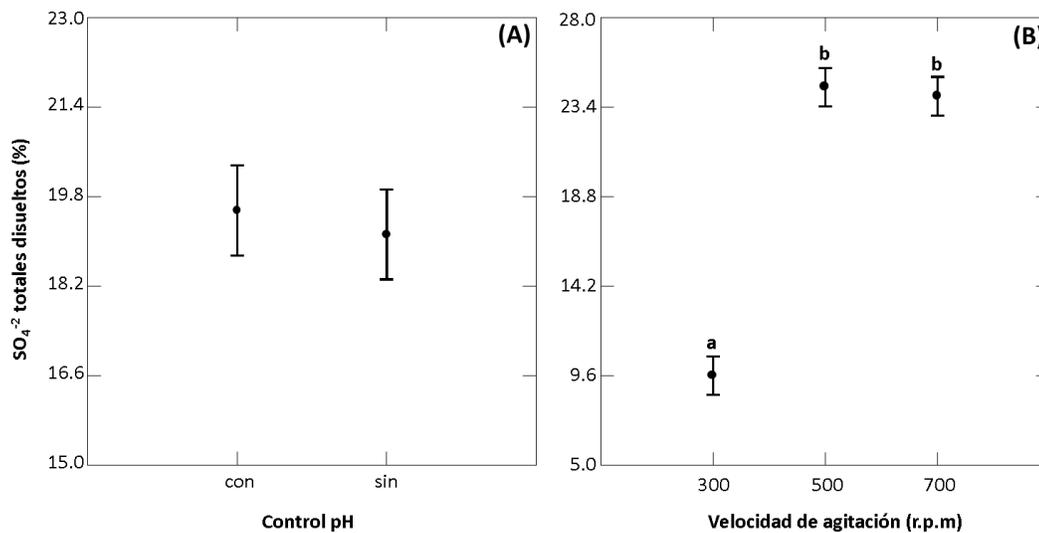


Figura 4-9: Medias por Mínimos Cuadrados para el porcentaje de sulfato total disuelto con intervalos de confianza del 95%. (A) Bajo dos condiciones de control de pH. (B) Bajo diferentes niveles de agitación. Las letras minúsculas en la Figura 4-9B indican las diferencias entre las velocidades de agitación de acuerdo a la prueba de Tukey.

Luego de evaluar el efecto de los factores agitación y control de pH sobre un proceso de biooxidación a escala de laboratorio, se ajustaron dos modelos, uno por cada variable respuesta, a los datos experimentales. Para la selección de estos se evaluaron modelos lineales y cuadráticos incluyendo como variables independientes la velocidad de agitación y el control de pH. Respecto a la variable control de pH, se encontró que no tiene un efecto significativo dentro de cada modelo, por lo que se excluyó. Los modelos que mejor se ajustaron a cada conjunto de datos corresponden a las ecuaciones 4.9 y 4.10.

$$\%Fe \text{ total disuelto} = -1.318 \times 10^{-4} \cdot \text{Agitación}^2 + 0.1678 \cdot \text{Agitación} - 29.870 \quad (4.9)$$

Tabla 4-5: Nivel de significancia estadística de los coeficientes estimados en el modelo para el porcentaje de hierro total disuelto

	Coficiente estimado	Valor p	
Intercepto	-29.870	3.93e-5	Significativo
Agitación	0.168	4.98e-6	Significativo
Agitación ²	-1.318e-4	3.32e-5	Significativo

Nivel de significancia: $\alpha=0.05$; R^2 ajustado: 0.9717

$$\%SO_4^{-2} \text{ totales disuelto} = -1.911 \times 10^{-4} \cdot \text{Agitación}^2 + 0.2270 \cdot \text{Agitación} - 41.29 \quad (4.10)$$

Tabla 4.6: Nivel de significancia estadística de los coeficientes estimados en el modelo para el porcentaje de sulfato total disuelto

	Coficiente estimado	Valor p	
Intercepto	-41.290	1.26e-7	Significativo
Agitación	0.227	1.63e-6	Significativo
Agitación ²	-1.911e-4	6.95e-5	Significativo

Nivel de significancia: $\alpha=0.05$; R^2 ajustado: 0.9881

A continuación se presentan las gráficas de contorno para los porcentajes de hierro y sulfato total disuelto, en estas se observa el efecto de la variación en la velocidad de agitación sobre la cantidad de iones solubilizados según los modelos estimados (Figura 4-10). Con base en las gráficas de contorno se puede hablar de un intervalo adecuado de agitación entre 500-700 r.p.m para una buena solubilización de hierro y sulfatos, corroborando los resultados de los análisis de varianzas y prueba de diferencia de medias.

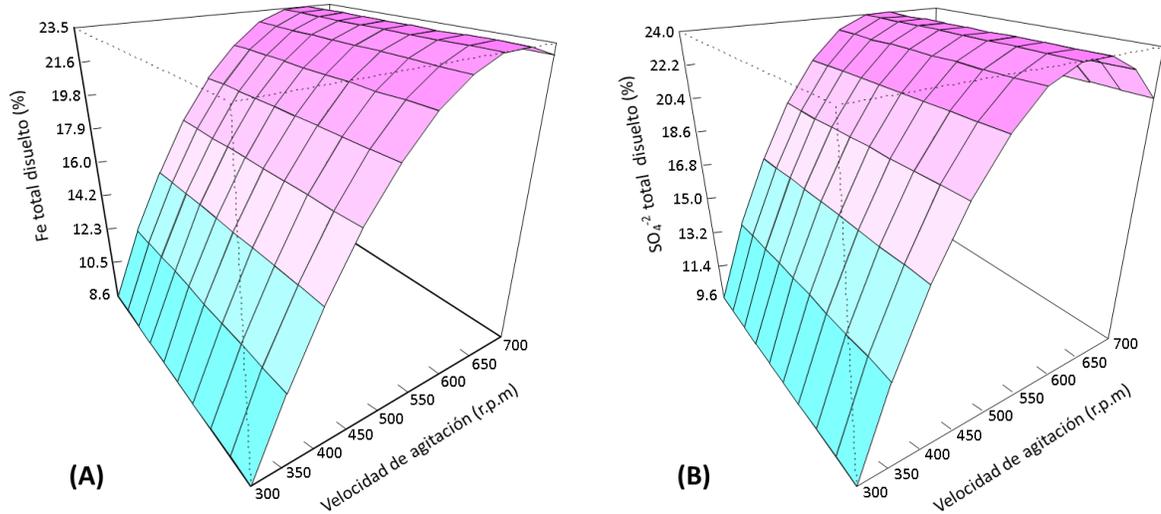


Figura 4-10: Gráficas de contorno. (A) Porcentaje de hierro total disuelto en función de la agitación. (B) Porcentaje de sulfato total disuelto en función de la agitación.

En general, los resultados de los análisis estadísticos confirmaron lo que previamente se describió en las cinéticas del proceso, la baja influencia del control del pH y el efecto significativo de la agitación sobre la biooxidación de los residuos mineros en reactores de tanque agitado de 5L.

4.3.3 Parámetros hidrodinámicos y potencia

Los resultados relacionados con la hidrodinámica del proceso se resumen en la Tabla 4-7. En esta tabla se aprecian las relaciones entre los diferentes parámetros calculados respecto a los tratamientos aplicados. Para dichos cálculos se empleó un número de potencia (N_p) igual a 1.63, correspondiente a impulsores de palas planas inclinadas 45° (Mc Cabe, *et al.*, 2007). Se encontró que las suspensiones consisten en un fluido Bingham, es decir, solo se produce movimiento hasta que se aplica alguna tensión de valor finito (Doran, 1998). Debido al tipo de fluido, la viscosidad determinada para cada ensayo corresponde a una viscosidad aparente calculada a partir de la ecuación (4.11), donde K_p es el índice de consistencia, γ la velocidad de cizalla y τ_o es la tensión.

$$\mu_a = \frac{\tau_o}{\gamma} + K_p \quad (4.11)$$

En el caso de la densidad, se observó un incremento directo con la velocidad de agitación, donde 300 r.p.m, 500 r.p.m y 700 r.p.m obtuvieron densidades promedio de $1021,88 \text{ Kg/m}^3$, 1043.7 Kg/m^3 y $1076,25 \text{ Kg/m}^3$ respectivamente.

Tabla 4-7: Parámetros hidrodinámicos determinados para los diferentes tratamientos

Condiciones		Densidad	Viscosidad	Re	ϵ (W/kg)	λ (μm)	τ (N/m^2)
Agitación (r.p.m)	Control pH	ρ (Kg/m^3)	μ_a (Pa.s)				
300	-	1021.81	2.09E-03	15679	1.30	50.53	1.67
300	+	1021.96	2.51E-03	13055	1.30	58.04	1.83
500	-	1042.04	2.50E-03	22298	6.04	38.82	3.96
500	+	1045.37	2.88E-03	19370	6.04	43.14	4.27
700	-	1074.54	2.85E-03	28215	16.57	32.55	7.12
700	+	1077.97	3.19E-03	25253	16.57	35.35	7.55

Respecto a los valores de viscosidad, además de la relación creciente con la velocidad de agitación también se observó el efecto del control de pH, donde las viscosidades más altas se alcanzaron en los ensayos con pH controlado, como ejemplo se cita el cambio en los valores promedio de este parámetro para los ensayos agitados a 500 r.p.m con y sin control de pH, 2.88×10^{-3} Pa.s y 2.50×10^{-3} Pa.s.

Igual que la densidad y la viscosidad, el número de Reynolds (Re) aumentó con la velocidad de agitación, sin embargo y contrario a la viscosidad, el no control del pH contribuyó en el incremento de los valores de Re. En los montajes con 500 r.p.m sin control de pH, el Re promedio fue de 22298 y en los que se controló fue 19370. El número de Reynolds para cada uno de los ensayos estuvo por encima de 10000. Durante los ensayos de biooxidación se observó que aquellos agitados a 300 r.p.m presentaron una baja suspensión de la fase sólida, lo que ocasionó que una gran cantidad de mineral permaneciera sedimentada en el fondo de los reactores. Con 500 r.p.m y 700 r.p.m también se apreció sedimentación de mineral pero en menores proporciones. En el Anexo se presentan imágenes de la dispersión de aire y suspensión de sólidos bajo las diferentes velocidades de agitación evaluadas (Figura A-3).

Respecto al tamaño de los eddys (λ) se observó una relación decreciente con la velocidad de agitación, donde los valores promedio fueron $54.29 \mu\text{m}$ con 300 r.p.m, $40.98 \mu\text{m}$ con 500 r.p.m, $33.95 \mu\text{m}$ con 700 r.p.m. Para el esfuerzo cortante (τ) el efecto fue directamente proporcional a la velocidad de agitación, es decir, a velocidades más altas, mayores esfuerzos.

El cálculo de potencia arrojó un consumo promedio de 0.683 W, 3.226 W y 9.128 W para las velocidades de agitación de 300 r.p.m, 500 r.p.m y 700 r.p.m respectivamente.

4.3.4 Coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) y consumo de oxígeno

En la Figura 4-11 se presentan a manera de ilustración, el perfil de concentración de oxígeno disuelto (OD), la evolución en la velocidad de consumo de oxígeno y la variación en el OD, determinados para el tratamiento 500 r.p.m sin control de pH.

En la Figura 4-11A, se puede observar que la concentración de inicial de oxígeno es de 5.3 mg/L. Luego de suspender el suministro de aire (punto **a**) se presentó una disminución del OD (tramo **a-b**) hasta una concentración mínima de 0.8 mg/L, en un periodo de 5 min 40 s. Los datos del tramo **a-b** en el perfil se emplearon para el cálculo de la velocidad de consumo de oxígeno. Al reconectar el aire, el nivel de oxígeno subió nuevamente hasta su concentración de saturación, proceso que tomó alrededor de 4 min (puntos **b-c**). Con esta parte de la gráfica (**b-c**) se estimó el coeficiente de transferencia de masa o $k_L a$. Comportamientos similares se presentaron en los perfiles de todos los tratamientos evaluados, no obstante, las variaciones entre dichos tratamientos se marcaron en las magnitudes de las velocidades de consumo de oxígeno y los coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) (Tabla 3).

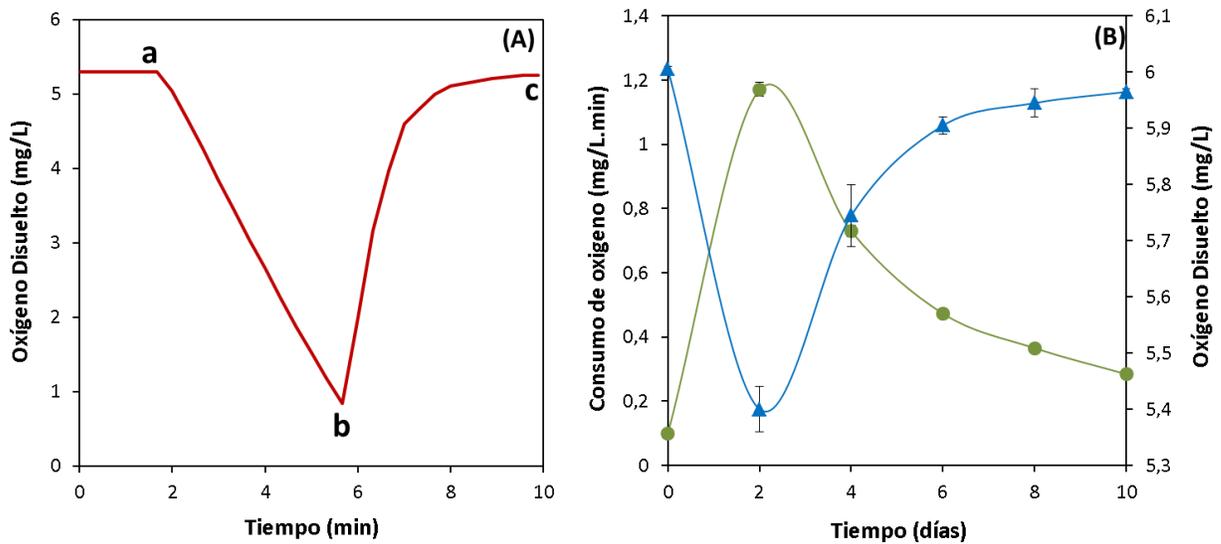


Figura 4-11: Concentración y consumo de oxígeno para un proceso de biooxidación agitado a 500 r.p.m sin control de pH. (A) Perfil de concentración de OD para determinación de $k_L a$ por el método dinámico. (B) Consumo de oxígeno y OD a través del proceso. ● Velocidad de consumo de oxígeno, ▲ Concentración de OD.

La Figura 4-11B, que describe simultáneamente la evolución en la velocidad de consumo de oxígeno y la concentración de oxígeno disuelto durante todo el proceso de biooxidación, muestra

una relación inversamente proporcional entre estos dos parámetros, es decir, cuando la velocidad de consumo es máxima, la concentración de OD decae a su punto mínimo. En general se encontró que dependiendo del día de proceso, el consumo de oxígeno y el OD varía dentro de un mismo ensayo, donde el consumo máximo se observó durante el segundo día, y los consumos más bajos se dan en el primer día y último día. Estas cinéticas para el oxígeno presentaron el mismo comportamiento en todos los tratamientos.

Haciendo un recorrido por la Tabla 4-8, que resume los datos más importantes respecto al comportamiento del oxígeno en todos los ensayos. Se puede observar que el coeficiente de transferencia de masa (k_{La}) crece de manera directa con la velocidad de agitación y parece no ser influenciado por factor control de pH, como ejemplo los k_{La} promedio son 0.67 min^{-1} , 1.63 min^{-1} , 2.86 min^{-1} para a las velocidades de agitación 300 r.p.m, 500 r.p.m, y 700 r.p.m respectivamente. Los valores de concentración mínima de OD presentaron una relación creciente con la velocidad de agitación y en todos los tratamientos siempre estuvieron por encima de 5 mg/L. La velocidad máxima de consumo de oxígeno no presentó tendencias crecientes o decrecientes con la agitación, sin embargo el máximo consumo se obtuvo en los ensayos realizados bajo 500 r.p.m (1.01 mg/L.h en promedio)

Tabla 4-8: Coeficiente de transferencia de masa (k_{La}), concentración mínima de OD y consumo máximo de oxígeno en los diferentes tratamientos

Condiciones		k_{La} (min^{-1})	Concentración mínima de OD (mg/L)	Consumo máximo de oxígeno (mg/L.min)
Agitación (r.p.m)	Control pH			
300	-	0.70	5.27	0.60
300	+	0.63	5.09	0.44
500	-	1.56	5.40	1.17
500	+	1.70	5.63	0.84
700	-	2.80	5.95	0.72
700	+	2.92	5.87	0.60

4.3.5 Caracterización mineralógica del proceso de biooxidación

Las Figuras 4-12 y 4-13 corresponden a los resultados obtenidos por difracción de rayos X (DRX). En la Figura 4-12 se presenta a manera de ilustración, los difractogramas obtenidos para los ensayos agitados a 500 r.p.m. Entre los blancos y los ensayos con *A. ferrooxidans* se aprecia una

diferencia importante, la aparición de una nueva fase en el mineral tratado con bacterias, dicha fase fue catalogada como jarosita, un hidrosulfato de hierro ($KFe_3^{3+}(SO_4)_2(OH)_6$). Este mismo resultado se apreció en los ensayos bajo 300 r.p.m y 700 r.p.m. Adicionalmente en todos los tratamientos, incluidos los blancos, se encontró un pico extra (11.65°) no observado en la caracterización inicial del mineral (capítulo 2), y que coincide con el mineral brushita ($Ca(PO_3OH)\cdot 2H_2O$). Otra diferencia importante entre controles abióticos y ensayos con microorganismos, es la caída en la intensidad de los picos de pirita en las muestras biooxidadas (Figura 4-13), particularmente el ubicado a 33° . Esta última diferencia fue más significativa en los ensayos realizados a 500 y 700 r.p.m.

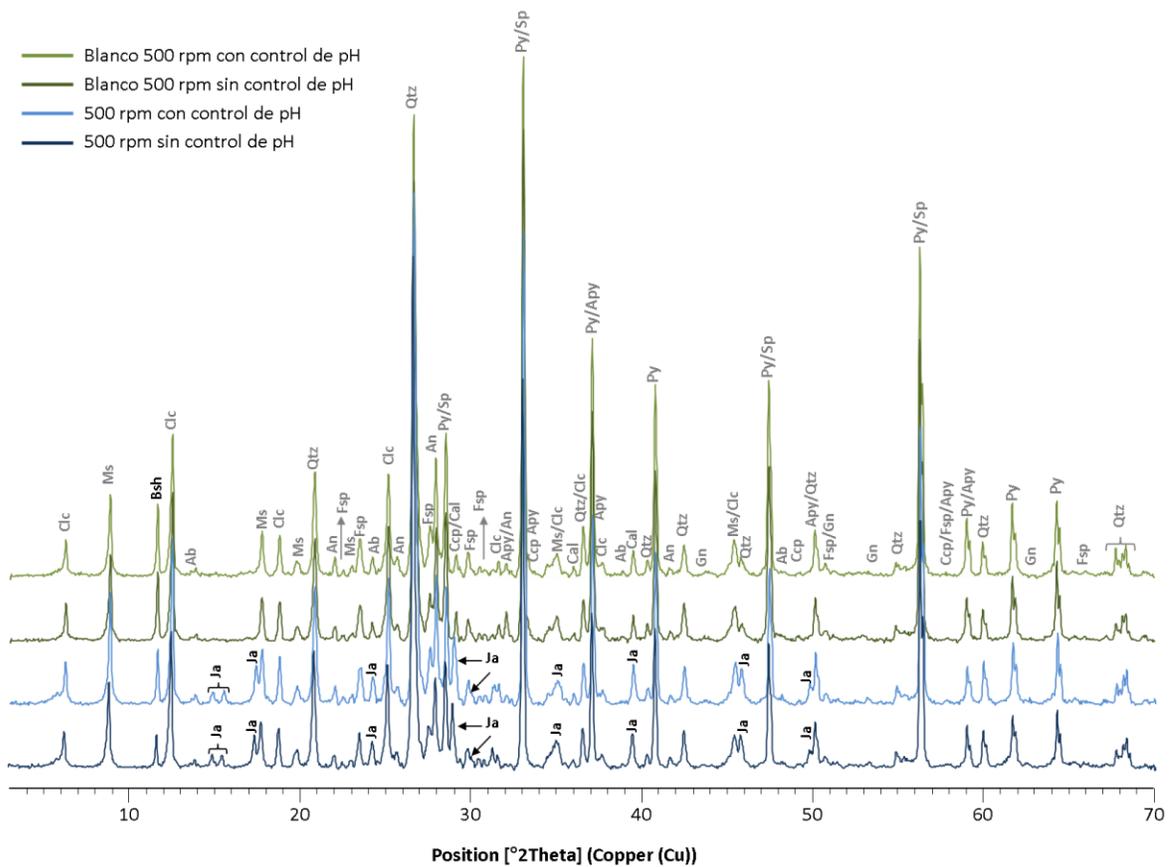


Figura 4-12: Difractogramas para los ensayos realizados con una agitación 500 r.p.m con y sin control de pH. Nomenclatura de fases minerales: albita (Ab), anortita (An), arsenopirita (Apy), calcita (Cal), calcopirita (Ccp), clinocloro (Clc), cuarzo (Qtz), brushita (Bsh), esfalerita (Sp), feldespato (Fsp), galena (Gn), jarosita (Ja), moscovita (Ms), pirita (Py).

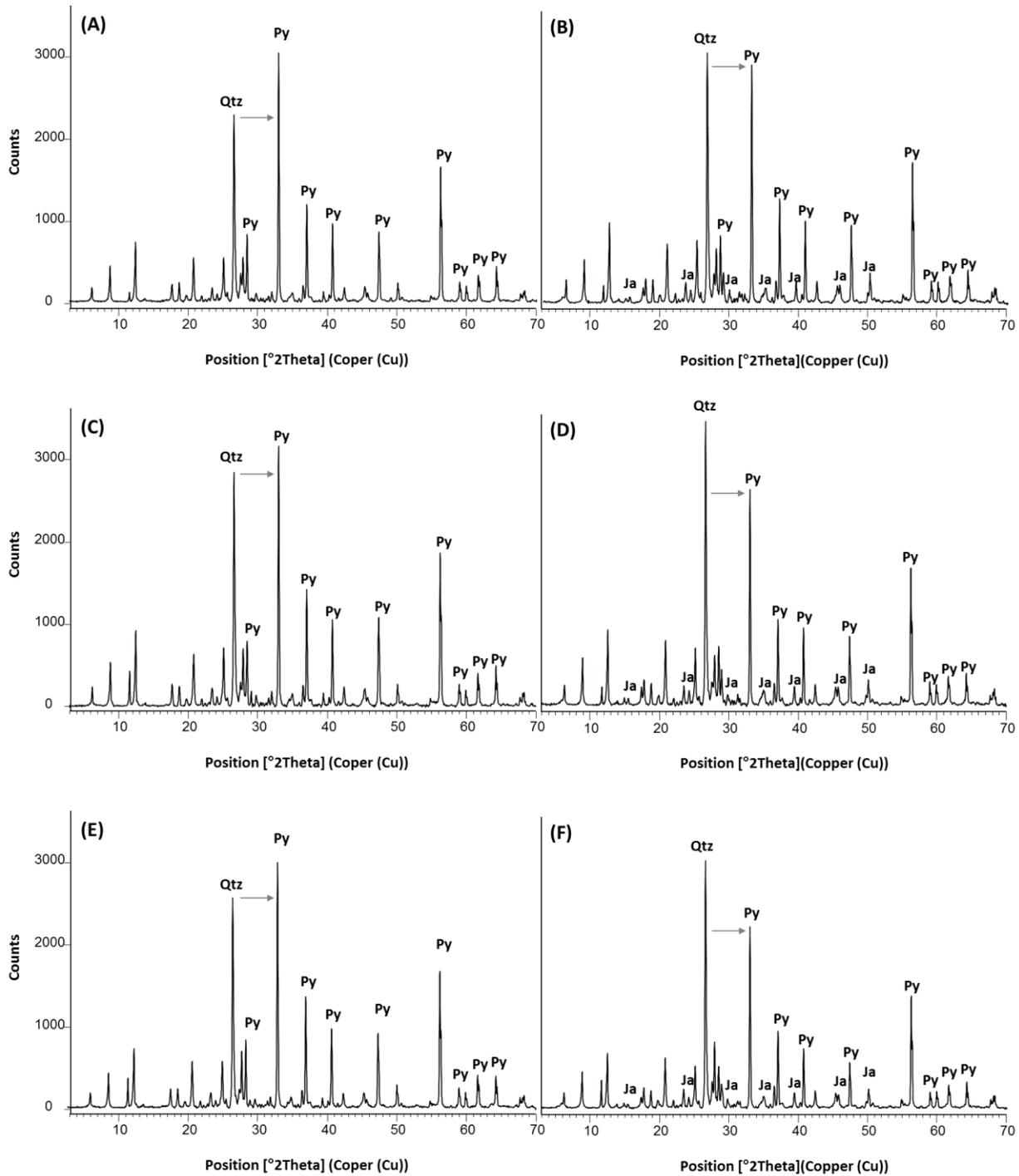


Figura 4-13: Difractogramas para los ensayos realizados sin control de pH. (A) Control abiótico 300 r.p.m. (B) Muestra biooxidada 300 r.p.m. (C) Control abiótico 500 r.p.m. (D) Muestra biooxidada 500 r.p.m. (E) Control abiótico 700 r.p.m. (F) Muestra biooxidada 700 r.p.m. Jarosita (Ja), pirita (Py), cuarzo (Qtz).

En la Tabla 4-9 se presentan las proporciones relativas de la pirita, otros sulfuros, la ganga y las fases formadas durante los montajes en los reactores de 5L. Se determinó que la cantidad de pirita en los bioensayos a 300 r.p.m se redujo entre 8.61% y 15.05%, entre 24.13 % y 26.77% con 500 r.p.m, y 28.82% y 30.87% con 700 r.p.m, para estos cálculos se tomó como referencia la cantidad de pirita en la muestra sin tratar. En general el porcentaje de pirita en los controles abióticos siempre fue superior al de los ensayos con *A. ferrooxidans*. Se presentaron ligeros aumentos en la concentración de ganga de los ensayos inoculados respecto a los blancos. La cantidad de jarosita fue mayor en las muestras biooxidadas, con porcentajes que oscilaron entre 4.2 y 6.5 % comparado con 0.5 y 1.3 % de los blancos. El porcentaje de brushita fue levemente superior en los controles abióticos. Finalmente las concentraciones inherentes a otros sulfuros presentaron comportamientos muy variables e inconsistentes lo cual hizo difícil encontrar una relación con los tratamientos aplicados (Tabla 4-10).

Tabla 4-9: Proporciones relativas de minerales y fases formadas determinadas a partir de DRX

Condición		Ganga (%)	Sulfuros (%)		Precipitados (%)	
Agitación (r.p.m)	Control de pH		Pirita	Otros	Jarosita	Brushita
Blanco 300	-	61.6	32.3	2.1	0.5	3.8
300	-	62.4	29.0	1.1	4.7	2.9
Blanco 300	+	60.6	35.6	0.6	0.7	2.3
300	+	59.4	31.2	1.10	4.6	3.8
Blanco 500	-	56.1	32.7	3.9	1.3	7.4
500	-	64.0	25.0	2.7	5.9	2.5
Blanco 500	+	57.4	34.4	1.2	1.1	5.9
500	+	63.0	25.9	1.1	6.3	3.7
Blanco 700	-	56.7	35.6	0.8	0.2	6.9
700	-	66.8	24.3	1.0	5.8	2.2
Blanco 700	+	61.3	32.2	2.2	0.5	3.8
700	+	63.8	23.6	3.9	4.5	4.1

Tabla 4-10: Proporciones relativas de otros sulfuros determinadas a partir de DRX

Condición		Concentraciones otros sulfuros (%)			
		Arsenopirita	Calcopirita	Esfalerita	Galena
Agitación (r.p.m)	Control de pH				
Blanco 300	-	0.4	0.7	1.0	0.0
300	-	0.8	0.1	0.0	0.2
Blanco 300	+	0.2	0.4	0.0	0.0
300	+	0.5	0.1	0.3	0.3
Blanco 500	-	0.1	3.8	0.0	0.0
500	-	1.6	0.0	1.1	0.1
Blanco 500	+	0.1	1.0	0.1	0.0
500	+	0.9	0.2	0.0	0.1
Blanco 700	-	0.1	0.2	0.5	0.0
700	-	1.0	0.0	0.1	0.0
Blanco 700	+	0.3	1.3	0.6	0.0
700	+	0.1	3.3	0.1	0.4

En la Figura 4-14 se presentan como ejemplo los espectros obtenidos a través de espectrofotometría infrarroja (FTIR) de las muestras biooxidadas a 500 r.p.m. En esta figura no se apreciaron diferencias importantes entre los espectros de los blancos, y tampoco entre las muestras tratadas biológicamente con y sin control de pH. En todos los espectros se presentó una banda en 3624 cm^{-1} asociada al estiramiento del grupo OH^- de la moscovita y otras en 1020 cm^{-1} , 906 cm^{-1} , 525 cm^{-1} y 474 cm^{-1} posiblemente también de moscovita (Márquez, 1999; Chukanov, 2014); En 797 cm^{-1} se apreció una banda asociada al cuarzo, y otras representativas de la de pirita en 693 cm^{-1} y 1013 cm^{-1} . Las bandas observadas en 3397 cm^{-1} y 1632 cm^{-1} son conferidas a los estiramientos y deformaciones del H_2O (Márquez, 1999). A diferencia de los blancos, el mineral biooxidado presentó una pequeña banda alrededor de 1195 cm^{-1} , y otras un poco más intensas en 1085 cm^{-1} y 628 cm^{-1} ; 1195 cm^{-1} y 1085 cm^{-1} corresponden al modo vibracional ν_3 de la jarosita, 628 cm^{-1} al modo vibracional ν_4 igualmente de la jarosita. (Addler y Kerr, 1965; Sasaki, 1997; Ospina, 2010). Para las agitaciones de 300 r.p.m y 700 r.p.m los resultados entre controles y mineral biooxidado con y sin control de pH fueron idénticos.

Tal como sucedió con el factor pH, los espectros obtenidos para los minerales biooxidados a distintas velocidades de agitación (Figura 4-15), no presentaron diferencias en la ubicación, intensidad y cantidad de las bandas.

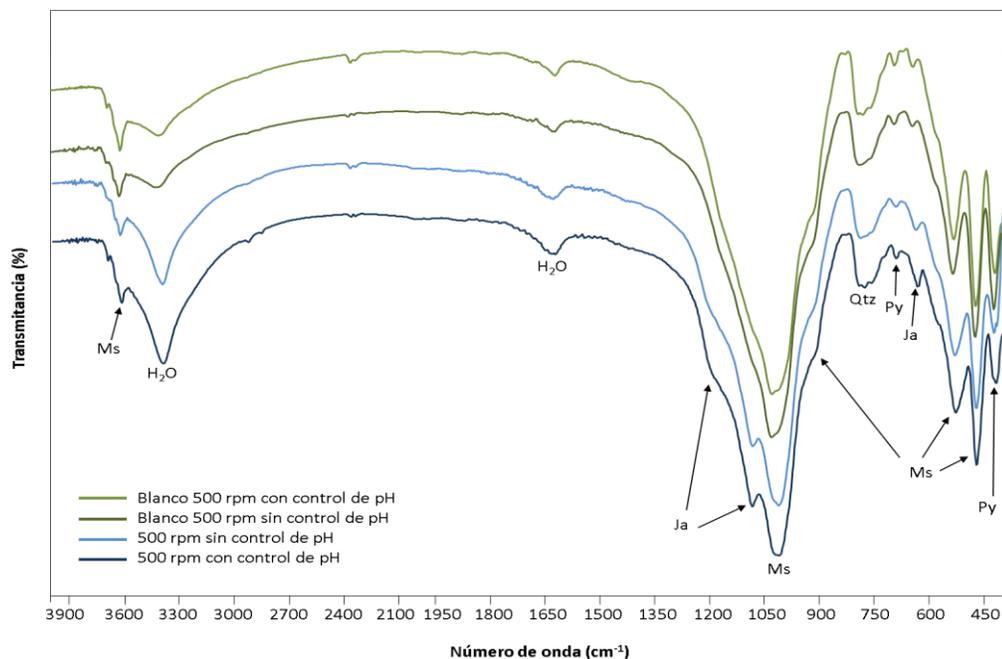


Figura 4-14: Espectros de FTIR para los ensayos realizados a 500 r.p.m. Cuarzo (Qtz), jarosita (Ja), moscovita (Ms), pirita (Py).

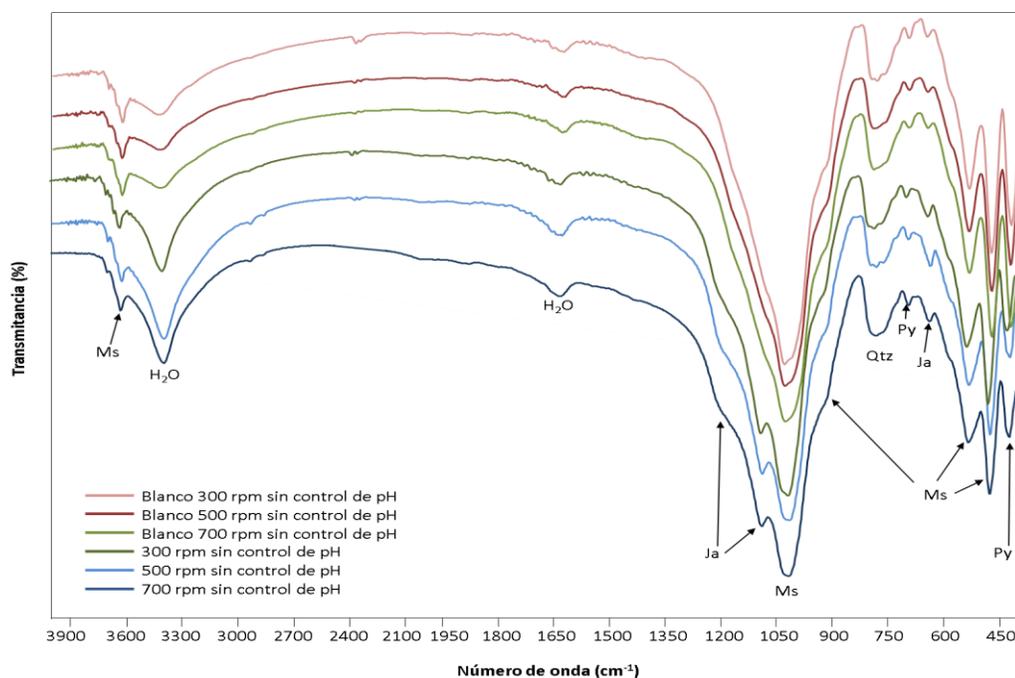


Figura 4-15: Espectros de FTIR para los ensayos de biooxidación realizados a diferentes velocidades de agitación sin control de pH. Cuarzo (Qtz), jarosita (Ja), moscovita (Ms), pirita (Py).

4.4 Discusión

4.4.1 Efecto de diferentes velocidades de agitación y control de pH sobre las cinéticas del proceso de biooxidación

En el presente estudio se evaluó el efecto conjunto de la velocidad de agitación y la influencia del control de pH sobre un proceso de biooxidación de residuos mineros en reactores de tanque agitado. De manera consistente todos los tratamientos presentaron incrementos progresivos en los valores del potencial redox, concentración celular, Fe^{+3} , Fe total y sulfatos en solución. Adicionalmente en los ensayos donde el pH no fue controlado se dio un aumento inicial seguido de una disminución gradual. Este tipo de comportamientos han sido ampliamente observados y documentados para los sistemas de oxidación biológica de sulfuros, particularmente aquellos ricos en pirita (Rodríguez *et al.*, 2003; Zapata, 2006; Lin *et al.*, 2008; Arroyave, 2008).

Tomando como base los resultados de los controles abióticos en los que el pH creció significativamente, se considera que el aumento inicial de pH en los ensayos con microorganismos (Figura 4-2), fue ocasionado por el consumo de ácido asociado a la presencia de los minerales silicatados, carbonatos y monosulfuros presentes en el residuo de La Maruja (García *et al.*, 1995; Stromberg y Banwart, 1999; Da Silva, 2004; Sampson *et al.*, 2005; Ballester, 2005; Carretero *et al.*, 2011). Adicional a lo anterior, la caída inicial en la concentración de F^{+2} inherente a la actividad metabólica *A. ferrooxidans*, también sugiere un consumo del ion H^+ durante las primeras 48 h, (Sand *et al.*, 2001; Mason y Rice, 2002; Gómez y Cantero, 2005). El posterior decrecimiento del pH en estos ensayos inoculados se atribuye a la disolución de la pirita, la cual durante su oxidación genera ácido sulfúrico como subproducto (Dew *et al.*, 1997; Schippers *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2008).

De acuerdo a los bajos pH alcanzados en los ensayos a 500 r.p.m (pH =1.45) y 700 r.p.m (pH= 1.35), es posible afirmar que la solubilización de la pirita en estos dos tratamientos fue más eficiente. Desde el punto de vista mineralógico, caídas del pH como las observadas durante los tratamientos en mención, benefician el proceso de biooxidación evitando la formación excesiva de jarosita, un precipitado que se acumula en la superficie del mineral interfiriendo con la oxidación de los sulfuros (Amaro *et al.*, 1991; Gómez y cantero, 2005; Rivadeneira, 2011). A nivel biológico, caídas pronunciadas en los valores del pH pueden ocasionar un decrecimiento en la actividad de *A. ferrooxidans* por la influencia que éste parámetro demarca sobre su fisiología. Según lo reportado

por Yahya y Johnson (2002), disminuciones en el pH desde 1.5 a 1.0 desaceleraron la oxidación biológica de pirita debido a una rápida mortalidad de la bacteria.

El potencial de óxido-reducción en un proceso de biooxidación está determinado por la relación $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$ en el sistema, esta a su vez es controlada por las bacterias encargadas de regenerar Fe^{+3} a partir del Fe^{+2} solubilizado (Bailey *et al.*, 1992; May *et al.*, 1997; Rohwerder *et al.*, 2003). Durante los montajes realizados, el potencial de óxido-reducción presentó para todos los tratamientos valores por encima de los 550mV, característicos de sistemas altamente oxidantes (Figura 4-3) (Kodali, 2004). Por otro lado, la relación inversa entre la velocidad de agitación y el crecimiento de las curvas del potencial redox, independientemente del factor control de pH, se atribuye a la alta solubilización de Fe^{+2} en los sistemas con la más alta agitación, donde el ion ferroso no pudo ser oxidado por las bacterias en la misma proporción de los ensayos agitados a 300 r.p.m, causando un leve decrecimiento en la relación $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$. La alta solubilización de Fe^{+2} en los sistemas con mayores velocidades de agitación se atribuye a una mejor mezcla y por tanto mayor contacto de los agentes oxidantes con el mineral; es necesario recordar que los principales productos de la degradación de pirita son los iones Fe^{+2} y H^{+} .

Relacionadas directamente con las reacciones biológicas en un proceso de biooxidación, están las cinéticas de crecimiento celular, consumo de Fe^{+2} y generación de Fe^{+3} (Figuras 4-4 y 4-5). Al evaluar de forma conjunta el crecimiento bacteriano, consumo de Fe^{+2} y producción de Fe^{+3} , se evidenció que el decrecimiento del pH en los sistemas donde no fue controlado, afectó en cierta medida la actividad de *A. ferrooxidans*. Se afirma lo anterior, por la disminución en las velocidades de crecimiento, la acumulación el Fe^{+2} y los ligeros declives en cinética de producción de Fe^{+3} , una vez el pH el medio comenzó a tornarse más ácido. Adicionalmente se tiene el leve incremento en la velocidad de generación del ion férrico en los ensayos donde el pH fue controlado. Dado que los comportamientos anteriores se marcaron de manera especial en los ensayos agitados a 700 r.p.m, se podría hablar de la existencia de un efecto conjunto entre el nivel de agitación y el control de pH.

En las cinéticas asociadas a los productos globales del proceso de biooxidación, Fe total y SO_4^{2-} (Figuras 4-6 y 4-7), el efecto de la disminución del pH fue menos evidente, sin embargo se continuó apreciando la interacción del pH y la velocidad de agitación 700 r.p.m, donde las tasas de generación de hierro y sulfatos fueron ligeramente mayores en los ensayos con control de pH. La explicación a este fenómeno puede estar relacionada con el efecto negativo del pH bajo sobre las enzimas de *A. ferrooxidans* (Gómez y Cantero, 2005) y las consecuencias adversas que una alta

agitación puedan ocasionar sobre el microorganismo (Deveci, 2004; Liu *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2012). Aunque la disminución del pH (desde 1.7 a 1.35 en los últimos seis días de proceso) se mantuvo dentro del rango tolerado por la bacteria (1.2 - 2.0) (Dew *et al.*, 1997; Valdés *et al.*, 2008; Rivadenira, 2011), y a pesar que en 700 r.p.m se observó una buena mezcla entre mineral y el medio de cultivo, es posible que esta velocidad de agitación haya provocado daños en las bacterias haciéndolas más vulnerables a la acidificación del medio. Por otro lado y como se verá adelante, existe la posibilidad de que este comportamiento se deba a la reología de los sistemas, igualmente influenciada por el pH y la agitación.

Si bien el factor control de pH intervino en las cinéticas de generación de productos, se estima que su influencia no fue lo suficientemente significativa sobre el proceso de biooxidación, o al menos no jugó un papel tan importante como la variación en las velocidades de agitación. Paradójicamente y pese a lo antes descrito sobre 700 r.p.m, fue con esta y 500 r.p.m que se obtuvieron las concentraciones y velocidades de generación de Fe^{+3} , Fe total y sulfatos más altas. Aunque 700 r.p.m eventualmente pudo generar daños a nivel celular, la magnitud de los daños no parece considerable y su interferencia sobre las velocidades de oxidación del Fe^{+3} fue mínima, inclusive a bajos pH. Por otro lado, pese a que las bacterias estuvieron menos expuestas a estrés hidrodinámico con 300 r.p.m (por la baja intensidad de agitación y suspensión de sólidos), se generaron las más pequeñas velocidades de disolución, cantidades de hierro y sulfato, y concentración celular. Todo lo anterior indica que el nivel de mezcla y contacto de las tres fases, primó en la oxidación biológica de los residuos de La Maruja.

Adicional a las cinéticas de los ensayos con microorganismo, también se tienen las cinéticas de los blancos o controles abióticos. En estos el efecto del factor control de pH si fue evidente, principalmente en la curva de pH, producción de Fe total y sulfatos. Como se mencionó previamente y se sugirió desde el capítulo 2, el crecimiento pronunciado del pH de los controles abióticos (ensayos sin control de pH), pudo ser consecuencia del consumo de ácido por los monosulfuros y minerales de la ganga. Este efecto sin embargo, fue contrarrestado con éxito tras la disolución de pirita en los montajes inoculados. Los resultados conjuntos de controles y ensayos bióticos respecto al pH, indican que en el diseño futuro de un proceso de biooxidación de los residuos de La Maruja, no se requiere invertir en altas cantidades de H_2SO_4 , ya que a pesar del efecto de la ganga y monosulfuros este es compensado con las reacciones de oxidación desencadenadas por los microorganismos; lo que sí podría requerirse, es una base para evitar caídas pronunciadas del pH, entre las bases más usadas en procesos de biooxidación está la cal.

Por otro lado, el ligero crecimiento en el Fe total y SO_4^{-2} en los blancos con control de pH, se debe a la adición de ácido y consecuente disolución de los monosulfuros presentes en el residuo. Cabe recordar, que minerales como la pirrotita, esfalerita, arsenopirita, calcopirita y galena, pueden ser solubilizados por el ion H^+ a través del mecanismo polisulfuro (Rawlings *et al.*, 2003; Ballester, 2005; Sekhar *et al.*, 2009^a; Kundu y Kumar, 2014).

4.4.2 Análisis estadístico

Muchos fueron los resultados respecto a las tres velocidades de agitación y el control de pH, y como se apreció en las cinéticas y se describirá en las secciones siguientes, cada uno de los tratamientos trajo implícita una serie de ventajas y/o desventajas sobre el proceso de biooxidación de los residuos de La Maruja. A través del análisis estadístico se determinó que no existe una interacción significativa entre la agitación y el pH, y controlar o no el pH realmente no ofrece ventajas comparativas respecto a la solubilización de Fe y SO_4^{-2} (Figuras 4-8 y 4-9). El resultado del análisis estadístico no desestima lo que se discute sobre el pH, ni lo desacredita como un parámetro importante en un proceso de biooxidación, lo que indica es que para las condiciones y los tiempos en que se realizaron los ensayos, controlar o no la acidez del medio no implicó cambios drásticos sobre la disolución de minerales en el proceso. Es necesario destacar, que en los diez días en que fue evaluado cada ensayo, el pH no se salió del rango en el que sobrevive *A. ferrooxidans* y por tanto los efectos no se hicieron tan notorios a nivel global, quizá para procesos más largos con el residuo de La Maruja, el control sea algo fundamental. Respecto a la velocidad de agitación se corroboró la baja efectividad de 300 r.p.m y estadísticamente 500 r.p.m y 700 r.p.m generan resultados similares. Aunque con 700 r.p.m los porcentajes de Fe y SO_4^{-2} son ligeramente mayores, el proceso sería más rentable con 500 r.p.m ya que el consumo de potencia disminuye casi un 64.6%.

De manera general las cinéticas obtenidas en los ensayos agitados a 500 r.p.m y 700 r.p.m son comparables con las halladas durante la tercera etapa de adaptación de *A. ferrooxidans* (capítulo 3), alcanzando valores similares en los porcentajes de Fe total solubilizado, pH y potencial de óxido-reducción. Lo anterior muestra que el paso desde erlenmeyers a reactores no fue cambio crítico para las bacterias y, lo más importante, no influyó en el proceso global de biooxidación. Adicionalmente la ausencia de fases de latencia en las cinéticas, confirma la importancia de una adaptación preliminar de las cepas, la cual reforzó la actividad bacteriana y consecuentemente mejoró la eficiencia de lixiviación (Chandraprabha *et al.*, 2002; Arroyave, 2008; Xia, *et al.*, 2008; Haghshenas, *et al.*, 2009).

4.4.3 Hidrodinámica

Tal como lo sugieren las cinéticas y análisis estadísticos, la biooxidación de cualquier tipo de mineral en reactores de tanque agitado, depende especialmente del nivel de agitación, ya que ésta determina la transferencia de masa y calor y el grado de mezcla en el sistema gas-líquido-sólido. La transferencia de masa y una buena mezcla, garantizan a su vez la interacción entre los componentes más importantes, sustratos, bacterias y mineral, dando lugar a las reacciones de oxidación químicas y biológicas (Joshi *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2012). Una agitación insuficiente como 300 r.p.m, limita las operaciones de transferencia y favorece la aparición de regiones dentro del tanque con concentraciones insuficientes de nutrientes y agentes oxidantes, acumulación importante de mineral en el fondo del tanque y condiciones de temperatura y pH inadecuadas, lo que reduce la disolución del mineral y el crecimiento microbiano (González *et al.*, 2003).

Para cuantificar el efecto de la velocidad de agitación sobre la transferencia de masa, mezcla y esfuerzo cortante en cada ensayo, se establecieron diversos parámetros hidrodinámicos como número de Reynolds (Re), esfuerzo cortante (τ), tamaño de los eddy (λ) y $k_L a$ (Tablas 4-7 y 4-8). El cálculo de la mayoría de estos parámetros requirió de la determinación de propiedades del fluido como la densidad y viscosidad aparente. Para la viscosidad, se apreció una dependencia con el pH de la solución, donde los sistemas menos viscosos fueron aquellos con pH más ácidos. Este resultado se asemeja a lo encontrado por algunos autores en trabajos con alúmina y lateritas, donde suspensiones con pH entre 1 y 4 generaron viscosidades bajas y en aquellas con pH neutros se apreciaron valores de viscosidad máximos (Nikumbh *et al.*, 1991; Cerpa *et al.*, 2001). De igual manera Jowkarderis y Van de Ven (2014) encontraron que sus suspensiones compuestas por nanofibras de celulosa presentan una disminución significativa de la viscosidad cuando el pH se reduce desde 6.9 ($\eta \approx 2320$) hasta 3.5 ($\eta \approx 1600$), a pH de 1.5 la viscosidad fue mínima ($\eta \approx 450$). En términos generales, se reporta que las suspensiones presentan un comportamiento de viscosidad variable de acuerdo al pH, puesto que este parámetro interviene en los potenciales superficiales de las partículas generando fuerzas electrostáticas repulsivas entre ellas; cambios en el pH pueden inclusive variar el tipo de fluido desde pseudoplástico hasta newtoniano (Nikumbh *et al.*, 1991; Cerpa *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2010). Adicional al pH, parece ser que el aumento en la viscosidad de una suspensión de minerales, también podría estar relacionado con el aumento de la concentración en sólidos y la disminución del tamaño de partículas (Cerpa *et al.*, 2001). En este trabajo, y aunque no se encontró una relación entre la cantidad de jarosita con y sin control de pH,

es posible que los tamaños y condiciones de formación de este hidroxisulfato hayan variado respecto al factor pH, y consecuentemente alterado la viscosidad de los medios.

El número de Reynolds (Re) da cuenta del régimen de flujo en un reactor. Se considera flujo turbulento cuando Re es mayor a 10000, laminar cuando es menor de 10 y de transición entre 10 y 10000. Cuando se habla turbulencia se hace referencia al movimiento errático de un fluido con cruces continuos, este movimiento es quien da lugar a la mezcla de los componentes de dicho fluido, contrario al flujo laminar donde el fluido viaja siguiendo líneas de corriente regulares dificultando la mezcla (Doran, 1998). El régimen de transición, indica que el flujo es turbulento en la proximidad del impulsor y laminar en las zonas más apartadas a este (Dickey y Fenic, 1976; Doran, 1998; Arroyave, 2008). Como se observa en la Tabla 4-2, los Re obtenidos para la velocidad de agitación 300 r.p.m fueron los más bajos y cercanos al régimen de transición, es decir, que posiblemente en las proximidades del impulsor se presentó una alta dispersión de aire y suspensión del mineral, pero en las paredes y parte inferior del reactor la mezcla fue inadecuada, lo que explica por qué gran cantidad de mineral permaneció sedimentado. Con 500 r.p.m y 700 r.p.m los números de Reynolds fueron más altos y por tanto la turbulencia en los sistemas, dando lugar una mejor mezcla tal como fue observado.

Aunque todos los tratamientos presentaron $Re > 10000$ y el pH no influyo significativamente en los resultados globales de disolución, la relación inversa entre el Re y la viscosidad (Ecuación 4.2), conllevó a incrementos en las magnitudes del Re en los ensayos sin control de pH. Previamente se había hablado del efecto conjunto del control de pH y la velocidad de agitación 700 r.p.m sobre las cinéticas de $[Fe^{+2}]$, $[Fe^{+3}]$, entre otras; es posible que dicho efecto sea realmente una consecuencia de esta variación en el Re, que sugiere un aumento en la turbulencia del sistema y por ende mayor estrés hidrodinámico.

Según Joshi *et al.* (1996), el flujo turbulento se puede visualizar como un conjunto de remolinos grandes, inestables y decadentes, quienes transfieren su energía a una cadena de remolinos cada vez más pequeños (eddys), que al final disipan la energía en forma de calor. En un proceso biológico, las interacciones en el flujo turbulento dependen del tamaño relativo de los eddys y las partículas vivas, donde eddys muy pequeños podrían fluir sobre la superficie de las células sometiénolas a condiciones de estrés, mientras eddys grandes sólo las llevarían en un movimiento convectivo (Joshi, 1996). Además de los remolinos producto de la turbulencia, existe el esfuerzo de corte, definido como la fuerza por unidad de área aplicada en forma paralela a la superficie de cada partícula biológica (Joshi *et al.*, 1996; Trujillo y Valdez, 2006).

Con base en lo anterior y conociendo que el tamaño de *A. ferrooxidans* oscila entre 0.5 y 3.0 μm (Deveci, 2004), las dimensiones de los eddy estimadas para las diferentes velocidades de agitación (entre 33.95 μm – 54.29 μm) no fueron lo suficientemente pequeñas para causar un efecto deletéreo sobre la bacteria. Este resultado se asemeja a lo encontrado por Deveci, (2004) y Arroyave, (2008), quienes obtuvieron eddys entre 18 μm y 74 μm y aseguran de igual manera, que el efecto del esfuerzo mecánico sobre las células fue mínimo. Diversos estudios sobre el estrés hidrodinámico en un proceso de biooxidación, han encontrado que la pérdida en la viabilidad bacteriana, más que al esfuerzo de corte o al tamaño de los remolinos, estaría asociada a la colisión entre partículas originada por la intensidad de agitación, por lo que son el aumento en la concentración de sólidos y la velocidad de agitación quienes podrían incrementar la frecuencia de las colisiones y consecuentemente el daño celular (Deveci, 2002; Deveci, 2004; Liu *et al.*, 2007; Arroyave, 2008).

4.4.4 Coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) y consumo de oxígeno

Diversas operaciones de transferencia de masa ocurren en un proceso de biooxidación. Los nutrientes (Fe^{+2}) deben llegar tanto a las adheridas al mineral como a las que se encuentran en suspensión, de la misma manera que los metabolitos producidos (Fe^{+3}) tienen que ser transportados al líquido para solubilizar las fases minerales. Adicionalmente deben ser considerados los procesos de transporte del O_2 y CO_2 desde el aire a las células (Acevedo, 2000). Estos últimos dos compuestos son de vital importancia ya están directamente relacionados con la oxidación de los minerales, el primero participa en las reacciones de óxido-reducción biológicas como último aceptor de electrones, y el segundo constituye la fuente del carbono para el crecimiento microbiano (Boon y Heijnen, 1998; Acevedo, 2000; Valdés *et al.*, 2008).

Debido a la baja solubilidad del oxígeno en un medio de cultivo, generalmente soluciones acuosas, este debe ser suministrado continuamente mediante la inyección de aire al reactor. La concentración de oxígeno disuelto en el medio depende de la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR: oxygen transfer rate) desde el gas al líquido y éste a su vez del coeficiente de transferencia de masa " k_L " y del área superficial específica " a " (García *et al.*, 2010). Dado que estos parámetros no pueden ser medidos fácilmente de forma individual, usualmente son determinados en conjunto como el coeficiente volumétrico de transferencia de masa o $k_L a$ (García *et al.*, 2010). En cualquier proceso aerobio, el coeficiente de transferencia de masa, depende entre otros factores, del flujo de aire, tipo de impulsor, tipo de difusor, altura del líquido, posición del impulsor y velocidad de

agitación (García y Gómez, 2004). En un proceso de oxidación de sulfuros se deben tener en consideración el porcentaje de pulpa, el tipo de sulfuro y el tamaño de partícula (Bailey and Hansford, 1993). En el caso particular de la pirita se ha reportado una demanda de 1.88 kg O₂/ kg S⁻² (Dew *et al.*, 1997). Por otro lado y según Boon y Heijnen (1998), el coeficiente de transferencia de masa, puede ser estimado desde el k_La de O₂, como:

$$k_L a_{CO_2} = 0.89 k_L a_{O_2} \quad (4.12)$$

En el presente trabajo, se determinó para cada uno de los tratamientos el k_La asociado al O₂. Debido a que lo único que varió fue la agitación, solo ésta fue tomada en cuenta para el análisis de los resultados. En la Tabla 4-8, se presentan los k_La para cada una de las velocidades de agitación evaluadas, donde la relación directa entre ambos parámetros, es congruente con lo encontrado por Boon *et al.*, (1998) quienes en la oxidación de ion ferroso por *A. ferrooxidans* a 300 r.p.m y 600 r.p.m, determinaron para el mismo flujo de aire (0.2 vmm) k_La de 0.38 min⁻¹ y 1.62 min⁻¹ respectivamente, esta relación creciente de la velocidad de agitación y el k_La también es reportada por Yagi y Yoshida, (1975). Según Doran (1998) cuando la velocidad de agitación es baja, el caudal de gas vuelve al impulsor sin dispersarse, subiendo alrededor del eje del agitador; a medida que aumenta la velocidad de impulsor, el gas es capturado dentro de las palas y luego se dispersa en el líquido, por tanto a mayores velocidades de agitación aparecen pequeñas corrientes de recirculación. En resumen, la relación entre la velocidad de agitación y el coeficiente de transferencia de masa se debe, en parte, a que es el impulsor y la velocidad a la que gira los responsables de dispersar el gas. Existen diferentes las ecuaciones empíricas para el k_La y la mayoría de ellas muestran su correlación con la agitación, como ejemplo se tiene:

$$k_L a = C \cdot V_s^a \cdot (P/V)^b \cdot \mu_a^c \quad (4.13)$$

Donde C, corresponde a una constante dependiente de parámetros geométricos, V_s la velocidad superficial del gas, μ la viscosidad y P/V es la potencia por unidad de volumen, la cual es afectada directamente por la velocidad de agitación (Ecuación 4.6) (García y Gómez, 2009).

En general los valores obtenidos para el k_La en todos los tratamientos son aceptables si se comparan con k_La estimados en otros procesos de biooxidación y/o biolixiviación. Acevedo, (2000) reporta k_La de 0.05 min⁻¹, 0.2 min⁻¹, 0.3 min⁻¹ y 0.7 min⁻¹ para la biooxidación de enargita, calcocita, covalita y calcopirita, respectivamente.

Por otro lado e independientemente del coeficiente de transferencia de masa, la concentración de OD siempre permaneció por encima de 5.0 mg/L en todos los ensayos, muy lejos de la concentración crítica establecida para un proceso de biooxidación, 1.0 mg/L según Gericke (2009), lo que indica que la concentración de oxígeno disuelto no fue un factor limitante en los procesos biooxidativos llevados a cabo en este estudio.

Uno de los aspectos que más llamó la atención en este trabajo, fue la velocidad de consumo de oxígeno (OUR: oxygen uptake rate) quien no presentó relaciones aparentes con los tratamientos evaluados. Para 500 r.p.m se obtuvieron los consumos más altos, mientras que 300 r.p.m y 700 r.p.m presentaron valores bajos y similares. En algunas investigaciones el OUR es empleado como como indicador del comportamiento fisiológico de los microorganismos cuando estos son sometidos a determinadas condiciones de operación (d'Hugues *et al.*, 1997; García *et al.*, 2011). Con base en lo anterior podría pensarse que entre las tres agitaciones evaluadas, 500 r.p.m es la más adecuada para el proceso, con ella se obtuvo una buena mezcla (Re alto), altas velocidades de generación de productos, y las células presentaron una buena actividad medida en términos del consumo de oxígeno, crecimiento celular y consumo de Fe^{+2} , todo esto en conjunto podría indicar una disminución del estrés hidrodinámico respecto a 700 r.p.m, donde el consumo fue realmente más bajo de lo esperado. Sin embargo y teniendo en cuenta los altos coeficientes de transferencia de masa logrados con 700 r.p.m, es posible que sólo la agitación haya logrado incorporar oxígeno del ambiente al medio de cultivo. La determinación del consumo de oxígeno por el método dinámico, se realiza a partir del perfil de concentración en el trayecto donde el suministro de oxígeno es cortado y el OD comienza a disminuir, el consumo corresponde entonces a la pendiente de dicho trayecto. Si la premisa sobre la 700 r.p.m es cierta, aunque el microorganismo esté consumiendo oxígeno, la caída de éste no sería tan rápida puesto que la sola agitación lo está incorporando, esto a su vez generaría una pendiente menos pronunciada enmascarando el consumo real por parte de las bacterias.

Se reporta que en los procesos de biooxidación, usualmente realizados a pH bajos, las concentraciones de HCO_3^- o CO_3^{2-} pueden ser depreciables y solo se considera la solubilidad del CO_2 (Boon y Heijnen, 1998). De acuerdo a Rossi (1990) esta solubilidad depende además de la composición del medio de cultivo y/o de la concentración de ácido como lo muestra la Tabla 4-11.

Tabla 4-11: Solubilidad del dióxido de carbono en soluciones acuosas a una temperatura de 25°C. Tomada de Rossi (1990).

Solvente	Agua pura	0.5N H ₂ SO ₄	1N H ₂ SO ₄	2N H ₂ SO ₄	4N H ₂ SO ₄
Coefficiente adsorción Busen	0.756	0.727	0.705	0.669	0.611

Con base en lo anterior y específicamente en la relación inversa de la solubilidad del CO₂ con la cantidad de ácido, es posible que el bajo consumo de Fe⁺² al final del proceso en los ensayos a 700 r.p.m (Figura 4-5A), sea también consecuencia de una menor disolución del CO₂, si este sustrato disminuye, el crecimiento microbiano se ve limitado y por ende la biooxidación del Fe⁺². Otra de las cinéticas que puede estar reflejando la relación pH – solubilización de CO₂, es la del crecimiento microbiano (Figura 4-4), donde en los ensayos con control de pH, las caídas en las velocidades de crecimiento fueron menos pronunciadas que en los ensayos sin control de pH, estos últimos caracterizados por la acidificación del medio.

4.4.5 Mineralogía del proceso de biooxidación

Los análisis por DRX de mineral (Figuras 4-12 y 4-13), mostraron una reducción significativa de los picos de pirita en las muestras biooxidadas, señalando de una forma directa el efecto de la oxidación biológica sobre el mineral. Los ensayos con las más altas concentraciones de Fe y SO₄⁻² solubilizados (500 r.p.m y 700 r.p.m) presentaron a su vez las mayores reducciones en el porcentaje inicial de pirita, este resultado resulta más que evidente ya que los primeros corresponden a los productos de degradación del sulfuro a través del mecanismo tiosulfato (Sand, 2001; Kundu y Kumar, 2014). La reducción el sulfuro predominante, pirita, conlleva a la concentración de los minerales acompañantes denominados ganga, en especial del cuarzo.

La cuantificación de los demás sulfuros (esfalerita, arsenopirita, galena, pirrotita, calcopirita) no resulto exacta, presentando valores inconsistentes entre tratamientos. Dado que la concentración de estos sulfuros en el residuo fue realmente baja y, sus picos característicos estuvieron enmascarados por los de la pirita, se dificultó su detección mediante los difractogramas. Se considera que esta baja intensidad y/o aparente inexistencia de picos, fue quien hizo imprecisa la cuantificación mediante refinamiento de Rietveld. Por lo anterior la hipótesis propuesta en el capítulo 2 sobre el orden de oxidación de los sulfuros (pirrotita > esfalerita > galena > arsenopirita > calcopirita > pirita) no pudo ser dilucidada.

Uno de los resultados más importantes obtenidos por DRX, es la presencia de jarosita. La jarosita como previamente se había mencionado, es un producto secundario de los procesos de

biooxidación, ampliamente documentado en la literatura (Márquez *et al.*, 2006; Daoud y Karamanev, 2006; Lin *et al.*, 2008; Ossa y Márquez, 2010; Kaksonen *et al.*, 2014b). Esta fase mineral corresponde a un hidroxisulfato de hierro con formula molecular $MFe_3(SO_4)_2(OH)_6$, en la que M puede ser K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Ag^+ , o H_3O^+ , la incorporación de estos cationes monovalentes es común a pH menores a 2.0 (Gramp *et al.*, 2008; Kaksonen *et al.* 2014c). De acuerdo a los difractogramas la jarosita predominante en los ensayos de biooxidación fue $KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$ o K-jarosita, donde la fuente de K^+ pudo provenir del medio de cultivo, la moscovita o el feldespato potásico presentes en el mineral. Se esperaba que debido al papel que desempeña el pH en la formación de la jarosita (Gómez y cantero, 2005; Nurmi *et al.*, 2010; Rivadeneira, 2011; Kaksonen *et al.*, 2014b), aquellos ensayos con caídas importantes del pH presentaran menores concentraciones del hidroxisulfuro, sin embargo no se no se apreció tendencia alguna con base en el pH de los ensayos.

Tanto en los blancos como en las muestras biooxidadas se encontró una nueva fase catalogada como brushita, $Ca(PO_3OH) \cdot 2H_2O$. Según Arroyave (2008), esta fase aparece por la reacción en HPO_4^- proveniente del fosfato ácido di potásico (K_2HPO_4) del medio T&K, y el calcio presente en el mineral. La formación de brushita fue más alta en los controles debido a que en estos había más disponibilidad de K_2HPO_4 . La generación de este tipo de compuestos puede resultar crítica en un proceso de biooxidación, particularmente en uno discontinuo debido a que compite con el microorganismo por un macronutriente esencial como lo es el fósforo.

En los análisis por FTIR (Figuras 4-14 y 4-15) se confirmó la presencia de jarosita, no obstante y contrario a lo reportado en la literatura (Márquez *et al.*, 2006; Ossa y Márquez, 2010; Mejía, 2010; Chukanov, 2014), las bandas características de este compuesto que generalmente se presentan alrededor de 1190 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , se observaron en muy baja intensidad, y la banda en 1008 cm^{-1} fue enmascarada por la ubicada en 1020 cm^{-1} de la moscovita. Estos resultados pueden ser consecuencia de una menor concentración de jarosita o en su defecto a cambios en la cristalinidad. La posibilidad de una baja cantidad de jarosita se asocia a los rangos del pH en el que se trabajó. Das *et al.* (1999) y Daoud y Karamenev (2006), afirman que la precipitación de este hidroxisulfuro tiende a disminuir cuando se trabaja a pH por debajo de 1.8. Por otro lado, los cambios en la cristalinidad y particularmente la desaparición de picos característicos como el 1190 cm^{-1} , son explicados por Márquez (1999), como el aumento en la simetría de los iones SO_4^{2-} , provocado por el incremento en el cristalinidad del material o, por un cambio de fase a otro tipo de sulfato o ambiente extramolecular, que aumenta o disminuye el grado de simetría.

4.5 Conclusiones y recomendaciones

Los ensayos de biooxidación en reactores de tanque agitado, permitieron establecer cinéticas de parámetros químicos y biológicos relevantes para este tipo de proceso. A través de estas cinéticas fue posible estimar la influencia que ejerce la velocidad de agitación en la oxidación biológica de los residuos de la mina La Maruja, donde se evidencio que encontrar un equilibrio entre una mezcla adecuada y un ambiente amigable (con bajo estrés hidrodinámico) para las bacterias es primordial.

En todas las cinéticas se evidenció que una velocidad de agitación de 300 r.p.m no es apta para lograr una biooxidación eficiente de los residuos de La Maruja. Las causas de esto están asociadas a una baja suspensión de sólidos y/o mezcla ineficiente del sistema trifásico, lo que redujo las cantidades de nutrientes disponibles para *A. ferrooxidans* y el contacto del mineral con los agentes oxidantes.

La biooxidación de los residuos de La Maruja en reactores de tanque agitado, presenta altas eficiencias cuando la agitación permanece dentro del intervalo 500 - 700 r.p.m. En términos de solubilización de pirita 700 r.p.m se presenta como la agitación más idónea, no obstante, con base de consumo energético 500 r.p.m lograría una buena solubilización, y reduciría considerablemente la potencia requerida y posiblemente el estrés hidrodinámico asociado a la colisión entre partículas.

Los niveles del factor control de pH no presentaron efectos estadísticamente significativos sobre la eficiencia global del proceso de biooxidación de los residuos de La Maruja. Este resultado se asocia al tiempo en que fueron realizados los ensayos, durante el cual el rango de pH en el que sobrevive *A. ferrooxidans* no fue sobrepasado. Debido a los costos inherentes al control de pH, se recomienda no controlarlo en futuros procesos de biooxidación de pirita procedente de la mina La Maruja, a menos que los tiempos sean realmente largos, y el pH se salga del rango tolerado por la bacteria.

5. Escalado y evaluación desde laboratorio hasta planta piloto, del proceso de biooxidación de los residuos de minería aurífera de la mina La Maruja

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la eficiencia del proceso de biooxidación de residuos mineros desde una escala de laboratorio hasta un nivel planta piloto. Para esto se emplearon erlenmeyers y una serie de reactores de tanque agitado construidos con la misma configuración geométrica. También se consideraron parámetros determinados previamente en el reactor de 5L. Todos los ensayos a nivel de laboratorio fueron evaluados por un periodo de 10 días y el ensayo en planta piloto se extendió hasta los 18 días. Mediciones periódicas de hierro y sulfatos solubilizados, pH, potencial de óxido-reducción y oxígeno disuelto, permitieron establecer las cinéticas de proceso para cada escala. A nivel de laboratorio, específicamente los ensayos en 150 ml y 5 L, presentaron cinéticas y porcentajes de disolución muy similares entre sí. Al pasar al reactor de 50 L, donde se evaluaron los criterios potencia por unidad de volumen y velocidad en la punta del impulsor, la eficiencia global del proceso aumentó cerca de un 9% y el mejor criterio de escalado fue velocidad en la punta del impulsor. Por otro lado, en el reactor de 4000L (planta piloto) los primeros 10 días de ensayo generaron porcentajes de hierro y sulfato disueltos comparables con los de 150 ml y 5 L. Después de 18 días, los porcentajes de hierro y sulfato disueltos en 4000L alcanzaron valores cercanos a los estimados en 50 L. El ensayo a escala piloto presentó velocidades bajas de oxidación al inicio del proceso. El porcentaje de oro recuperado fue más alto en las muestras biooxidadas en 50L y 4000L. Todos los resultados en conjunto sugirieron que el escalado funcionó, sin embargo es necesario ajustar ciertas condiciones a nivel de planta piloto para mejorar las cinéticas de oxidación.

Palabras clave: biooxidación, residuos de minería, planta piloto, escalado.

Abstract

In this work the scale-up of mine tailings biooxidation was evaluated from laboratory to pilot level. It implied the use of shake flasks, stirred-tank bioreactors, tailings from La Maruja mine (Caldas, Colombia) and *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a biological agent. All assays in the laboratory level were carried out for a period of ten days and were monitored by chemical measurements of iron, sulfates, pH, redox potential and dissolved oxygen. The pilot plant assay was carried out for a period of eighteen days. To scale-up several parameters previously evaluated were taken into account. The results in 150 ml flasks and 5 L bioreactor were similar in all response variables, particularly in the percentage iron removed. The iron removed showed a 9% increase in the 50 L reactor. Additionally, in 4000 L reactor (pilot scale) the final concentration of iron removed was similar to the values obtained in 5 L assays, however, the oxidation rates were slower at the beginning. The percentage of gold recovered was higher in larger reactors assays. These results suggested that the scale-up was successful, but some conditions must be controlled at pilot level to improve the oxidation kinetics.

Keywords: biooxidation, mine tailings, pilot plant, scale-up

5.1 Introducción

En diversos países el proceso de biooxidación de minerales ha sido implementado exitosamente a escala comercial incrementando así la recuperación de metales valiosos hasta en un 90% (Morin, 1995 Rawlings 2003; Sekhar *et al.*, 2012, Brierley y Brierley, 2013; Schippers *et al.* 2013). Comúnmente los sistemas de biolixiviación a nivel industrial se componen de un reactor de tanque agitado de mayor volumen seguido de una serie de reactores del mismo tipo más pequeños simulando un reactor pistón, diseño que minimiza el tiempo de residencia (González *et al.*, 2004). En la literatura se reportan varios procesos industriales para el tratamiento de minerales, entre ellos el BIOX, BioCOP, BioniC, BacTech y Mintek (Carretero *et al.*, 2011). Hasta el año 2010 la capacidad de procesamiento a nivel industrial oscilaba entre 40 ton y 1060 ton de mineral (Sekhar, *et al.*, 2012).

Para llevar satisfactoriamente un bioproceso hasta un nivel comercial, se recomienda realizar un escalado (García y Gómez, 2009; Tufvesson *et al.*, 2010). En términos generales, el escalado es un mecanismo a través del cual se trasladan las condiciones y variables establecidas en un reactor a otro de tamaño diferente (Gallego, 2002a). Habitualmente se comienza en el laboratorio con matraces de 100 ml a 500 ml donde se evalúan nuevos productos y se optimiza la actividad microbiana. Luego se pasa a reactores de prueba de 1L a 5 L equipados con instrumentos de control para medir y ajustar parámetros como la temperatura, pH, OD, velocidad de agitación, flujo

de aire, entre otros. Los datos obtenidos en esta escala entregan información relevante sobre las necesidades de las células, los puntos óptimos de operación y permiten identificar las limitaciones impuestas sobre el microorganismo por el reactor. Los ensayos a escala de laboratorio pueden ser determinantes para el éxito del escalado. En el siguiente nivel, denominado escala piloto, se utilizan reactores desde 100 L a 5000 L dependiendo del proceso, y se suele estudiar la respuesta de las células al cambio de escala, en este punto el aumento en el tamaño de los equipos pierde importancia al lado de la reducción o variación del rendimiento inherente al nuevo volumen. De lograrse un cambio de escala completo y exitoso, se comienza el diseño de la operación a escala industrial cuyo objetivo es aumentar la productividad (Quintero, 1981; Doran, 1998; García y Gómez, 2009).

Según Junker (2003) existen tres tipos de factores que pueden afectar el escalado de un proceso: biológicos, químicos y físicos. Los factores biológicos incluyen el número de generaciones del inóculo, las cuales a su vez son responsables de mutaciones en las cepas y del aumento en las probabilidades de contaminación. Entre los factores químicos están el control de pH (tipo y concentración del ácido o base), calidad del medio y calidad del agua, concentraciones de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo, y en caso de un proceso de biooxidación, la composición mineralógica del concentrado (Watling, 2006). Los factores físicos más importantes son: la configuración del tanque, aireación, agitación, presión hidrostática, esterilización y control de temperatura.

Si bien en teoría, la cinética de una reacción química o bioquímica es independiente del tamaño del reactor y su geometría, los parámetros cinéticos si se ven afectados por los fenómenos de transferencia de momentum, calor y masa, y éstos a su vez por la configuración y dimensiones del reactor (Orozco, 2012). Uno de los principios del escalado, para tratar de reducir el efecto de los fenómenos de transporte es aplicar la teoría de la similitud, dividida en similitud geométrica, térmica, másica y bioquímica (Solà y Gódia, 1995; Orozco, 2012). Cada una de estas similitudes es prerrequisito de la otra. No obstante cuando se escala cualquier proceso, es imposible conservar todas las similitudes debido a las limitaciones dimensionales y económicas de dicho escalamiento (Quintero, 1981; Orozco, 2012).

Se han desarrollado diferentes métodos de escalado y de ellos los más extendidos son los criterios tradicionales o correlaciones empíricas, entre los cuales destacan potencia por unidad de volumen, velocidad en la punta del impulsor, número de Reynolds, tiempo de mezcla, y coeficiente de

transferencia de masa (Quintero, 1981; Ju y Chase, 1992; Gallego, 2002a; Orozco, 2012). Conocer muy bien el proceso se hace entonces imprescindible para establecer que propiedades físicas son más importantes, y con base en esto elegir el más criterio idóneo. Así, si las células son sensibles a las variaciones de oxígeno se podría mantener constante el coeficiente de transferencia de masa, o en cultivos sensibles al esfuerzo de corte deberá estudiarse el efecto de conservar constante la velocidad en la punta del impulsor (Orozco, 2012).

Dando provecho a la disponibilidad de reactores agitados construidos bajo la misma configuración geométrica en diferentes volúmenes, se realizaron una serie de ensayos a nivel de laboratorio y planta piloto, para determinar la eficiencia de la biooxidación en diferentes escalas de proceso sobre los residuos de minería aurífera provenientes de la mina La Maruja. Adicionalmente se analizó la efectividad de los criterios de escalado potencia por unidad de volumen y velocidad en la punta del impulsor y evaluó de manera preliminar el desempeño de un proceso de biooxidación de residuos mineros en un reactor de tanque agitado de 4000L.

En términos generales, esta investigación se considera el primer ensayo y punto de partida para próximos trabajos sobre el escalado hasta un nivel de planta piloto, de procesos de biooxidación de residuos mineros y procesos biohidrometalúrgicos con minerales colombianos.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Mineral

Con el fin de evaluar la eficiencia de un proceso de biooxidación de residuos mineros en dos escalas de proceso (laboratorio y piloto), se empleó un residuo de minería aurífera suministrado por la mina La Maruja, localizada en el municipio de Marmato (Caldas) y administrada por la empresa Mineros Nacionales S.A. En este residuo se encontraron elementos como Fe (24.99%), S (28.70%), Si (14.25%), Al (4.32) y Ca (1.00%). Los análisis mineralógicos indicaron altas concentraciones de pirita (~34.14%) y cuarzo (~25.10%), baja presencia de esfalerita, pirrotita, calcopirita, galena y arsenopirita, algunos aluminosilicatos como clinocloro y moscovita, y las plagioclasas albita y anortita, y el carbonato calcita. Para el tamaño de partícula se determinó un D_{60} igual a $60\mu\text{m}$ (pasante malla 200). Todos los detalles de la caracterización mineralógica del residuo (metodología y resultados) se presentan en el capítulo 2.

5.2.2 Material biológico

Para este escalado se seleccionó como agente biológico la cepa comercial *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 suministrada por el Laboratorio de Biomineralogía y Biohidrometalurgia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín y previamente adaptada al mineral (capítulo 3).

5.2.3 Biorreactores y escalado

Para comparar la eficiencia de la biooxidación de colas de minería en diferentes escalas, se seleccionaron dos tipos de biorreactores, matraces y/o erlenmeyers de 500ml (150ml volumen efectivo) en la fase inicial de laboratorio, reactores de tanque agitado (STR siglas en ingles) de 5 y 50L volumen efectivo para una segunda fase a nivel de laboratorio, y un biorreactor de tanque agitado de 4000L volumen efectivo para la escala piloto. Se eligió la configuración de tanque agitado, por la disponibilidad que había de éstos y por las múltiples ventajas que ofrece para un proceso de biooxidación, entre ellas, obtener un buen grado de mezcla entre las tres fases del sistema (líquida, sólida y gaseosa), mejorar las velocidades de transferencia de masa (O_2 y CO_2) y calor, y un mayor control sobre los procesos (Sun *et al.*, 2012).

La escala de laboratorio que implicó el uso de matraces, permitió además determinar el desarrollo celular en función del ambiente de cultivo y obtener de las primeras cinéticas de proceso como punto de referencia para las posteriores escalas; en esta escala también se realizó la adaptación del microorganismo al mineral, con el fin de lograr cierta estabilidad y eficiencia en su actividad biooxidante (capítulo 2). Con el cambio de escala hasta el reactor de 5 L, se determinó la velocidad de agitación más adecuada para alcanzar altas tasas de biooxidación y reducir el gasto en potencia; y se encontró que solo sería necesario controlar el pH si este sobrepasa el intervalo aceptado para *A. ferrooxidans*, el cual está establecido entre 1.2 y 2.0 (Battaglia *et al.*, 1994; Dew *et al.*, 1997; Valdés *et al.*, 2008; Rivadenira, 2011) (Capítulo 3); el nivel de agitación obtenido en 5 L fue utilizado como punto de partida para establecer las velocidades de agitación en las siguiente escala. En el proceso a 50 L se evaluó la eficiencia de la biooxidación usando dos criterios tradicionales de escalado, potencia por unidad de volumen (Ecuación 5.1) y velocidad en la punta del impulsor (Ecuación 5.2), estos fueron seleccionados con base en la necesidad del proceso de biooxidación de mantener un nivel adecuado de mezcla y reducir el estrés hidrodinámico sobre las bacterias. Finalmente, se realizó un último ensayo en un reactor de 4000 L para probar si a escala piloto era

posible mantener la eficiencia de los reactores menores, empleando el criterio de escalado con mejores resultados en 50L.

$$\frac{N_1}{N_2} = \left(\frac{D_2}{D_1}\right)^{2/3} \quad (5.1)$$

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{D_2}{D_1} \quad (5.2)$$

En las ecuaciones 5.1 y 5.2, N_1 corresponde a la velocidad de agitación del reactor de menor tamaño, D_1 corresponde al diámetro del impulsor del reactor de menor tamaño, N_2 es la velocidad de agitación para el proceso a una escala superior y D_2 el diámetro del impulsor del reactor de mayor tamaño.

Para el escalado también se aprovechó la construcción previa de los reactores manteniendo las similitudes geométricas que se presentan en la Figura 5-1. Todos los reactores estaban acondicionados con cuatro baffles ubicados cada 90° y con impulsores de seis palas inclinadas 45° . El tipo de impulsor empleado se caracteriza por proporcionar un flujo axial más uniforme, mejorar la mezcla y reducir la potencia requerida para una velocidad de flujo dada (Mc Cabe, 2007). El suministro del aire en cada tanque se realizó a través de difusores localizados debajo de los impulsores, los cuales fueron elaborados con membranas de goma sintética que permitieron la formación de burbujas uniformes y evitaron considerablemente la acumulación de mineral en el sistema de aireación.

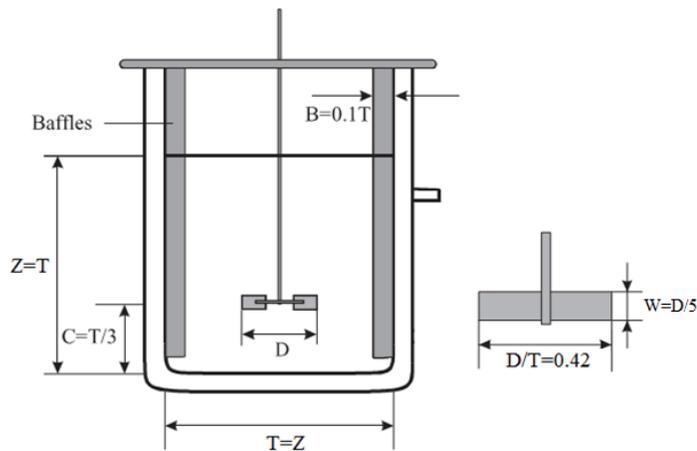


Figura 5-1: Relaciones geométricas conservadas entre los reactores de tanque agitado. Tomado y modificado de Deveci (2004)

5.2.4 Montaje de bioensayos escala de laboratorio

Todos los montajes experimentales fueron operados en el modo discontinuo con el fin de obtener las cinéticas de proceso en todas las escalas y mantener un mejor control de los sistemas (Rossi, 1990). Para todos los volúmenes se seleccionó el medio de cultivo T&K modificado, constituido por 0.4 g/L de $(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4$, K_2HPO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Tuovinen y Kelly, 1972). Como fuente de energía se usó 0.3g/L de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 10% (p/v) de mineral (residuos de La Maruja). El pH del medio y de las soluciones de sulfato ferroso fue ajustado con H_2SO_4 (98%) hasta 1.6 ± 0.1 . Para los ensayos en erlenmeyers y reactores de 5L tanto el medio como el mineral fueron esterilizados a 120°C y 15 PSI por 20 min, la solución de sulfato ferroso se esterilizó por filtración con membrana de nitrocelulosa de $0.45\mu\text{m}$. Para los ensayos en 50L, no se esterilizó ningún componente del medio y se empleó agua corriente debido al volumen requerido de estos. Como inóculo, a cada reactor se le adicionó 10% (v/v) de una solución con cerca de 10^8 células/ml. Todos los ensayos fueron incubados y monitoreados durante 10 días manteniendo una temperatura cercana a los 30°C . En los reactores de 5L y 50L se ajustó la velocidad de suministro de aire en 0.5vvm. La agitación a escala de erlenmeyers se mantuvo en 180 r.p.m y la de los reactores fue determinada con base en los resultados del experimento de agitación realizado en 5L (capítulo 4) y los criterios de escalado. El agua perdida por evaporación en cada uno de los ensayos fue compensada de forma periódica. Debido a los resultados previos (capítulos 3 y 4) sobre el comportamiento de los controles abióticos, para esta parte de la investigación se decidió no evaluar blancos.

5.2.5 Montaje de bioensayos escala piloto

Para el ensayo a escala piloto (4000 litros) se hizo necesario el cambio de ciertas condiciones de proceso debido a la complejidad y tamaño del montaje, entre estos cambios destacó el uso de sales grado comercial para la preparación del medio T&K y agua corriente. No se garantizaron condiciones de asepsia debido a que no fue posible esterilizar ninguno de los componentes del medio. El reactor no estaba equipado con controles de temperatura. La agitación para este ensayo fue determinada a partir de los resultados obtenidos en el reactor de 50L.

En el mismo tanque se prepararon 2000L de inóculo, para el cual se usó el medio base T&K modificado compuesto por 0.4 g/L de $(\text{SO}_4)_2\text{NH}_4$, K_2HPO_4 y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Tuovinen y Kelly, 1972) y 1.3g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfato ferroso). Para este inóculo se adicionó un cultivo semilla

de 150L. En cuatro días las bacterias cultivadas en 2000L alcanzaron una concentración celular de 3.8×10^7 células/ml, un potencial redox de 584 mV y un alto consumo de Fe^{+2} . Luego de completar el volumen de trabajo hasta 4000L se obtuvo una concentración celular final de 1.9×10^7 células/ml, cantidad de células comúnmente usada en el arranque de este tipo de procesos (Tanaka *et al.*, 2014).

La biooxidación del residuo a escala piloto fue evaluada por un periodo de 18 días. Igual que en las escalas de laboratorio, este montaje se realizó en modo discontinuo con el fin de establecer las cinéticas del proceso. El agua perdida por evaporación fue compensada de forma periódica. No se realizaron réplicas debido a la complejidad y costos de cada montaje (Al final de este capítulo se presenta un esquema en tres dimensiones de la planta piloto Figura 5-20).

A lo largo de este capítulo se empleará la nomenclatura presentada en la Tabla 5-1 para referirse a cada uno de los ensayos de biooxidación.

Tabla 5-1: Nomenclatura designada para cada uno de los ensayos

Escala	Volumen de trabajo	Nomenclatura
Laboratorio	150ml	Matraz-150ml
	5L	STR-5L
	50L	STR-50L VPI
	50L	STR-50L P/V
Piloto	4000L	STR-4000L

Nota: **STR:** Stirred Tank Reactor; **VPI** hace referencia al criterio de escalado velocidad en la punta del impulsor; **P/V** significa potencia por unidad de Volumen.

5.2.6 Monitoreo de bioensayos

Todos los ensayos fueron monitoreados con mediciones periódicas (cada 48 h) de parámetros químicos de gran importancia para este tipo de procesos. Tanto el pH y potencial de óxido-reducción fueron medidos a través de un potenciómetro Hach HQ 40d multi y electrodos de pH y Eh con electrolito Ag/AgCl. La concentración de células en suspensión fue determinada mediante conteo en cámara de Neubauer de acuerdo a Zapata (2004). Se cuantificó la concentración de hierro ferroso (Fe^{+2}) y férrico (Fe^{+3}) a través del tiempo y consecuentemente el consumo de sustrato y generación de producto por el microorganismo. También se midió la concentración de hierro total (Fe total) y sulfatos (SO_4^{-2}) en solución como principales indicadores del proceso global de biooxidación. Las mediciones anteriores se realizaron en un espectrofotómetro

GENESYS UV 10 usando el método colorimétrico de la orto-fenantrolina de acuerdo a la norma ASTM 3500-Fe B para el hierro y el método turbidimétrico según la norma ASTM D516-02 para los sulfatos. Los porcentajes de hierro y sulfatos precipitados fueron determinados al final de cada bioensayo, para ello se emplearon digestiones ácidas usando soluciones 50 ml de HCl 4.8M y de 500 mg de mineral, calentadas durante 30 minutos a $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (Carlson *et al.*, 1992).

Con las concentraciones de hierro y sulfatos estimadas al inicio y final de cada proceso, y haciendo uso de los valores de hierro y azufre obtenidos en la caracterización inicial (capítulo 2), se calcularon los porcentajes de hierro y sulfato total disuelto desde el mineral. El cálculo de estos porcentajes se realizó a través de la ecuación 4.1, donde V es el volumen de trabajo, C_f la concentración final de hierro o sulfato en solución, C_i la concentración inicial de hierro o sulfatos en solución, F es la fracción de hierro o azufre total en el mineral, W la masa de mineral en el medio de cultivo, P el porcentaje de hierro o sulfatos precipitados.

$$\theta(\%) = \left(\frac{V(C_f - C_i)}{F W} \times 100 \right) + P \quad (5.3)$$

5.2.7 Determinación de parámetros hidrodinámicos y potencia

Se establecieron parámetros hidrodinámicos como el Número de Reynolds, encargado de definir el régimen de flujo dentro del reactor; la escala de turbulencia o tamaño de los remolinos Eddy (λ) relacionado con la intensidad de las fuerzas cortantes que se dan en el régimen turbulento sobre los microorganismos; el esfuerzo de corte (τ), definido por Trujillo y Valdéz (2006) como la fuerza por unidad de área aplicada en forma paralela sobre cada célula o partícula biológica y la velocidad de disipación de energía por unidad de masa (ϵ). Adicionalmente se estimó el consumo de potencia en cada uno de los reactores. Las ecuaciones empleadas para la cuantificación de estos parámetros se presentan en el capítulo 4 sección 4.2.7.

La viscosidad de los cultivos fue determinada en el laboratorio de Crudos y Derivados asociado a la Facultad de Minas, mediante un viscosímetro marca Fann modelo 35, donde cada medición requirió cerca de 500ml de muestra y fue realizada según el manual del equipo. La densidad se estableció a través de un picnómetro de 25ml.

5.2.8 Determinación de coeficientes de transferencia de masa (k_La) y consumo de oxígeno

Para la estimación de estos parámetros se realizaron mediciones del OD cada 48 h a través del método dinámico. Los detalles y ecuaciones se presentan en el capítulo 4 sección 4.2.8. Con la sonda que fue medido el OD se determinó la temperatura en el ensayo a nivel de planta piloto.

5.2.9 Caracterización mineralógica del proceso

Luego de realizar un cuarteo se tomaron muestras representativas del mineral recuperado en cada ensayo, estas muestras fueron sometidas a análisis de Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (capítulo 4, sección 4.2.9) y Microscopia electrónica de Barrido (SEM: Scanning Electron Microscopy). Para el análisis en SEM se empleó un equipo marca JEOL JSM 5910 LV, usando modo BSE (Backscattering Electron: electrones retroproyectados), con detector de estado sólido tipo EDS, marca OXFORD, para los análisis microquímicos. Previo a este análisis las muestras fueron montadas en secciones pulidas y metalizadas con oro.

5.2.10 Cianuración de muestras biooxidadas

Este análisis se realizó con el fin de determinar el aumento en la concentración de oro de las colas luego de ser sometidas a los procesos de biooxidación en las diferentes escalas. Las pruebas fueron realizadas por el Instituto de Minerales CIMEX adscrito a la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. Cada medición requirió cerca de 500 gr de muestra mineral, por lo que no fue posible obtener resultados de cianuración para el proceso a escala de matraces (150ml).

5.2.10 Tratamiento de efluentes y recuperación de muestras minerales

Una vez finalizado cada ensayo a nivel de laboratorio, se dejó decantar el mineral dentro del reactor y se retiró la fase líquida, a esta se le adicionó cal hasta alcanzar un pH de 7.0, finalmente fue descartada. El mineral fue recuperado, lavado, filtrado y secado para la realización de los diferentes análisis químicos y mineralógicos.

A nivel de planta piloto, se obtuvieron muestras representativas del mineral biooxidado para los respectivos análisis. Tanto el mineral sobrante como la fase líquida fueron neutralizados en el reactor. Se dejó sedimentar el mineral y se extrajo el líquido. El mineral fue retirado del tanque y

filtrado mediante un tamiz de 33 μ m (malla 400) para remover el agua residual, se dejó secando a temperatura ambiente y se almacenó.

5.3 Resultados

5.3.1 Estimación de velocidades de agitación a nivel de laboratorio

A partir de los resultados del ensayo “Efecto de la velocidad de agitación y control de pH sobre un proceso de biooxidación en reactores de tanque agitado de 5L” (capítulo 4), se estableció que la velocidad de agitación ideal para lograr una oxidación eficiente de los residuos de La Maruja, oscila entre 500 r.p.m y 700 r.p.m. Con base en lo anterior, el escalado a nivel de laboratorio partió con una velocidad de agitación de 500 r.p.m. Se consideró que esta agitación, además de generar altos porcentajes de solubilización, reduce el consumo de potencia al escalar el proceso desde 5L a 4000L. Las velocidades agitación en el reactor de 50L se determinaron con las ecuaciones 5.1 y 5.2, asociadas a los criterios de escalado potencia por unidad de volumen y velocidad en la punta del impulsor constante (Tabla 5-2).

Tabla 5-2: Ensayo, criterios de escalado, diámetros de los reactores y velocidades de agitación para los ensayos en reactores de tanque agitado a nivel de laboratorio

Ensayo	Criterio de escalado	Diámetro impulsor (cm)	Velocidad de agitación (r.p.m)
STR-5L		8.0	500
STR-50L VPI	Velocidad en la punta del impulsor	17.2	240
STR-50L P/V	Potencia por unidad de Volumen	17.2	310

5.3.2 Efecto del escalado a nivel de laboratorio sobre las cinéticas de biooxidación.

En la Figura 5-2 se presentan las cinéticas del pH y potencial redox para los ensayos realizados a nivel de laboratorio. El pH (Figura 5-2A) presentó un aumento inicial no muy pronunciado en cada una de las curvas, alcanzando valores máximos cercanos a 2.0, posteriormente cae de manera continua hasta pH inferiores a 1.45. En el ensayo STR-50L VPI se obtuvieron los valores más bajos de pH, 1.25, seguido por STR-50L P/V (1.33) y STR-5L (1.35); en el ensayo Matraz-150ml el pH mínimo fue de 1.41.

Hasta el sexto día de proceso, el potencial de óxido-reducción (Figura 5-2B) presentó una tendencia creciente en los ensayos STR-50L VPI, STR-50L P/V y STR-5L, logrando potenciales máximos de 582.05 mV, 571.80 mV y 562.78 mV, respectivamente. Una vez alcanzado el punto más alto la tendencia cayó paulatinamente hasta el último día. En el ensayo Matraz-150ml, el mayor potencial fue observado al cuarto día (546.90 mV), a partir del cual comenzó el descenso. STR-50L VPI fue el ensayo con los mejores potenciales, los más bajos se presentaron en Matraz-150ml.

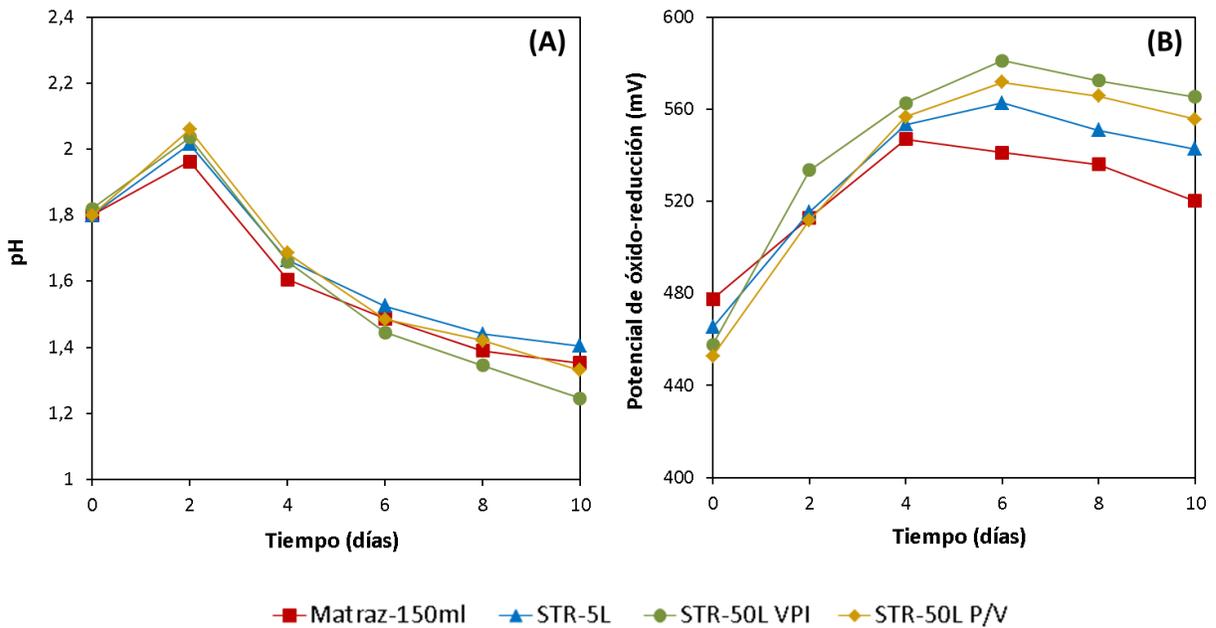


Figura 5-2: pH y potencial de óxido-reducción en los ensayos de biooxidación a escala de laboratorio. (A) pH vs tiempo. (B) Potencial redox vs tiempo.

La Figura 5-3 corresponde al logaritmo de la concentración celular evaluada en los diferentes ensayos. Estas cinéticas se caracterizaron por la aparición inmediata de la fase exponencial. En los ensayos STR-5L, STR-50L VPI y STR-50 P/V la etapa de crecimiento se extendió hasta el cuarto día, momento en el cual la velocidad se tornó casi constante. La fase exponencial del ensayo Matraz-150ml presentó una duración de seis días, no obstante la velocidad comenzó a desacelerar desde el día cuatro. En general los ensayos realizados en reactores de tanque agitado alcanzaron concentraciones celulares del orden de 9.1 , en el ensayo en erlenmeyer este orden ascendió a 9.2 .

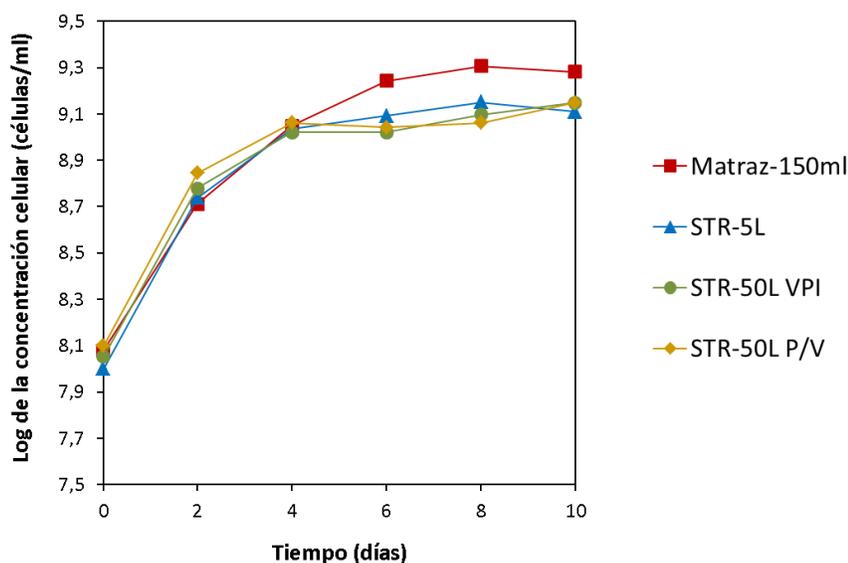


Figura 5-3: Logaritmo de la concentración celular vs tiempo para ensayos de biooxidación a escala de laboratorio

En las cinéticas del Fe^{+2} y Fe^{+3} (Figura 5-4 y Tabla 5-3) fue posible observar el efecto del cambio de escala y condiciones de operación, sobre el consumo de sustrato y generación de producto en los cuatro ensayos a nivel de laboratorio. De manera consistente los ensayos realizados en el reactor de 50L generaron las cantidades más altas de Fe^{+3} , 6937.50 mg/L (28.91 mg/L.h) en STR-50L VPI y 6312.71 mg/L (26.30 mg/L.h) en STR-50L P/V, mientras en los ensayos con menor volumen se alcanzaron concentraciones máximas de 4967.08 mg/L en Matraz-150ml y 5142.08 mg/L en STR-5L. Todas las curvas presentaron comportamientos crecientes desde el inicio del proceso, sin embargo en los ensayos a 5L y 150ml las velocidades de generación fueron menores.

Respecto a la variación del Fe^{+2} , en todos ensayos se observó una disminución significativa entre los días cero y cuatro. Del día cuatro al seis, el comportamiento pareció estabilizarse, y desde el día seis en adelante se apreció un incremento, especialmente en el ensayo Matraz-150ml, donde la concentración final del ion ferroso (409.58 mg/L) supero a la inicial (223.44 mg/L).

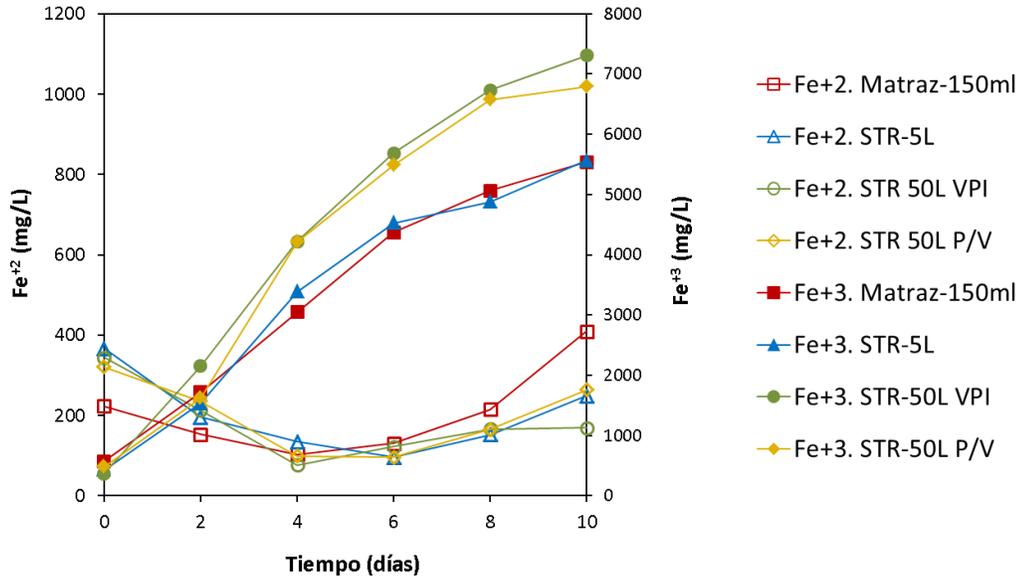


Figura 5-4: Concentración de Fe^{+2} y Fe^{+3} vs tiempo para ensayos de biooxidación a escala de laboratorio.

Tabla 5-3: Velocidades de producción y concentraciones totales generadas de cada producto en los ensayos de biooxidación a nivel de laboratorio

Ensayo	Velocidad de generación (mg/L.h)			Concentración total en solución (mg/L)		
	Fe^{+3}	Fe total	SO_4^{-2}	Fe^{+3}	Fe total	SO_4^{-2}
Matraz-150ml	20.70	20.97	79.57	4967.08	5033.23	19097.56
STR-5L	21.43	20.93	79.51	5142.08	5024.17	19082.32
STR-50L VPI	28.91	28.18	105.01	6937.50	6762.50	25203.25
STR-50L P/V	26.30	26.07	93.54	6312.71	6255.83	22449.19

Nota: Las velocidades de generación de productos se estimaron como el promedio del cambio en concentración de cada uno de los productos cada 48 h, se empleó este método ya que no todos los datos exhibieron tendencias lineales (Arroyave, 2008).

La Figura 5-5 muestra el comportamiento del Fe total y sulfatos en los montajes a nivel de laboratorio. Los datos encontrados para estos dos productos (Tabla 5-3) presentaron tendencias similares a las del Fe^{+3} , donde los ensayos STR-50L VPI y STR-50L P/V alcanzaron las mayores producciones. En las velocidades de generación de Fe total, se aprecia además que la generación de hierro fue 1.29 veces mayor en los ensayos de 50L.

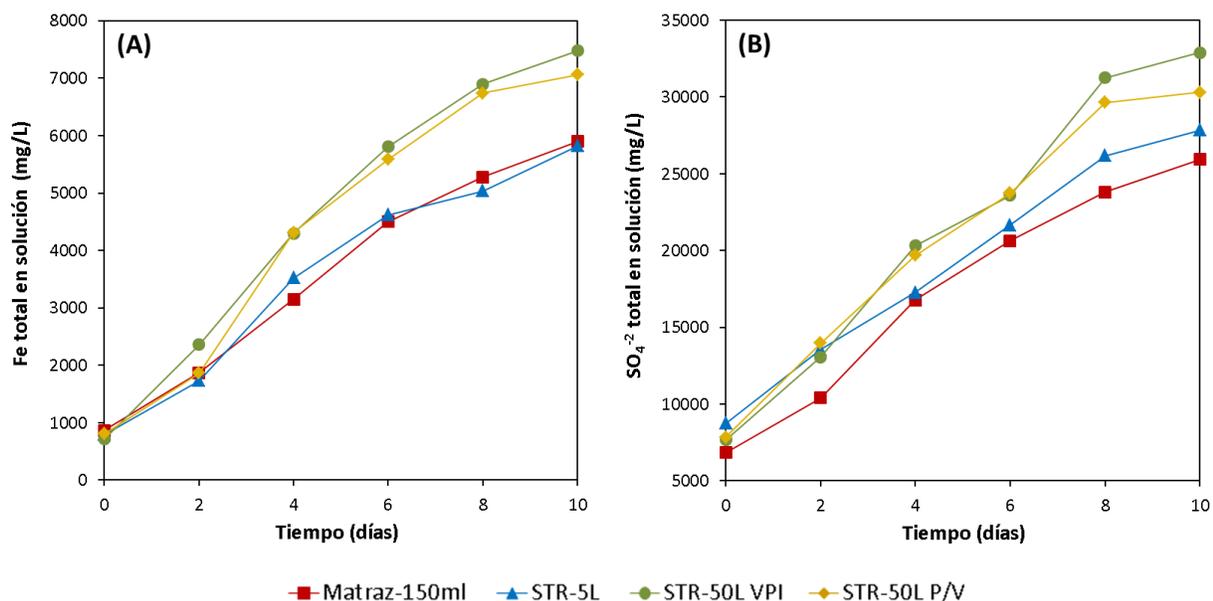


Figura 5-5: Concentración de Fe total y sulfato (SO_4^{2-}) para ensayos de biooxidación a escala de laboratorio. (A) Concentración de Fe total disuelto vs tiempo. (B) Concentración de sulfato disuelto vs tiempo.

Tal como se apreció con el Fe^{+3} y el Fe total, las concentraciones de SO_4^{2-} en todos los cultivos comenzaron a aumentar desde el primer hasta el último día, no obstante en el ensayo STR -50L P/V las cinéticas comenzaron a decaer desde el día ocho.

5.3.3 Estimación de la velocidad de agitación a escala piloto

A nivel de laboratorio se evaluó el efecto de dos criterios de escalado, velocidad constante en la punta del impulsor (VPI) y potencia por unidad de volumen (P/V), en el proceso de biooxidación. Los resultados globales de estos ensayos evidenciaron que a pesar de la similitud entre las cinéticas, el mantener la velocidad del impulsor constante conduce a una mayor solubilización de hierro y sulfato, y altos potenciales de óxido-reducción. Por lo anterior, y teniendo en cuenta el costo energético inherente a altas velocidades de agitación, la agitación del ensayo a nivel de planta piloto fue estimada empleando el criterio VPI (Ecuación 5.2).

Partiendo entonces de una velocidad de agitación de 240 r.p.m, en un reactor cuyo diámetro de impulsor es 17.2 cm, y conociendo que el reactor de 4000L tiene un impulsor de 71.4 cm de diámetro, la velocidad de agitación a escala piloto fue establecida en 60 r.p.m.

5.3.4 Efecto del escalado hasta un nivel de planta piloto sobre las cinéticas de biooxidación.

La Figura 5-6 muestra simultáneamente el comportamiento del pH, potencial redox y el crecimiento celular durante el proceso de biooxidación en planta piloto. El pH (Figura 5-6A), como sucedió a nivel de laboratorio, presentó un incremento inicial seguido de un decrecimiento hasta el final del proceso. No obstante el aumento en este ensayo fue más pronunciado y duradero, alcanzando un valor máximo de 2.23 en el cuarto día; al décimo día, tiempo en que se evaluaron los ensayos en laboratorio, el pH oscilaba alrededor de 1.6, y al final del proceso (a los 18 días) alcanzó a disminuir hasta 1.32.

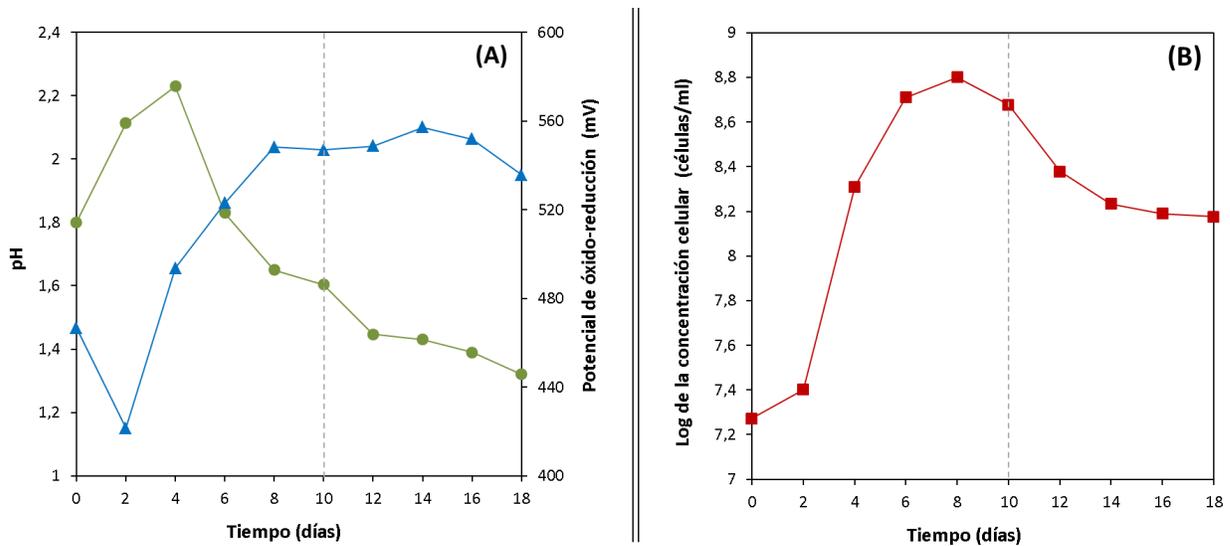


Figura 5-6: pH, potencial de óxido-reducción y logaritmo de la concentración celular para ensayo a escala piloto. (A) ● pH vs tiempo. ▲ Potencial redox vs tiempo. (B) Logaritmo de la concentración celular vs tiempo.

La cinética de potencial redox (Figura 5-6A), a diferencia de las obtenidas a escalas menores, presentó una caída considerable durante los dos primeros días de montaje, logrando un Eh por debajo de los 450 mV. Luego de la caída sobrevino un crecimiento exponencial con una duración de seis días en los cuales el potencial alcanzó valores cercanos a 557 mV. Posteriormente se observó una fase estacionaria de ocho días y una nueva caída no tan marcada en las últimas 48 h.

En la curva de concentración celular (Figura 5-6B), se observó una tendencia inusual para este tipo de cinéticas. En primer lugar se apreció una fase de latencia de dos días, seguida de la fase

exponencial con una duración de aproximadamente seis días, y un valor máximo del orden de 8.8×10^8 en el octavo día. Finalmente la concentración bacteriana decayó de manera gradual desde el día diez hasta el último día del proceso, alcanzado un valor de 10^8 células/ml. Este comportamiento no se presentó en ninguno de los ensayos a escala de laboratorio.

A nivel de planta piloto las concentraciones de Fe^{+2} y Fe^{+3} (Figura 5-7) iniciaron con comportamientos inversos a lo visto en los ensayos en laboratorio. El Fe^{+2} en lugar de disminuir, incremento de forma sustancial en las primeras 48 horas del ensayo, alcanzando un valor máximo de 1061.25 mg/L. En el mismo transcurso de tiempo el Fe^{+3} se redujo 217.5 mg/L. A partir del segundo día, las tendencias de las curvas fueron similares a las descritas para los ensayos de menor volumen (150ml, 5L y 50L), una disminución del Fe^{+2} seguida de un ligero aumento y un crecimiento exponencial del Fe^{+3} . Después de 18 días de proceso se obtuvo una concentración de hierro férrico de 6175.97 mg/L, cercana a la alcanzada en diez días por el ensayo STR-50L P/V. La velocidad de generación de Fe^{+3} a escala piloto se estimó en 25.73 mg/L.h respecto a 28.91 mg/L.h, 26.30 mg/L.h y 21.43 mg/L.h de los ensayos en laboratorio STR-50L VPI, STR-50L P/V y STR-5L.

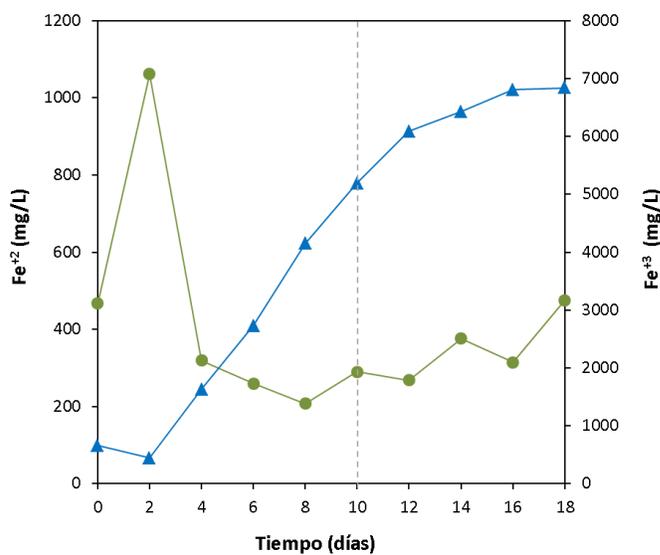


Figura 5-7: Concentración de Fe^{+2} y Fe^{+3} vs tiempo para ensayos de biooxidación a escala piloto.

● Concentración de Fe^{+2} vs tiempo. ▲ Concentración de Fe^{+3} vs tiempo

Contrario a lo ocurrido con el Fe^{+3} , en las cinéticas de Fe total y SO_4^{-2} (Figura 5-8) no se presentaron caídas iniciales en las concentraciones. El comportamiento de Fe total (Figura 8A) fue creciente desde el primer día de proceso, aunque un poco lento durante los primeros dos días. Por

otro lado, el SO_4^{-2} presentó una de fase de latencia, y aunque la concentración de este ion no disminuyó, tampoco aumentó de forma apreciable. Hasta el décimo día se estimaron concentraciones de Fe total y SO_4^{-2} en solución de 4350,69 mg/L y 17471,54 mg/L respectivamente, al final del ensayo estas fueron de 6184.03 mg/L y 23333.33 mg/L, similares a las de los ensayos en 50L. Las velocidades globales de generación de Fe total y sulfato a escala piloto, se determinaron en 18.65 mg/L.h y 79.98 mg/L.h durante los primeros diez días y 25.77 mg/L.h y 92.22 mg/L.h para los 18 días del ensayo.

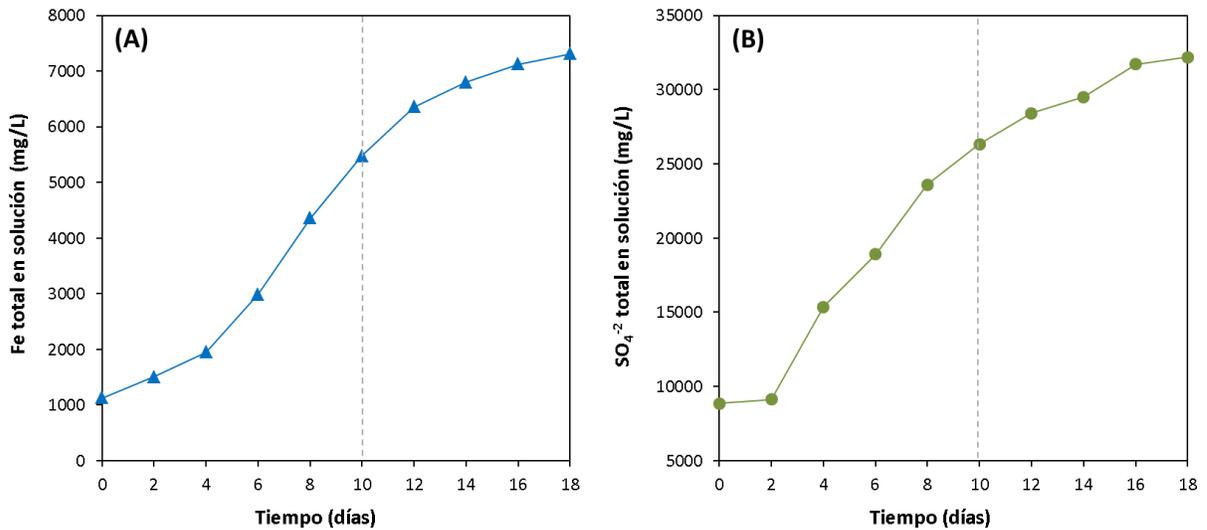


Figura 5-8: Concentración de Fe total y sulfato (SO_4^{-2}) para ensayos de biooxidación a escala piloto. (A) Concentración de Fe total disuelto vs tiempo. (B) Concentración de sulfato disuelto vs tiempo.

Debido a que no fue posible su control, la temperatura del ensayo a escala piloto varió durante todo el proceso (Figura 5-9). La curva obtenida para este parámetro, mostró un comportamiento similar al de la concentración celular, a excepción de la ausencia de una fase lag. Básicamente la temperatura creció de forma exponencial desde el día cero hasta el cuarto, donde alcanzó un valor máximo de 30°C , los valores más bajos (alrededor de 25°C) se presentaron los días 0, 14, 16 y 18.

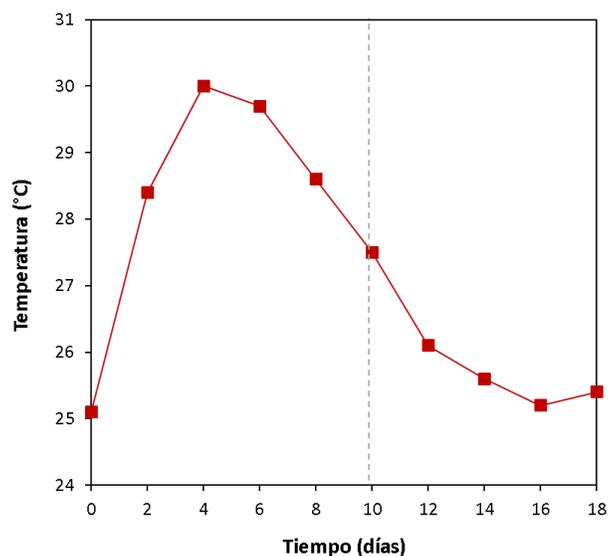


Figura 5-9: Temperatura vs tiempo para el ensayo de biooxidación a escala piloto.

Por otro lado, a partir de la ecuación 5.3, se determinaron los porcentajes totales de Fe y sulfato disuelto durante los ensayos de biooxidación en las diferentes escalas (Figura 5-10); estos porcentajes, incluyen el hierro y sulfato en solución y precipitado. En la Tabla 5-4 se presentan por separado los porcentajes de hierro en solución y precipitado, y sulfatos en solución y precipitados, observándose que la mayor cantidad de hierro y sulfatos precipitados se presenta en el ensayo STR-4000L día 18, y la mayor cantidad de hierro y sulfatos disueltos en solución en el ensayo STR-50L VIP.

Tabla 5- 4: Porcentajes de Fe y SO_4^{2-} en solución y precipitados en todas las escalas de proceso

Tratamiento	Fe en solución (%)	Fe precipitado (%)	SO_4^{2-} en solución (%)	SO_4^{2-} precipitado (%)
Matraz-150ml	20.14	1.97	21.95	3.42
STR-5L	20.10	2.30	21.93	3.33
STR-50L VPI	27.06	2.14	28.97	3.18
STR-50L P/V	25.03	2.53	25.80	4.12
STR-4000L 10 días	17.41	2.45	20.08	3.43
STR-4000L 18 días	24.75	2.76	26.82	4.46

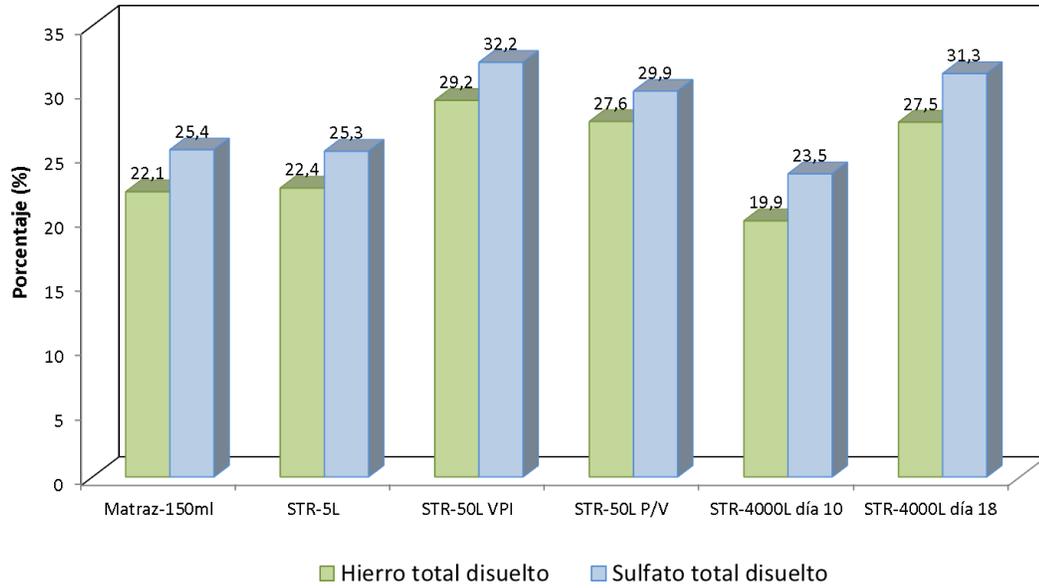


Figura 5-10: Porcentajes de Fe total disuelto y SO_4^{-2} total disuelto en los ensayos de biooxidación en diferentes escalas de proceso.

El propósito de la Figura 5-10 es comparar las diferencias presentadas entre los porcentajes totales de Fe y SO_4^{-2} obtenidos en las diferentes escalas evaluadas. Consecuente con lo descrito en las cinéticas, en este diagrama se observa la similitud entre los porcentajes de Fe y SO_4^{-2} disueltos en los ensayos Matraz-150ml (22.1% y 25.4%) y STR-5L (22.4% y 25.3%). En el proceso a escala piloto evaluado durante diez días, los porcentajes de estos productos (19.9% y 23.5%) se acercaron a los de los ensayos en volúmenes bajos (150ml y 5L). Los mayores porcentajes fueron encontrados en el ensayo SRT-50L VPI (29.2% y 32.2%), seguido por STR-50L P/V (27.6% y 29.9%). El ensayo a nivel de planta piloto alcanzó después de 18 días de proceso, porcentajes de Fe y SO_4^{-2} (27.5% y 31.3%) similares a los logrados en 50L.

5.3.5 Parámetros hidrodinámicos y potencia

La Tabla 5-5 presenta los parámetros hidrodinámicos determinados para cada uno de los ensayos de biooxidación en las distintas escalas. Al igual que en los ensayos presentados en el capítulo 4, la viscosidad corresponde a una viscosidad aparente debido a que la suspensión es un fluido Bingham. En general no se observó un efecto claro de los cambios de escala sobre la densidad y viscosidad, sin embargo el número de Reynolds (Re) aumentó de forma sustancial desde el ensayo en 5L hasta el de 4000L, con una diferencia de un orden de magnitud. Todos los valores de Re estuvieron por encima de 10000 indicando que el régimen de flujo en cada proceso fue turbulento.

Tabla 5-5: Parámetros hidrodinámicos y consumo de potencia

Ensayo	Densidad ρ (Kg/m ³)	Viscosidad μ_a (Pa.s)	Re	ε (W/kg)	λ (μ m)	τ (N/m ²)	Potencia (W)
STR-5L	1058.363	2.81E-03	20088	6.04	41.96	4.24	3.27
STR-50L VPI	1069.175	2.68E-03	46129	3.01	47.80	2.94	15.84
STR-50L P/V	1067.689	2.62E-03	60918	6.50	38.80	4.26	34.08
STR-4000L	1061.600	2.64E-03	205158	0.83	65.55	1.53	321.10

Nota: Para la determinación de estos parámetros se empleó un número de potencia (N_p) igual a 1.63 correspondiente a impulsores de palas planas inclinadas 45° (Mc Cabe, *et al.* 2007).

Usando como referencia los parámetros estimados para el ensayo STR-5L, se apreció que en los ensayos escalados a través del criterio velocidad en la punta del impulsor (STR-50L VPI y STR-4000), los valores de esfuerzo cortante (τ) y velocidad de disipación de energía (ε) disminuyeron, e incrementó el tamaño de los eddys (λ). Escalando con el criterio potencia por unidad de volumen (STR-50L P/V), τ y ε presentaron valores muy similares, y λ disminuyó y el Re incrementó de forma notoria.

Por otro lado, el consumo de potencia en el reactor de 50L varió significativamente dependiendo del criterio de escalado. Manteniendo la velocidad en la punta del impulsor este fue de 15.84 W, y escalando con potencia por unidad de volumen se duplicó (34.08 W). Como era de esperarse el ensayo que presentó el mayor consumo de potencia fue STR-4000L (321.10 W).

5.3.6 Coeficientes de transferencia de masa ($k_L a$) y consumo de oxígeno

En las Figuras 5-11 y 5-12 se presentan el perfil de concentración de oxígeno disuelto (OD), la evolución en la velocidad de consumo de oxígeno y la variación en el OD determinados para los ensayos STR-50L VIP y STR-4000L. Se aclara sin embargo, que los perfiles de OD, las cinéticas de consumo de oxígeno y OD en los demás ensayos, presentaron comportamientos muy similares.

Las Figuras 5-11A y 5-12A representan el comportamiento típico para la concentración de oxígeno disuelto medida por el método dinámico (García y Gómez, 2009). A partir de las curvas, determinadas cada 48 horas en todos los ensayos, se calcularon los coeficientes de transferencia de masa y la cinética de consumo de oxígeno por las bacterias acidófilas. Al comparar los perfiles inherentes a los ensayos STR-50L VIP y STR-4000L, se apreció una marcada diferencia en el tramo b-c, el cual es empleado para la cuantificación del coeficiente de transferencia de masa. En

la Figura 5-12A este trayecto es menos pronunciado y tiene una duración dos veces mayor que el de la Figura 5-11A, es decir, que en el ensayo a escala piloto al sistema le tomo más tiempo alcanzar de nuevo la concentración de saturación.

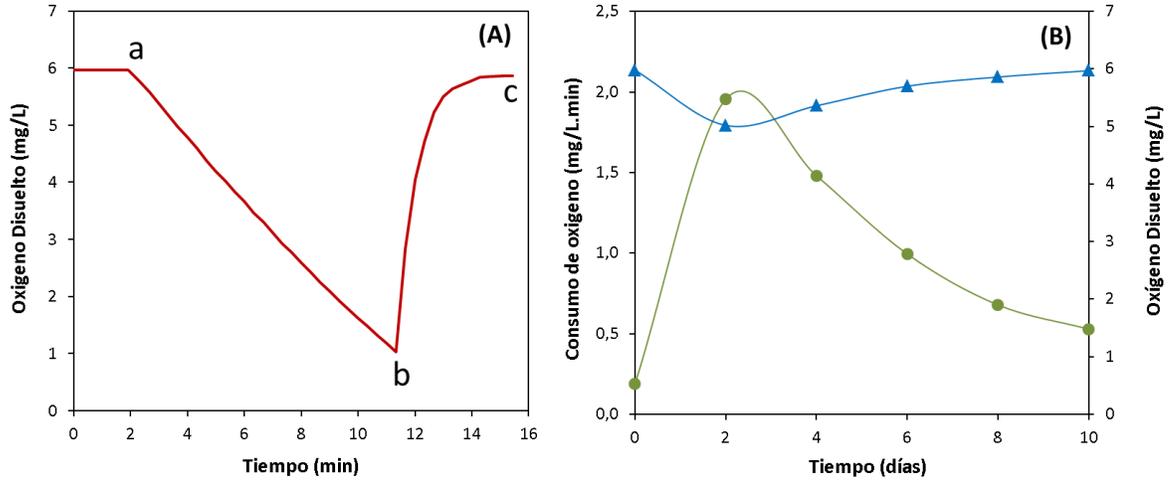


Figura 5-11: Concentración y consumo de oxígeno durante el ensayo STR-50L VPI. (A) Perfil de concentración de OD para determinación de $k_L a$ por el método dinámico, décimo día de proceso. (B) Consumo de oxígeno y OD a través del proceso. ● Velocidad de consumo de oxígeno, ▲ Concentración de OD.

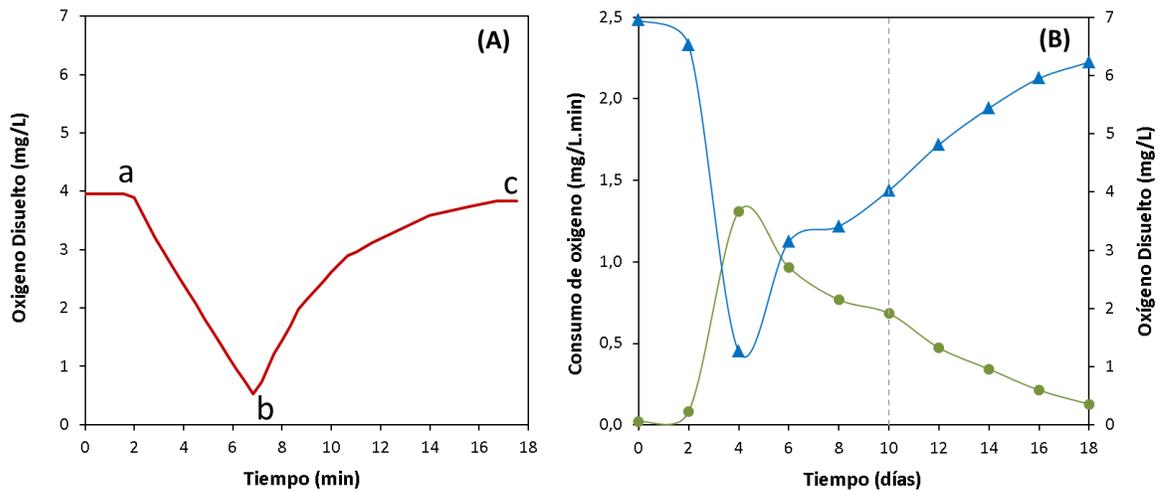


Figura 5-12: Concentración y consumo de oxígeno durante el ensayo a escala piloto. (A) Perfil de concentración de OD para determinación de $k_L a$ por el método dinámico, décimo día de proceso. (B) Consumo de oxígeno y OD a través del proceso. ● Velocidad de consumo de oxígeno, ▲ Concentración de OD.

Las curvas correspondientes al consumo de oxígeno y la variación en el OD en el tiempo (Figuras 5-11B y 5-12B), mostraron un comportamiento inverso para las escalas de proceso STR-50L VPI y STR-4000L, es decir, a medida que aumentó consumo de O₂, disminuyó la concentración de OD. En el ensayo STR-50L VPI, y en general en los ensayos realizados a escala de laboratorio, el máximo consumo de oxígeno se presentó el segundo día de cada montaje, a escala piloto este consumo máximo solo se dio hasta el día cuatro. En todos los ensayos los consumos mínimos se presentaron el primer y último día de proceso. Si bien al inicio las concentraciones de OD fueron altas en todos los ensayos, a medida que transcurre el tiempo esta concentración disminuye considerablemente en el ensayo a escala piloto y se mantiene apreciablemente más baja entre los días 4 y 10.

En la Tabla 5-6 se resumen los coeficientes de transferencia de masa, consumo máximo de oxígeno y concentración mínima de OD, estimados para todas las escalas. El coeficiente de transferencia más bajo se presentó en el ensayo STR-4000L (0.35 min⁻¹), siendo cuatro veces más pequeño que el segundo más bajo, 1.41 min⁻¹ en STR-50L VPI. El k_{La} más alto, 2.03 min⁻¹, se alcanzó en el ensayo STR-50L P/V. En contraste con lo anterior los consumos de oxígeno más altos ocurrieron en los ensayos de STR-50L VIP y STR-4000L, con velocidades de 1.96 mg/L.min y 1.31 mg/L.min. La concentración más baja de OD (1.26 mg/L) se presentó a escala piloto durante el cuarto día de proceso.

Tabla 5-6: Coeficiente de transferencia de masa (k_{La}), concentración mínima de OD y consumo máximo de oxígeno en los ensayos de biooxidación a diferentes

Ensayo	k _{La} (min ⁻¹)	Concentración mínima de OD (mg/L)	Consumo máximo de oxígeno (mg/L.min)
STR-5L	1.99	5.79	1.14
STR-50L VPI	1.41	5.02	1.96
STR-50L P/V	2.03	6.00	1.03
STR-4000L	0.35	1.26	1.31

5.3.7 Caracterización mineralógica del proceso de biooxidación

A continuación se presentan los resultados inherentes a la mineralogía de los residuos biooxidados en las diferentes escalas. Para iniciar, en la Figura 5-13 se aprecian los difractogramas asociados al ensayo STR-4000L. De dicho ensayo se analizaron por DRX muestras correspondientes a los días 0, 10 y 18. Se observó que con el transcurso del tiempo aparecen nuevos picos todos relacionados

con la jarosita ($\text{KFe}_3^{3+}(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$). En los difractogramas obtenidos para las muestras biooxidadas a nivel de laboratorio los resultados fueron similares.

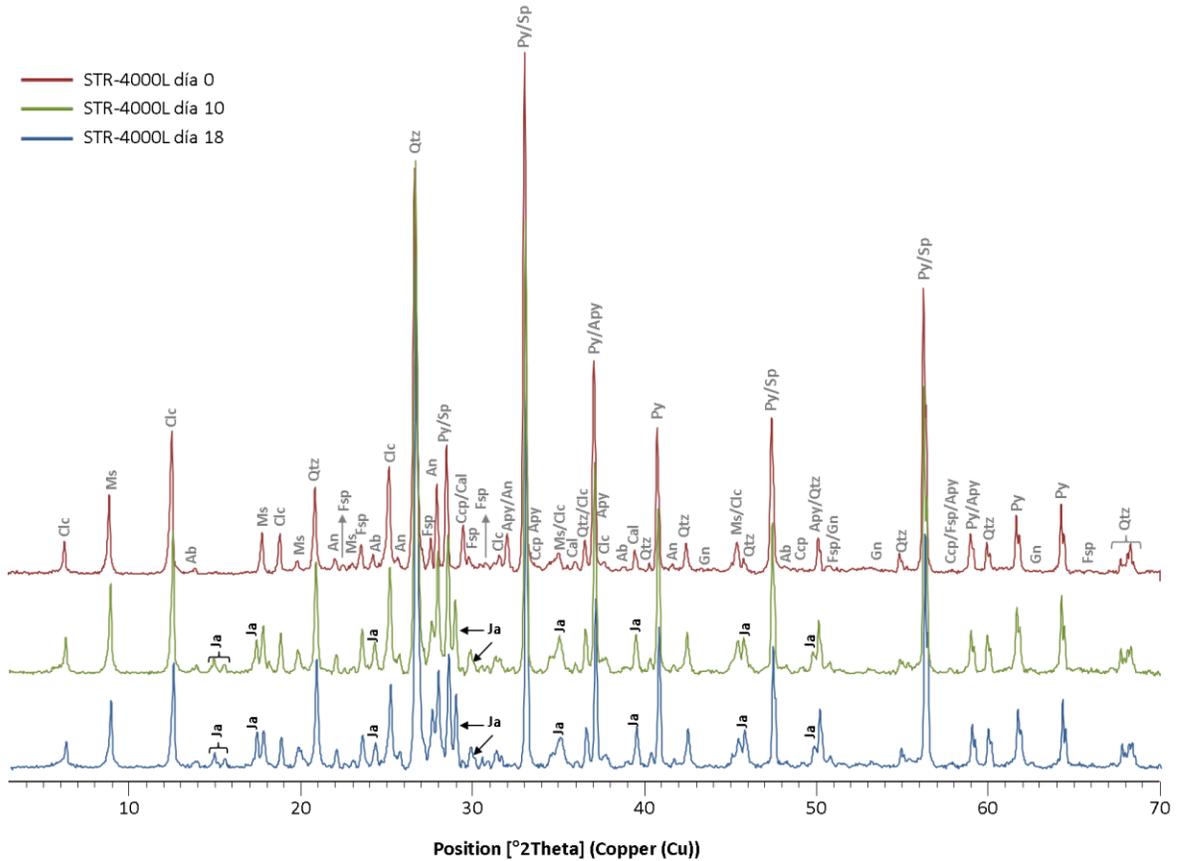


Figura 5-13: Difractogramas para el ensayo de biooxidación a escala piloto. Nomenclatura de fases minerales: albita (Ab), anortita (An), arsenopirita (Apy), calcita (cal), calcopirita (Ccp), clinocloro (Clc), cuarzo (Qtz), brushita (Bsh), esfalerita (Sp), feldespato (Fsp), galena (Gn), jarosita (Ja), moscovita (Ms), pirita (Py).

Además de la aparición de nuevos picos, se observó una disminución en intensidad de picos importantes asociados a la pirita (33°) y un aumento en el pico más representativo del cuarzo (26°). En la Figura 5-14 se aprecia además, que el decrecimiento en los picos de pirita, particularmente el ubicado en 33° , varía dependiendo del ensayo, donde la caída más drástica se observa en el ensayo STR-50L VPI (Figura 5-14C), y los decrecimientos menos pronunciados en los ensayos Matraz-150ml (Figura 14A) y STR-4000L día 10 (Figura 5-14E).

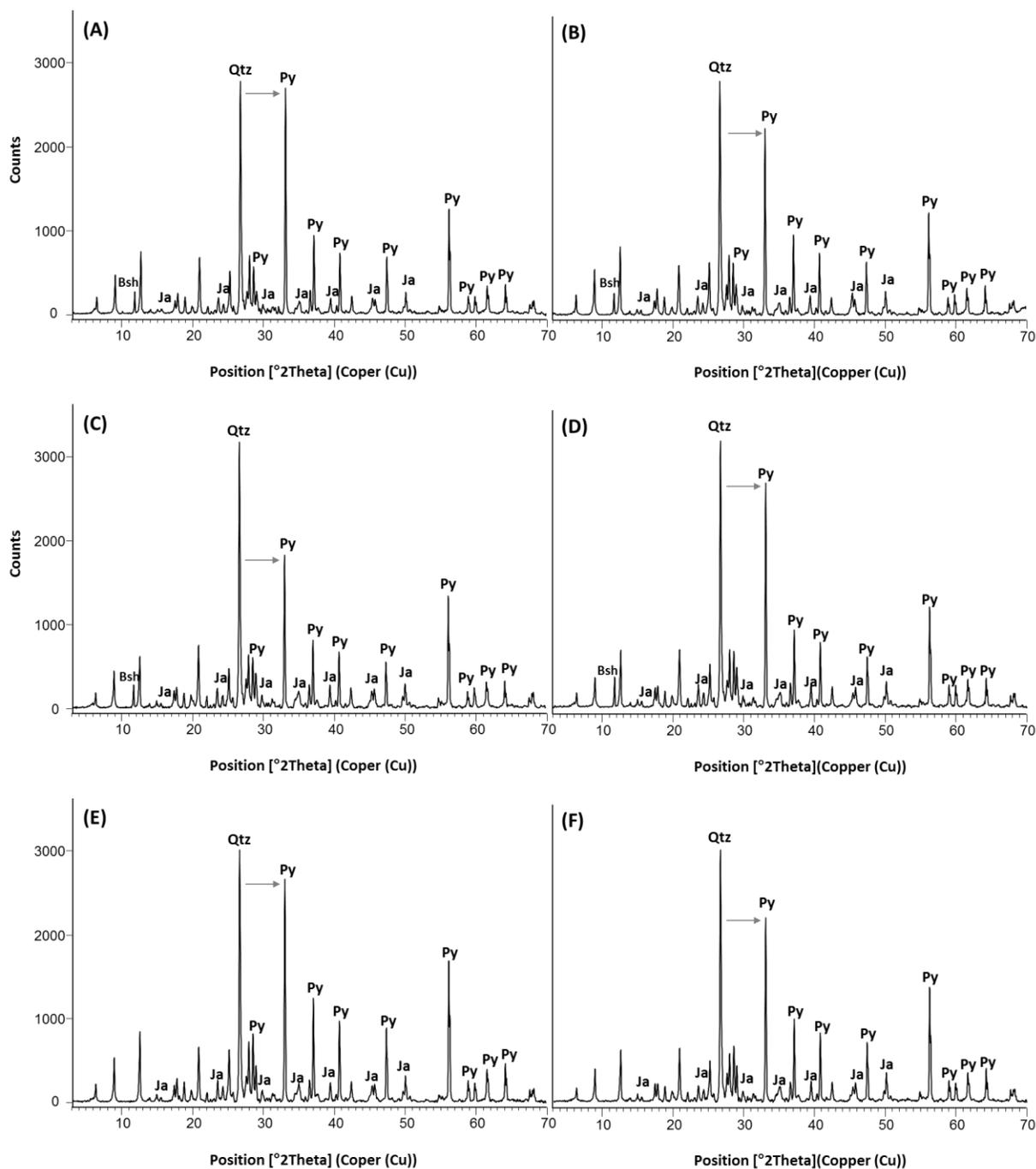


Figura 5-14: Difractogramas para los ensayos realizados en diferentes escalas de proceso. (A) Matraz-150ml. (B) STR-5L. (C) STR-50L VPI. (D) STR-50L P/V. (E) STR-4000L día 10. (F) STR-4000L día 18. Brushita (Bsh), Jarosita (Ja), pirita (Py), cuarzo (Qtz)

En la Figura 5-14 se observa también la aparición de un pico, aproximadamente en la posición 11.7° , asociado al mineral brushita, esta fase solo se presentó en los ensayos realizados a nivel de laboratorio.

Consecuente con lo observado en la Figura 5-4, la cuantificación de las fases (Tablas 5-7 y 5-8) indicó que la menor cantidad de pirita se presentó en el ensayo STR-50L-VPI, con una disminución del 44.4% respecto a la muestra sin tratar, y la mayor concentración se encontró en el ensayo STR-4000L día 10. El ensayo con la más alta concentración de jarosita fue STR-4000L día 18, la más baja fue hallada en STR-4000L día 10. A medida que disminuyó la cantidad de pirita se concentró la ganga, que incluye los minerales cuarzo, moscovita, clinocloro, feldespato, albita, anortita y calcita. Las cantidades de brushita y otros sulfuros (esfalerita, arsenopirita, galena y calcopirita) presentaron comportamientos muy variables respecto al tipo de ensayo.

Tabla 5-7: Proporciones relativas de minerales y fases formadas determinadas a partir de DRX

Muestra	Ganga (%)	Sulfuros (%)		Precipitados (%)	
		Pirita	Otros	Jarosita	Brushita
Sin tratar	64.14	34.14	1.81	0.00	0.00
Matraz-150ml	66.13	24.45	0.41	5.91	3.08
STR-5L	63.32	24.66	0.83	6.37	4.58
STR-50L VPI	66.63	18.97	2.01	6.32	6.07
STR-50L P/V	66.33	20.66	1.65	6.37	5.15
STR-4000L día 10	68.60	25.30	1.90	4.10	0.00
STR-4000L día 18	68.71	21.90	1.60	7.70	0.00

Tabla 5-8: Proporciones relativas de otros sulfuros determinadas a partir de DRX.

Muestra	Otros sulfuros (%)			
	Arsenopirita	Calcopirita	Esfalerita	Galena
Sin tratar	0.29	0.43	1.01	0.08
Matraz-150ml	0.07	0.22	0.11	0.00
STR-5L	0.00	0.66	0.06	0.11
STR-50L VPI	0.21	1.76	0.03	0.01
STR-50L P/V	0.33	1.00	0.23	0.10
STR-4000L día 10	0.60	1.00	0.20	0.10
STR-4000L día 18	0.58	0.71	0.30	0.10

Los análisis por FTIR arrojaron los espectros que se presentan en las Figuras 5-15 y 5-16. En la Figura 5-15, correspondiente a los espectros del ensayo a escala piloto, se observa que a medida que transcurre el tiempo, comienza a aparecer dos pequeñas bandas en 1191 cm^{-1} y 1085 cm^{-1} , e

incrementa la intensidad, aunque no de forma significativa, de la banda en 628 cm^{-1} , estas tres bandas corresponden a vibraciones y estiramientos de los grupos funcionales asociados a la jarosita. Las demás bandas características de éste espectro están asociadas a cuarzo, moscovita y pirita, minerales encontrados previamente mediante DRX en la caracterización mineralógica inicial del residuo (capítulo 2).

La Figura 5-16 presenta de forma simultánea los espectros de FTIR para las muestras de mineral procedentes de las distintas escalas de proceso (laboratorio y piloto). Realmente no se apreciaron diferencias significativas. En general la intensidad y cantidad de bandas fue muy similar para todas las muestras.

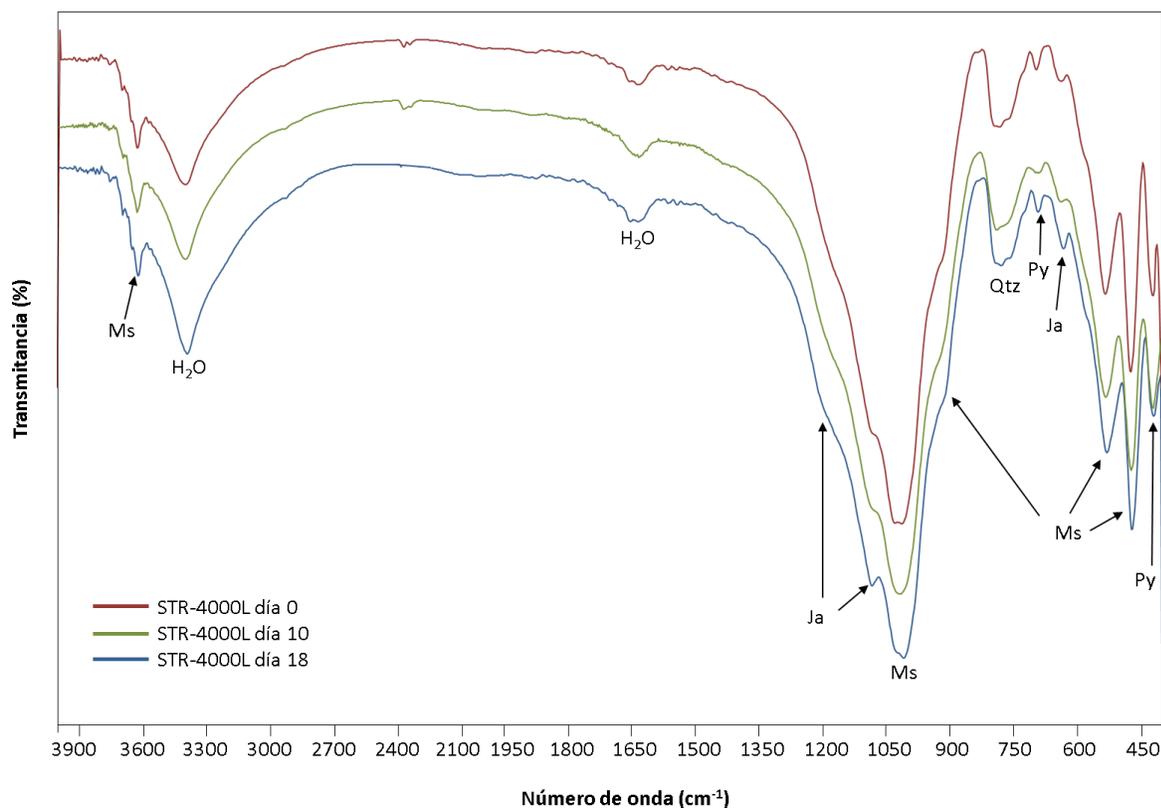


Figura 5-15: Espectros de FTIR para el ensayo de biooxidación realizado a escala piloto. Cuarzo (Qtz), jarosita (ja), moscovita (Ms), pirita (Py).

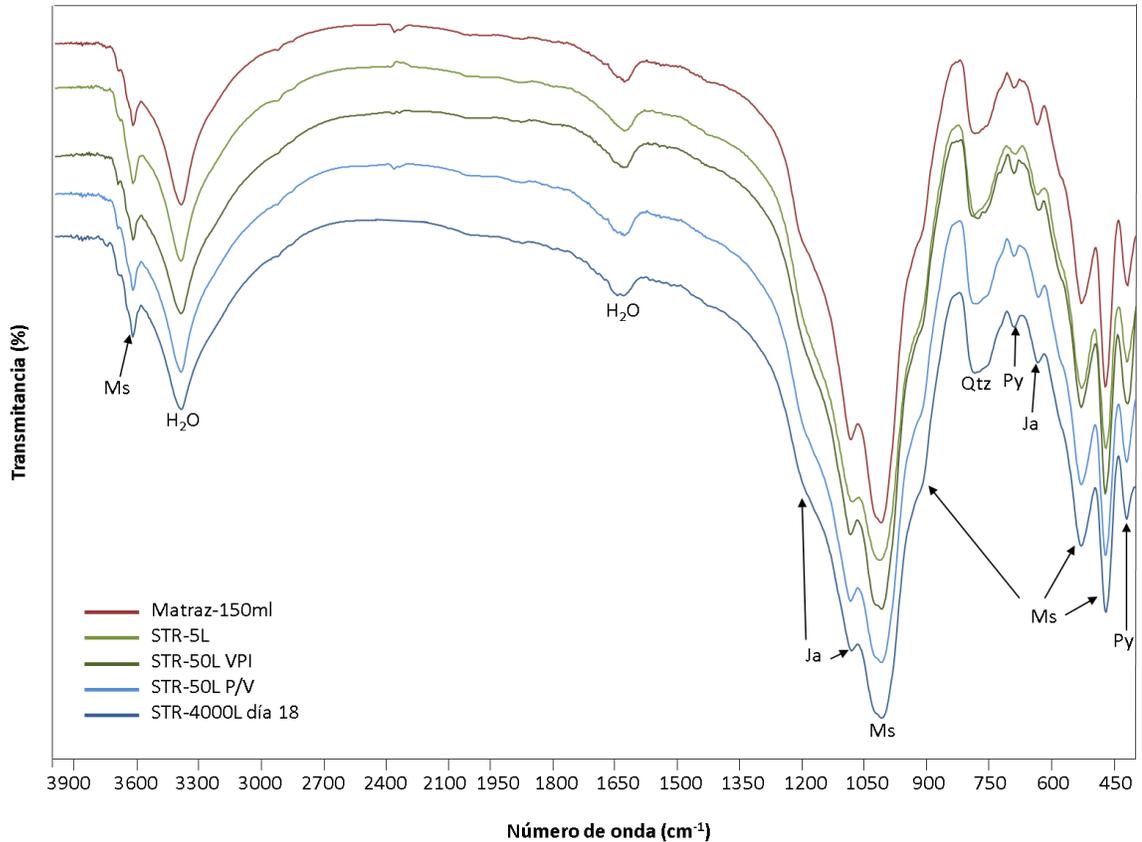
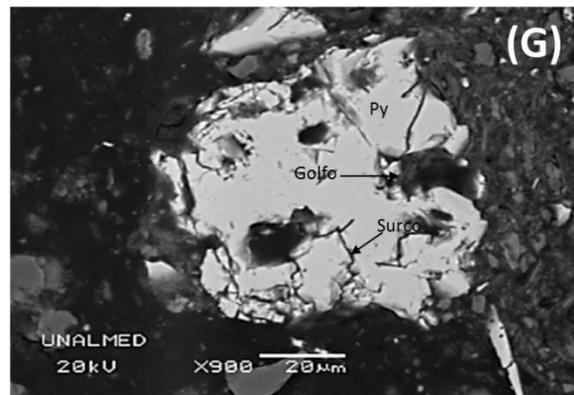
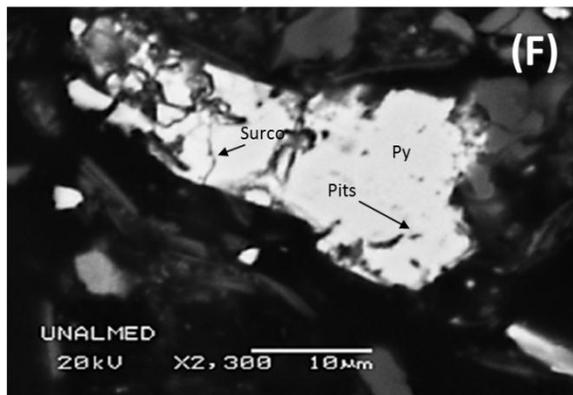
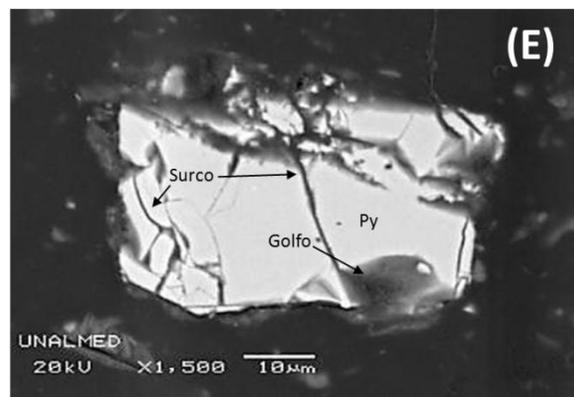
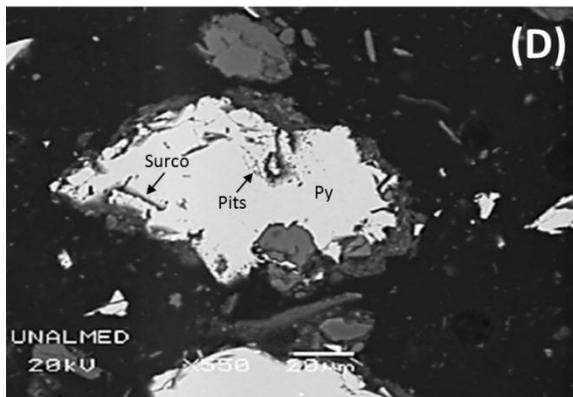
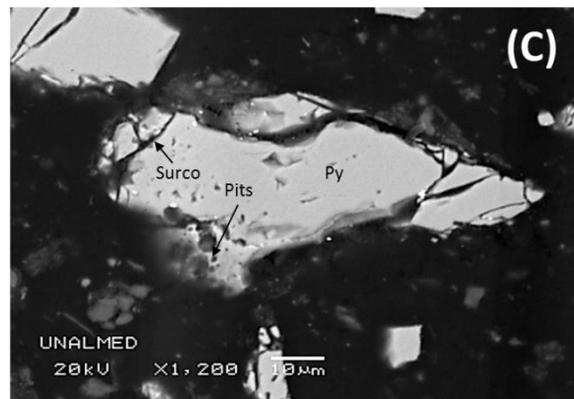
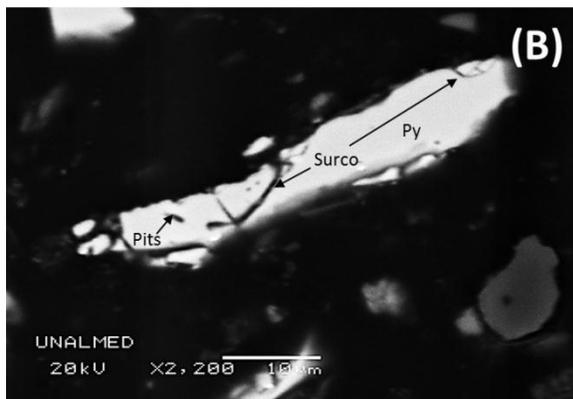
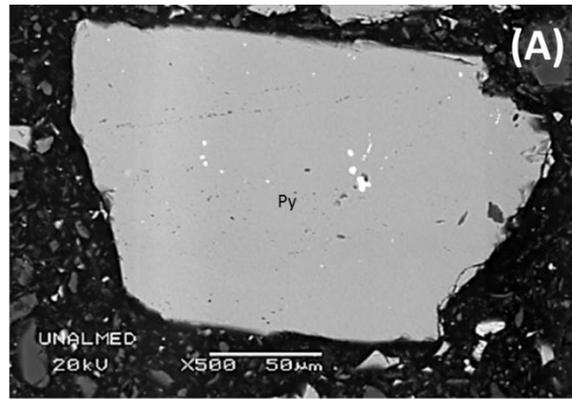


Figura 5-16. Espectros de FTIR para los ensayos de biooxidación realizados a diferentes escalas de proceso. Cuarzo (Qtz), jarosita (ja), moscovita (Ms), pirita (Py).

En las micrográficas obtenidas por SEM (Figura 5-17), se observó que independientemente del tipo o procedencia de la muestra, todos los granos de pirita presentaron características inherentes a su oxidación, es decir, pits, surcos o golfos de corrosión. Estas características se hicieron bastante evidentes cuando se comparó con un grano de pirita proveniente del mineral sin tratar, el cual no presentó alteraciones significativas en su superficie (Figura 5-17A).

La Figura 5-18, presenta micrográficas adicionales asociadas a cada uno de los ensayos de biooxidación. Estas imágenes exhiben la formación de aglomerados en todas las muestras, los cuales, de acuerdo a los análisis microquímicos, se caracterizaron por la presencia de altas concentraciones de Si, cantidades variables de Fe, Al, K y S, y bajas concentraciones de Na y Mg en los ensayos STR -50L VPI y STR-50L P/V respectivamente (Figuras 5-18C y 5-18D)

Figura 5-17: Micrográficas de SEM correspondientes a pirritas biooxidadas durante las distintas escalas de proceso. (A) Pirrita sin biooxidar. (B) Matraz-150ml. (C) STR-5L. (D) STR-50L VPI. (E) STR-50L P/V. (F) STR-4000L día 10. (G) STR-4000L día 18.



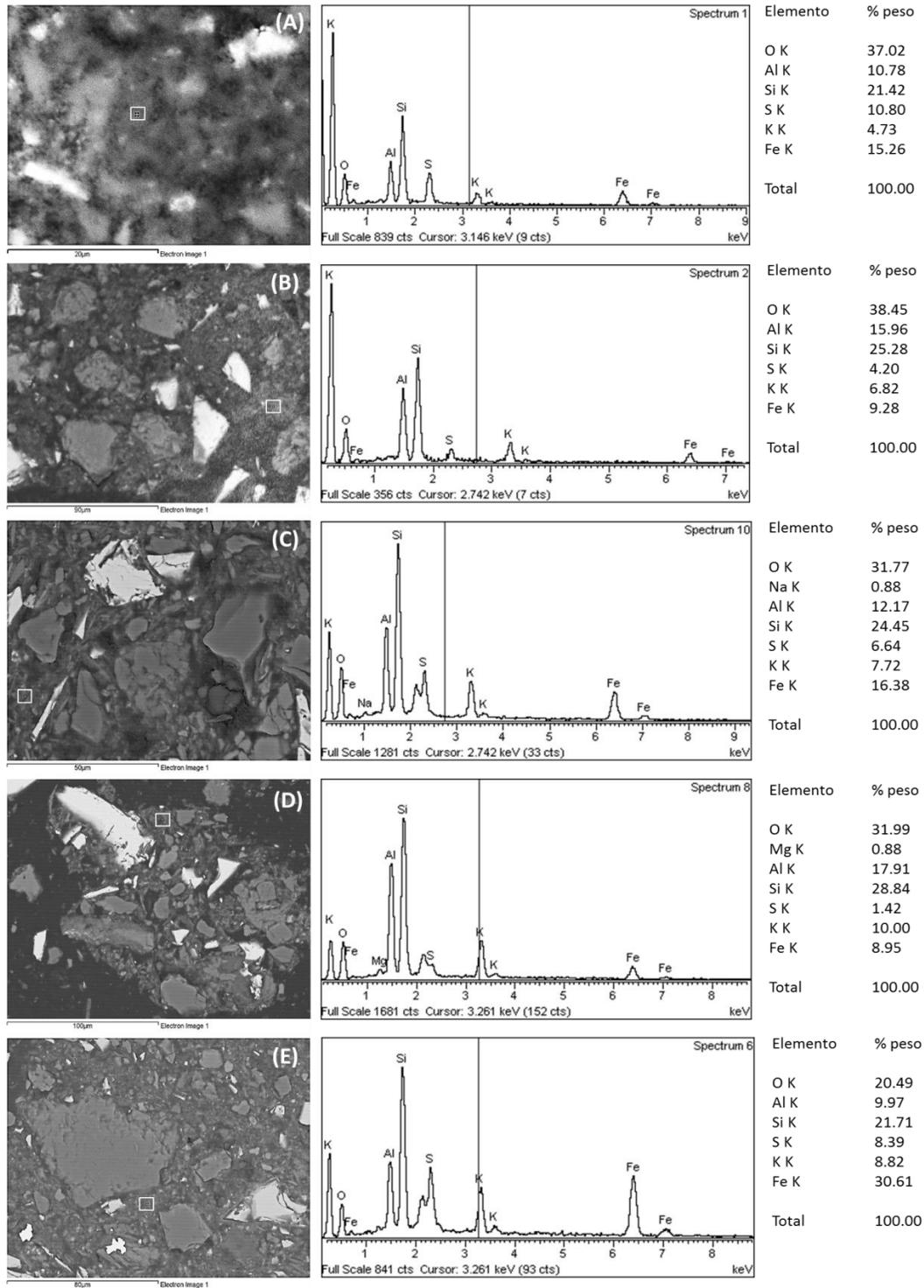


Figura 5-18: Micrografías de SEM para las distintas escalas de proceso. (A) Matraz-150ml. (B) STR-5L. (C) STR-50L VPI. (D) STR-50L P/V. (E) STR-4000L.

5.3.8 Cianuración de muestras biooxidadas

En la Tabla 5-9 se presentan los resultados de cianuración de las muestras biooxidadas en las diferentes escalas de proceso, de una muestra de mineral sin tratar y de uno de los controles abióticos presentados en el capítulo 4. Los mejores resultados de extracción de oro se apreciaron en el ensayo STR-50L VIP, con un porcentaje total de 27.8%; después de éste, las mayores recuperaciones fueron obtenidas desde los ensayos STR-50L P/V y STR-4000L, día 10. En el ensayo de biooxidación STR-4000L día 18 se apreció la más baja recuperación con un 13.7%. En general la recuperación del metal aumentó considerablemente en las muestras biooxidadas respecto a la de la muestra sin biooxida y al control abiótico. El consumo de cianuro presentó una relación inversamente proporcional al porcentaje de recuperación, donde los mayores consumos del reactivo se presentaron para la muestra sin tratar y el ensayo STR-4000L día 18.

Tabla 5-9: Resultados de cianuración para las muestras biooxidadas y la muestra sin tratar

Muestra	Oro recuperado (%)	Consumo de cianuro (Kg/Ton)
Sin tratar	1.1	0.5
Control abiótico STR-5L	1.7	2.4
STR-5L	15.8	2.6
STR-50L VPI	27.8	0.8
STR-50L P/V	18.3	3.9
STR-4000L día 10	18.3	3.1
STR-4000L día 18	13.7	4.2

Nota: El control abiótico STR-5L corresponde al Blanco 500 r.p.m sin control del pH, cuyas cinéticas y resultados de oxidación se presentan en el capítulo 4.

5.3.9 Neutralización de residuos generados a escala piloto.

Al finalizar del proceso de biooxidación en el reactor de 4000L, tanto el líquido como el mineral sobrante fueron neutralizados para proceder con su disposición final. Para la neutralización se emplearon aproximadamente de 100 kg de cal. Una vez se descartó la fase líquida, se tomó una muestra representativa del mineral neutralizado, se dejó secar y se analizó a través de difracción de rayos X (DRX), resultados que se presentan en la Figura 5-19. La cuantificación de las fases presentes en el residuo biooxidado y posteriormente neutralizado se presentan en la Tabla 5-10.

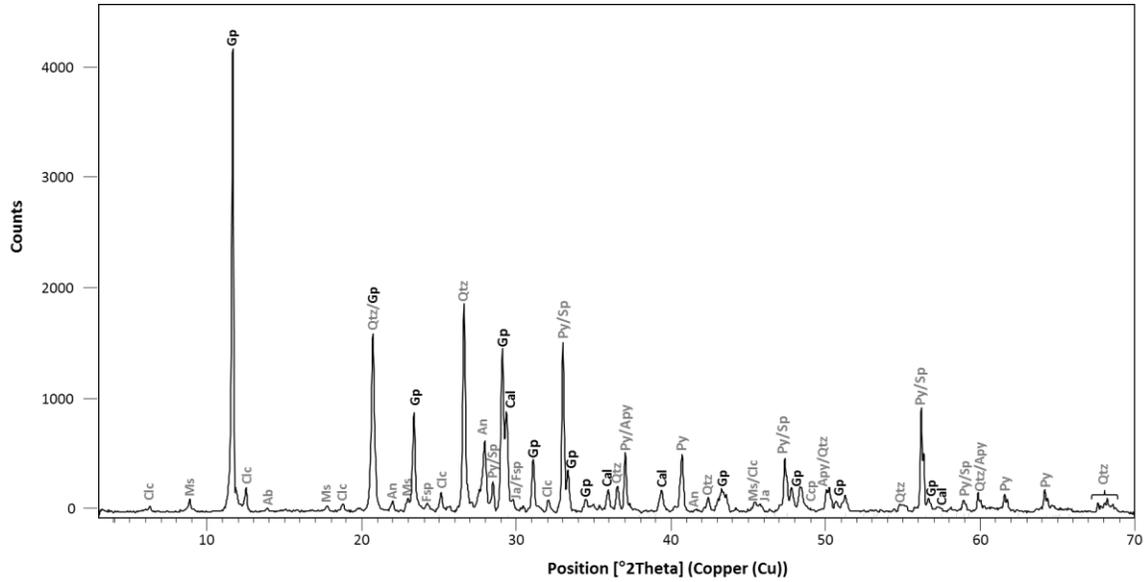


Figura 5-19: Difractograma de muestra neutralizada y recuperada del tanque de biooxidación de 4000L. albita (Ab), anortita (An), arsenopirita (Apy), calcita (cal), calcopirita (Ccp), clinocloro (Clc), cuarzo (Qtz), brushita (Bsh), esfalerita (Sp), feldespato (Fsp), galena (Gn), jarosita (Ja), moscovita (Ms), piritita (Py), yeso (Gp)

El difractograma de la muestra biooxidada y posteriormente neutralizada con cal, muestra la aparición de una nueva fase catalogada como yeso. El pico más representativo del yeso ubicado en 11.8° presenta una intensidad considerablemente mayor respecto a los demás picos. Se observa también la disminución en intensidad del pico de la piritita localizado a 33°. Mediante la cuantificación de las fases se estimó que la concentración aproximada de yeso fue de 40.22%, seguida por el cuarzo (18.67%), la piritita (14.70%) y la calcita (8.79%)

Tabla 5-10: Proporciones relativas de fases minerales presentes en el residuo neutralizado

Concentración de fases minerales (%)						
Piritita	Esfalerita	Arsenopirita	Calcopirita	Galena	Jarosita	Yeso
14.70	0	0.05	0.08	0	0.36	40.22
Cuarzo	Clinocloro	Albita	Moscovita	Feldespato	Calcita	Anortita
18.67	0.87	5.41	3.29	1.88	8.79	5.68

5.4 Discusión

En el presente capítulo se evaluó la biooxidación de residuos mineros en diferentes escalas de proceso. Como se pudo apreciar en la metodología, el montaje de los ensayos a lo largo de cada volumen de trabajo requirió del cambio en ciertas condiciones. A nivel de laboratorio, específicamente en 150ml, además de usar una configuración de reactor diferente (erlenmeyers o matraces), fue posible esterilizar en autoclave todos los implementos de trabajo y se emplearon reactivos grado analítico y agua destilada. Al pasar a reactores de tanque agitado de 5L, se cambió la forma de homogenizar la suspensión, la esterilización de los reactores se realizó través de compuestos químicos como hipoclorito, y hubo un suministro permanente de oxígeno. En 50L, usar agua destilada no fue una opción debido al gran volumen requerido, y la esterilización del medio y el mineral no se pudo garantizar. A escala piloto, emplear reactivos grado analítico resultó inviable por las cantidades requeridas y los costos asociados a este tipo de reactivos, por lo que se emplearon reactivos grado comercial y agua corriente, la esterilización fue prácticamente imposible, tampoco se controló la temperatura. El tipo de cambios previamente mencionados, en ocasiones son inevitables en el escalado debido a la complejidad y costos que supone aumentar el volumen de un proceso con el fin último de incrementar la productividad, sin embargo también pueden ser los responsables de las diferentes eficiencias de biooxidación entre escalas (Quintero, 1981; Junker, 2003).

5.4.1 Efecto del escalado sobre las cinéticas de biooxidación

De manera general e independiente del volumen de trabajo, el comportamiento de las cinéticas a escala de laboratorio fue muy parecido, aumentos graduales en los valores del potencial redox, concentración celular, Fe^{+3} , Fe total y SO_4^{-2} en solución, así como incrementos iniciales del pH, seguido de un decrecimiento hasta el final de cada proceso. A escala piloto sin embargo, se presentaron en la mayoría de las cinéticas fases de latencia de aproximadamente 48 horas. Si bien el arranque en planta piloto no fue ideal, se puede decir que el proceso en cada escala fue relativamente favorable para la biooxidación de los residuos de La Maruja (Rodríguez *et al.*, 2003; Zapata, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Caicedo *et al.*, 2012).

Como es sabido los aumentos iniciales en el pH (Figuras 5-2A y 5-6A) , pueden deberse a tres razones, el consumo de ácido por las fases silicatadas y el carbonato calcita , el consumo de ácido por los monosulfuros, y al consumo de H^+ por las bacterias durante la oxidación del Fe^{+2} (García *et*

al., 1995; Stromberg y Banwart, 1999; Sand *et al.*, 2001; Mason y Rice, 2002; Da Silva, 2004; Sampson *et al.*, 2005; Ballester, 2005; Gómez y Cantero, 2005; Carretero *et al.*, 2011). En los ensayos aquí presentados se considera que cada una de estas razones influyó en alguna medida. Por un lado los controles abióticos de los ensayos en capítulos anteriores aumentaron considerablemente el pH, indicando un consumo químico de ácido asociado a los minerales presentes en el residuo de La Maruja. Adicionalmente el aumento del pH coincide en el tiempo con los decrecimientos más importantes del Fe^{+2} y si este ion ferroso es oxidado por las bacterias necesariamente hay un consumo de hidrogeniones. En los ensayos a nivel de planta piloto este aumento del pH fue más prolongado y alto. Se cree que durante los dos primeros días el incremento estuvo determinado por el consumo químico de las fases consumidoras de ácido en el mineral, siendo que durante este lapso el Fe^{+2} en lugar de oxidarse aumentó su concentración, sugiriendo que las reacciones de oxidación biológicas poco o nada influyeron en el pH. No obstante el aumento hasta al máximo pH entre los días dos al cuatro, si pudo ser consecuencia de la acción microbiana, donde gran parte del Fe^{+2} generado en las primeras 48 horas fue biooxidado en un 69%. Por otro lado y como se sugirió en los ensayos de agitación (capítulo 4), la acidificación posterior de todos los ensayos en el escalado fue debida a la oxidación de la pirita cuyo subproducto es ácido sulfúrico (Dew *et al.*, 1997; Schippers *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008), esta acidificación en ninguno de los ensayos superó el intervalo tolerado por *A. ferrooxidans*, 1.2 -2.0 (Battaglia *et al.*, 1994; Dew *et al.*, 1997; Valdés *et al.*, 2008; Rivadeneira, 2011).

Las cinéticas de los parámetros potencial redox, crecimiento celular, consumo de Fe^{+2} y generación de Fe^{+3} (Figuras 5-2B, 5-3, 5-4, 5-6 y 5-7) indicaron actividad microbiana, aunque su eficiencia varió de acuerdo a las escalas o volúmenes de trabajo. En el reactor de 50L se apreció una actividad microbiana alta, superior 1.3 veces a la observada en los reactores de menor volumen. En los reactores de 150ml y 5L la actividad fue muy parecida a la presentada durante la adaptación (capítulo 3) y los ensayos de agitación y pH (capítulo 4). A nivel piloto se presentaron eficiencias intermedias, siendo que hasta el día 10 se alcanzaron resultados similares a los ensayos en 150ml y 5L, y para el final del proceso donde las cinéticas comenzaron a caer (día 18), las concentraciones totales de Fe^{+3} fueron semejantes a las obtenidas en el reactor de 50L. Correlacionados con los datos del Fe^{+2} , Fe^{+3} y potencial redox, se presentaron las velocidades de disolución y concentraciones de Fe total y SO_4^{-2} (Figuras 5-5 y 5-8), donde las mayores solubilizaciones ocurrieron en los ensayos de 50L y 4000L (día 18). Se considera que esta actividad diferencial entre escalas fue una consecuencia de las condiciones cambiadas entre escalas.

A nivel de matraces, se observaron los más bajos potenciales de óxido-reducción, relacionados a su vez con una acumulación de Fe^{+2} . Dada la importancia del oxígeno en un proceso aerobio, y en especial en una biooxidación donde participa como principal aceptor de electrones en las reacciones redox del hierro (Das *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2004), es posible que la acumulación del ion ferroso sea consecuencia de una baja disponibilidad de oxígeno en el sistema. Se conoce que el trabajo con erlenmeyers ofrece múltiples ventajas, entre ellas su economía y la posibilidad de evaluar simultáneamente múltiples experimentos, no obstante el suministro de oxígeno puede llegar a ser limitado si la demanda microbiana excede la capacidad de transferencia a través de la interfaz gas-líquido (Veglio *et al.*, 1998; García y Gómez, 2009). Para este ensayo se encontró además el mayor crecimiento celular; en principio resulta ilógico un alto crecimiento microbiano acompañado de una acumulación de Fe^{+2} y una velocidad de generación de Fe^{+3} considerable. Pues bien, Rohweder *et al.* (2003) y Valdés *et al.* (2008), reportan que *A. ferrooxidans* bajo condiciones limitadas de oxígeno en lugar de oxidar el Fe^{+2} , reduce Fe^{+3} , haciendo posible que en el sistemas de biooxidación se den dos fenómenos, las bacterias con acceso al oxígeno oxidan el Fe^{+2} y aquellas sometidas a condiciones de anaerobiosis, probablemente las adheridas al mineral que no se alcanza a suspender, reducen el Fe^{+3} , estos dos procesos en conjunto darían lugar al incremento del Fe^{+2} en el sistema, la producción de Fe^{+3} y al crecimiento celular. Finalmente y pese a las limitaciones que pudieron presentarse a nivel de erlenmeyer, las cinéticas y velocidades de generación de Fe total y SO_4^{-2} , fueron muy similares a las obtenidas en el reactor de 5L, por lo que a nivel global la disolución del mineral no resultó significativamente afectada.

De acuerdo a Doran (1998), es común que el aumento en escala conduzca a una pérdida o variación en el rendimiento del proceso, pérdidas que pueden o no recuperarse. En el presente escalado se observó un comportamiento contrario, especialmente a nivel de laboratorio. Aunque se cambiaron algunas condiciones, como el tamaño de los reactores, la pureza de los medios, condiciones de esterilidad, entre otras, parece ser que estos cambios trajeron consigo efectos positivos sobre la biooxidación del residuo. Como observa en la Figura 5-10 el porcentaje de Fe total y SO_4^{-2} solubilizados fue mucho mayor en los reactores de 50L comparado con los reactores de menor volumen.

Como se mencionó previamente, una de las variaciones más importantes entre ensayos fue el cambio de la calidad del agua. Se conoce que el agua potable o de grifo presenta características fisicoquímicas que pueden dar lugar a fenómenos de corrosión en la infraestructura hidráulica (Trujillo *et al.*, 2008). La corrosión se define como una oxidación acelerada y continua que

desgasta y afecta la integridad física de los objetos (Cortes y Ortiz, 2004), y en caso de un proceso de biooxidación estos objetos pueden ser los granos de sulfuros. La alcalinidad, pH y los residuos desinfectantes presentes en el agua son los principales factores que influyen el proceso de corrosión (Rahman *et al.*, 2007; Trujillo *et al.*, 2008).

En línea con lo anterior y teniendo presente las características de un sistema de biooxidación, la alcalinidad inicial inherente al tipo de agua puede no ser un factor que contribuya con la corrosión de los residuos, ya independientemente del agua que se emplee, una vez iniciado el proceso el contacto con los carbonatos y silicatos presentes en el mineral serian quienes definan su alcalinidad (Escalona, 1999). El pH en todos los ensayos se fijó inicialmente en 1.8, por lo que este tampoco se considera un factor relevante.

Según los reportes de calidad publicados por Empresas Públicas de Medellín (EPM), el contenido de cloruros y cloro proveniente de los procesos de desinfección, oscilo alrededor de 14.5 mg/L y 0.97 mg/L respectivamente, durante los meses de octubre, noviembre y diciembre del 2013 (tiempo en que fueron realizados los experimentos con agua de grifo), concentración superior a la reportada como máxima para el agua destilada, < 5mg/L de cloruros (Rodes *et al.*, 2010). Es posible que la presencia relativamente mayor de cloruros y cloro en el agua de grifo, haya conducido a la generación de fenómenos electroquímicos no presentados en los ensayos con agua destilada, los cuales a su vez originaron una corrosión galvánica del mineral contribuyendo con la oxidación global de los sulfuros (Yuan, 2012). Se ha demostrado que las velocidades de lixiviación de sulfuros en soluciones con presencia de cantidades bajas de cloruros pueden ser más altas que en los medios con sulfato (Tao *et al.*, 2014). Liang *et al.* (2012) encontraron que con la adición de NaCl, el proceso de disolución de calcopirita fue facilitado debido a que se redujo la acumulación de azufre elemental sobre la superficie del mineral. De igual manera Kinnunen y Puhakka (2004) incrementaron la producción de iones de cobre agregando 0.25 g/L de Cl⁻ en el sistema de biolixiviación. Si bien los cloruros presentan un efecto inhibitorio sobre *A. ferrooxidans* ampliamente documentado (Dew *et al.*, 1997; Gericke, 2009; Sekhar *et al.*, 2009b; Sekhar *et al.*, 2010; Akcil *et al.*, 2014), las concentraciones de estos en el agua no fueron lo suficientemente altas para resultar nocivas. Sekhar *et al.* (2009b) encontraron que concentraciones de cloruros de 4 g/L (110mM) son letales para la oxidación de pirita por consorcios microbianos. Por su parte Shiers *et al.* (2005) y Akcil *et al.* (2014) reportan que concentraciones superiores a 7 g/L de NaCl reducen hasta en un 50% la velocidad de crecimiento de cultivos mixtos conformados por microorganismos acidófilos.

Además de la variación en la calidad del agua, las condiciones de esterilidad también cambiaron para los reactores de 50L y 4000L. En principio la no esterilidad en estos sistemas, no se consideró un problema relevante, ya que las grandes cantidades de ácido sulfúrico y bajas concentraciones de nutrientes en las cuales puede crecer *A. ferrooxidans*, resultan inhóspitas para la mayoría de los microorganismos (Mason y Rice, 2007). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otras bacterias presentes en el residuo sin esterilizar se hayan desarrollado en los sistemas de reacción y hayan contribuido con la oxidación del mineral, incrementando así los porcentajes de Fe y SO_4^{-2} lixiviados en 50L. Cuando en un reactor hay más de una especie microbiana, es común que a través del tiempo se vayan seleccionando las poblaciones microbianas más resistentes y eficientes, dando lugar a condiciones favorables para la disolución de los minerales (Gericke, 2009; Demergasso *et al.*, 2011; Sekhar *et al.*, 2012). Según Demergasso *et al.*, 2011 y Sekhar *et al.* (2012) y la esterilización realmente no es requerida para un sistema de biooxidación a escalas grandes, ya que independientemente del tipo de microorganismos presentes, el objetivo del proceso es degradar minerales eficientemente.

Aunque en términos generales el proceso a 4000L funcionó y se obtuvieron resultados comparables con los ensayos a nivel de laboratorio, sus cinéticas fueron relativamente más lentas, particularmente los primeros dos días del ensayo. Los conteos celulares desde el inicio de este proceso, indicaron una concentración celular más baja que la de los ensayos a nivel de laboratorio, es decir que en esta escala las bacterias debieron oxidar la misma proporción de mineral que en los ensayos de menor volumen, pese a su menor cantidad. Esta relación [células]/[mineral], sumada a la calidad del medio de cultivo, posiblemente resultaron desfavorables para el ensayo a nivel de planta piloto, conduciendo a la reaparición de la fase lag.

Adicionalmente, la temperatura del proceso a escala piloto no pudo ser controlada, por lo que su regulación dependió de las condiciones ambientales y de las reacciones exotérmicas inherentes al proceso de biooxidación (Figura 5-9), según Hayward *et al.* (1997) y Dew *et al.* (1997), dichas reacciones tienen asociado un calor de reacción de 5.8kW/m^3 y 12.88kJ/kg de mineral. Pese al calor proveniente desde las reacciones y al que pueda generarse por los efectos de la agitación, la temperatura en este sistema varió en el tiempo, logrando valores altos solo entre los días cuatro y ocho donde la velocidad de crecimiento y la velocidad de generación de Fe total y SO_4^{-2} fueron máximas. La dependencia recíproca de las reacciones químicas y biológicas con la temperatura, y el modo de operación en que fue realizado el proceso (discontinuo), parecen haber impedido que

el sistema mantuviera unas condiciones óptimas y estables para el desarrollo de *A. ferrooxidans*, especialmente al inicio y final del ensayo donde la temperatura permaneció alrededor de 25°C.

De acuerdo a la literatura, las bacterias mesófilas pueden crecer entre los 25°C y 45°C, y el rango óptimo para *A. ferrooxidans* oscila entre los 28 y 32°C (Rossi, 1990; Dew *et al.*, 1997; Das *et al.*, 1999), temperaturas superiores al óptimo desactivan la oxidación debido a la desnaturalización de enzimas esenciales, y temperaturas inferiores desfavorecen la velocidad de crecimiento celular. En la Figura 5-19 se presenta la relación entre la velocidad máxima de crecimiento y la temperatura (Gómez y Cantero, 1998). Con base en lo anterior es muy posible las bajas temperaturas iniciales también contribuyeron con la reaparición de la fase de latencia en el proceso de 4000L.

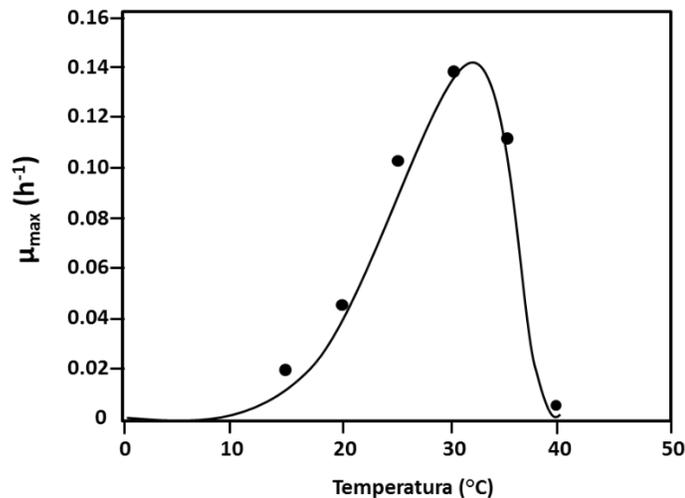


Figura 5-19: Predicciones teóricas y datos experimentales de la velocidad específica máxima de crecimiento (h⁻¹) para *A. ferrooxidans* versus la temperatura. ● Experimental; —Teórica. Tomado de Gómez y Cantero (1998).

5.4.2 Criterios de escalado e hidrodinámica

Uno de las prioridades en el escalado de un proceso es trasladar las condiciones de operación de un tanque a otro, de tal manera que se asegure una semejanza en el ambiente al con el cambio del volumen (Quintero, 1981). La similitud geométrica es uno de los métodos más usados para duplicar patrones de mezcla, especialmente en un proceso de biooxidación donde mantener una adecuada mezcla es necesario para una buena transferencia de masa y calor, suspensión de los sólidos y minimizar el desarrollo de gradientes de concentración, temperatura y pH en el interior del tanque (Gormeley, 1992).

Usualmente para garantizar la semejanza entre escalas se recurre a una serie de criterios. En este trabajo, se decidió evaluar el efecto de mantener constantes la potencia por unidad de volumen (Ecuación 4.1) y velocidad en la punta del impulsor (Ecuación 4.2), su elección se realizó con base en el tipo de proceso, en el que prima la necesidad de mantener una buena mezcla y con ésta el contacto entre las fases líquida, sólida y gaseosa, y por supuesto que garantice viabilidad celular. Por un lado, la potencia por unidad de volumen además de ser el criterio más utilizado en el escalado de procesos biológicos, permite mantener un nivel adecuado de mezcla en el tanque, su gran limitante es que incrementa el estrés hidrodinámico sobre las bacterias (García y Gómez, 2009). En contraste la velocidad en la punta del impulsor constante, disminuye el estrés hidrodinámico, determinando el máximo esfuerzo de corte en el tanque e influyendo en el tamaño y distribución de las burbujas, sin embargo se corre el riesgo de reducir la potencia y consecuentemente las velocidades de transferencia de oxígeno (Quintero, 1981; García y Gómez, 2009).

El efecto de estos criterios de escalado se hizo evidente en las cinéticas de biooxidación, en los parámetros hidrodinámicos (Tabla 5-5) y en los $k_L a$ estimados (Tabla 5-6). Manteniendo la potencia por unidad de volumen constante (P/V), el valor del número de Reynolds aumentó significativamente respecto al del criterio velocidad en la punta del impulsor (VPI), indicando que con P/V se mantiene una buena la mezcla medida desde la magnitud de su turbulencia y el coeficiente de transferencia de masa; no obstante, esto también implicó un ligero aumento en el esfuerzo cortante, la disminución el tamaño de los eddys y el aumento del consumo de potencia. Cuando se escaló conservando la velocidad en la punta del impulsor, se redujo la turbulencia, el esfuerzo cortante y el consumo de potencia. En estos ensayos, al igual que en los presentados en el capítulo 4, la presencia de remolinos no constituyó un problema para las bacterias, ya que el tamaño es estos es mucho mayor que el de las células de *A. ferrooxidans* (Joshi *et al.*, 1996; Trujillo y Valdez, 2006).

Si bien mantener la P/V dio lugar a una mezcla más homogénea del sistema, también pudo ser el causante de un aumento en el estrés hidrodinámico como lo sugieren García y Gómez (2009), de tal manera que los porcentajes de Fe y SO_4^{-2} totales disueltos y el consumo de oxígeno se vieron levemente reducidos en comparación con los obtenidos manteniendo VPI. Es muy posible que el aumento de la turbulencia en el ensayo STR-50L P/V haya incrementado las colisiones partícula-célula, disminuyendo la viabilidad de las bacterias y por ende afectando el proceso global de biooxidación (Deveci, 2002 y 2004).

5.4.3 Concentración de oxígeno disuelto y consumo de oxígeno

El escalado hasta 4000L a partir del criterio velocidad, demostró que efectivamente el coeficiente de transferencia de masa asociado al oxígeno se ve disminuido cuando se escala manteniendo la velocidad en la punta del impulsor (García y Gómez, 2009). En general lograr una aireación eficiente en reactores de grandes volúmenes es una tarea difícil y puede convertirse en la operación más costosa de todo el proceso (Sekhar *et al.*, 2012). De acuerdo a Jaeheon (2011) la concentración de oxígeno disuelto en un proceso a nivel comercial oscila entre 2-3 ppm, relativamente menor a la que puede alcanzarse en procesos a nivel de laboratorio.

La disminución en el $k_L a$, trae consigo disminuciones en el OD del sistema y esto a su vez limita el proceso de oxidación del Fe^{+2} . En todos los procesos a escala de laboratorio la concentración mínima de oxígeno permaneció por encima de 5.0 mg/L (Tabla 5-6), lejos de la concentración crítica establecida para un proceso de biooxidación, 1.0 mg/L según Gericke (2009). Sin embargo, en el reactor de 4000L la concentración mínima estuvo cerca de la concentración crítica poniendo en riesgo el proceso. Esta concentración mínima fue alcanzada durante el cuarto día donde se observó la temperatura más alta, la máxima caída en la concentración de Fe^{+2} y el mayor consumo de oxígeno. Lo anterior muestra que una vez se fijan factores como el caudal de aire y la velocidad de agitación, son la temperatura y la actividad microbiana, en conjunto con el $k_L a$, quienes estarían determinando los cambios en el OD disuelto a lo largo del proceso a escala piloto.

5.4.4 Mineralogía del proceso de biooxidación

Como se presentó en el capítulo 4, los difractogramas evidenciaron el efecto de la oxidación biológica del mineral en las distintas escalas de proceso a través de la reducción significativa de los picos de pirita. El ensayo con las más alta disolución de Fe y SO_4^{-2} (STR-50L VPI) presentó a su vez la mayor reducción en el porcentaje de pirita, lo que era de esperarse debido a que el Fe y SO_4^{-2} corresponden a los productos más importantes de la disolución de ésta fase mineral (Sand, 2001).

Los difractogramas obtenidos por DRX (Figuras 5-13 y 5-14) y los análisis por FTIR (Figuras 5-15 y 5-16) presentaron resultados similares a los descritos en el capítulo 4, corroborando la formación de jarosita. La jarosita es un subproducto indeseado por sus efectos adversos sobre el proceso de biooxidación, entre ellos, la disminución de Fe^{+3} en la solución debido a que es absorbido por el hidrógeno disulfato, y por su capacidad de depositarse sobre la superficie del mineral, inhibiendo de esta manera los sitios activos para la oxidación y consecuentemente reduciendo las velocidades de biooxidación (Dew, 1997; Daoud y Karamanev, 2006). Las concentraciones estimadas de

jarosita fueron consistentes, en la mayoría de los ensayos, con las concentraciones de Fe y SO_4^{2-} precipitados. En los ensayos realizados a 4000L se apreció un ligero incremento en la concentración de jarosita desde día 10 al 18, pese a que las condiciones de pH permanecieron en el rango de los ensayos a nivel de laboratorio (realizados durante 10 días). Se considera que el tiempo del proceso también podría influir en la precipitación de este hidroxisulfato.

Tal como ocurrió en los ensayos de agitación (capítulo 4), los muestras biooxidadas a nivel de laboratorio presentaron brushita, $\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH})\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, una fase que se forma tras la reacción del HPO_4^{2-} proveniente del fosfato ácido di potásico (K_2HPO_4) del medio T&K, y el calcio (Ca) procedente del mineral (Arroyave, 2008). En el ensayo a nivel de planta piloto, esta fase no se formó, posiblemente consecuencia del grado de pureza de las sales empleadas para la elaboración del medio de cultivo.

En los micrografías obtenidas por SEM (Figura 5-17) se evidencia nuevamente la oxidación de la pirita a través de la aparición de texturas típicas como golfos de corrosión, *pits* y surcos (Arroyave, 2008). Estos patrones de corrosión han sido identificados y correlacionados con la actividad bacteriana, donde la sustancia polimérica extracelular (SPE) facilita las reacciones de oxidación (Sand *et al.*, 1995; Tributsch y Rojas, 2004; Ospina, 2010). Los surcos según Bennet y Tributsch (1978) se inician con la formación en cadena de pequeños *pits*, seguida de una oxidación intensificada químicamente a lo largo de dichas cadenas. Algunos surcos suelen coincidir con direcciones estructuralmente controladas a nivel de la estructura cristalina del mineral, zonas altamente reactivas por su alta energía superficial y que favorecen la oxidación. Se cree que *A. ferrooxidans* tiene la capacidad de distinguir regiones favorables en la superficie del mineral desde la cuales puede obtener energía, por lo general estos sitios corresponden a aquellos con más defectos superficiales (Bennett y Tributsch, 1978; Ospina, 2010).

Las imágenes del SEM y los análisis microquímicos (Figura 5-18), hicieron visible la formación de aglomerados, interpretados por Arroyave, (2008) como productos de la saturación del sistema en iones tipo SO_4^{2-} , SiO_4^{4-} , Fe^{+3} , entre otros, los cuales precipitan y generan una matriz que aglutina otros fragmentos de minerales. Estos iones además de los sulfuros, también pueden provenir de la disolución de los silicatos por el ácido del medio (Sand y Genhrke, 2006; Arroyave, 2008).

5.4.5 Cianuración

A partir de las cianuraciones se observó que efectivamente el pretratamiento biooxidativo aumentó los porcentajes de recuperación de oro respecto a una muestra sin oxidar (Tabla 5-9). Estos porcentajes a su vez presentan una relación directa con el grado de oxidación, donde ensayos como STR-50L VPI con las mayores disoluciones de Fe y SO_4^{-2} , y oxidación de pirita, alcanzaron los porcentajes de oro recuperado más altos. Los resultados obtenidos son consecuentes con lo reportado por Olson y Harvey (2011) quienes muestran una relación proporcional entre el porcentaje de oxidación del sulfuro y la cantidad de oro recuperado. Ciftci y Akcil, (2010), por su parte, encontraron que porcentajes de oxidación del sulfuro entre el 10% y 25%, conducen a una recuperación de oro baja, $\approx 45\%$, y cuando el porcentaje de oxidación supera el 30% la recuperación del metal incrementa de manera lineal.

Al analizar conjuntamente el porcentaje de jarosita producida y el consumo de cianuro en cada uno de los montajes evaluados, se aprecia que el ensayo con mayor cantidad de jarosita (STR-4000L 18 días) presentó un alto consumo de cianuro. Adicionalmente en este mismo ensayo (STR-4000L) se observó una disminución en el porcentaje de oro recuperado desde el día 10 al día 18, similar al proceso de biooxidación de pirita en reactores de tanque agitado reportado por Jaeheon (2011), donde se obtuvo una recuperación del metal del 89.9% con seis días de biooxidación y de 85.6% luego de 28 días. Ciftci y Akcil (2010) y Jaeheon (2011), sugieren que la recuperación de oro no sólo está determinada por el grado de oxidación, en esta también influye la cantidad de jarosita, quien además de recubrir el oro liberado evitando su recuperación, parece presentar un efecto cianicida

Aunque después de los tratamientos de biooxidación se logró una recuperación de oro significativamente mayor a la del mineral sin pretratar, los porcentajes obtenidos no se comparan con lo documentado la literatura. Zahari *et al.* (2003) reportan por ejemplo, recuperaciones del 65% y 44% de oro desde residuos mineros compuestos por pirita, arsenopirita y hemetita, en esta investigación se emplearon consorcios de *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *Caldibacillus ferrivorus*. Por otro lado Schippers *et al.* (2008), lograron recuperaciones de oro y plata del 97% y 50%, respectivamente, luego de biooxidar durante 28 días un residuo constituido por pirita (60%), arsenopirita (35%), esfalerita, galena, calcopirita, entre otros; como agente biooxidante emplearon un consorcio de *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans*. Desde concentrados minerales sin previa cianuración se han reportado recuperaciones de hasta entre 70-94% (Natajara *et al.*, 2001; Arroyave, 2008; Ciftci y Akcil, 2010).

Se considera, que una de las principales razones por las que en este trabajo se obtuvieron bajas recuperaciones de oro, es la composición mineralógica del residuo, el cual está constituido fundamentalmente por pirita. Como se mencionó desde el primer capítulo, la pirita es uno de los sulfuros más difíciles de degradar, tanto por su estabilidad como por poseer una de las cinéticas de disolución más bajas (Rossi, 1990; Tributsh, 2001). Sumado a esto, según Boon *et al.* (1999c) la morfología o estructura cristalina de la pirita influye su grado de reactividad, donde la pirita euedral (altamente cristalina) que se presenta en el residuo, es la más difícil de atacar. En el trabajo de Schippers *et al.* (2008), donde gran porcentaje de los residuos también estaba compuesto por pirita, la duración del proceso fue tres veces mayor a la empleada en el presente trabajo (particularmente en el escalado a nivel de laboratorio), esta quizá fue la causa por la que obtuvieron tan altas recuperaciones.

Por otro lado, en todas las investigaciones citadas, emplean consorcios bacterianos para el proceso de biooxidación, lo cual indudablemente marca una diferencia significativa sobre la disolución de minerales (Zahari *et al.*, 2003; Sekhar *et al.*, 2012); cabe recordar que *Leptospirillum ferrooxidans*, además de tener una mayor afinidad por el Fe^{+2} también puede oxidar de forma más eficiente la pirita euedral y soporta temperaturas más altas y pH más bajos que *A. ferrooxidans* (Norris *et al.* 1987; Boon *et al.*, 1999c; Boon *et al.*, 2003; Dopson, 2003; Olso, 2003; Valdés *et al.*, 2008). En esta investigación se usó un monocultivo de una cepa comercial *A. ferrooxidans* debido a la disponibilidad de cepas comerciales al momento de iniciar la investigación.

5.4.6 Neutralización de residuos

La fase líquida en todos los ensayos de biooxidación, fue neutralizada con cal hasta un pH cercano a 7, el cual está en el rango permitido por la legislación colombiana para las aguas efluentes (Decreto 1594 de 1984). El mineral biooxidado a nivel de panta piloto fue igualmente neutralizado, generando un residuo constituido en su mayoría por yeso (Tabla 5-10). Este tipo de subproductos, comunes en los procesos de biooxidación, pueden ser reciclados y/o usados en otros campos. El agua por ejemplo, se puede emplear nuevamente para biooxidación, ya que los iones y sales disueltas en su mayoría son precipitados durante la neutralización. El yeso es un residuo que no afecta el medio ambiente y se puede utilizar como materia prima en la agricultura o la industria del cemento (Korcak, 1998; Caicedo *et al.*, 2012).

5.5 Conclusiones y recomendaciones

Al escalar el proceso de biooxidación de los residuos de La Maruja, a nivel de laboratorio, se incrementó la eficiencia medida desde el porcentaje de disolución de hierro total, sulfatos y oxidación de la pirita, demostrando que el escalado no necesariamente presenta un efecto negativo sobre los rendimientos de un proceso.

A través de los parámetros hidrodinámicos se evidenció el efecto de los criterios de escalado, potencia por unidad de volumen y velocidad en la punta del impulsor, sobre la biooxidación de los residuos de La Maruja, donde el primero contribuye con el aumento del estrés hidrodinámico reduciendo la actividad celular, y el segundo disminuye las velocidades de transferencia de masa.

De acuerdo a los resultados de disolución de los sulfuros, el porcentaje de oxidación de la pirita y la cantidad de oro recuperada, se afirma que de los criterios de escalado evaluados, el más adecuado para un proceso de biooxidación de los residuos de La Maruja, es mantener constante la velocidad en la punta del impulsor. Si bien es posible que este criterio limite la mezcla y la transferencia de masa, reducir el estrés hidrodinámico sobre *A. ferrooxidans* parece traer mejores resultados para el escalado del proceso particularmente a nivel de laboratorio.

Dependiendo de las condiciones que fueron modificadas a través del escalado, se presentaron resultados positivos o negativos para el proceso. El cambio de la calidad del agua puede tener un efecto positivo debido a que las características fisicoquímicas del agua corriente parecen contribuir con la corrosión del mineral. El no control de la temperatura, sin embargo, se convirtió en un factor crítico para el proceso a escala piloto debido a que el sistema por sí solo no alcanzó a generar el calor suficiente y mantener la temperatura en un rango óptimo para *A. ferrooxidans*. A nivel de erlenmeyer el no suministro de oxígeno se puede convertir en un limitante si la velocidad de consumo del microorganismo excede la velocidad de transferencia desde la fase gaseosa a la líquida.

Se considera que la relación [células]/[mineral], el no control de la temperatura y la pureza de las sales, contribuyeron con la reaparición de la fase de latencia a escala piloto, haciendo de sus cinéticas las más lentas.

En general y pese a los inconvenientes que se presentaron, se puede decir que el escalado desde laboratorio hasta planta piloto resultó satisfactorio. El proceso de biooxidación en 4000L quien a grandes rasgos parece no ser el más eficiente, supero las expectativas, fue necesario dejarlo más

tiempo pero aun con una baja concentración celular alcanzó los niveles de oxidación más altos encontrados en el laboratorio.

La extracción de oro por cianuración está directamente relacionada con el grado de oxidación del mineral, sin embargo la precipitación de jarosita puede llegar a limitar la recuperación por su efecto cianicida y por su tendencia a precipitarse sobre el oro liberado.

De acuerdo a lo previsto desde la caracterización mineralógica inicial, es muy posible que las bajas recuperaciones de oro, comparadas con otros trabajos, estén asociadas a la predominancia y características de la pirita en el residuo, un sulfuro difícil de biooxidar.

El trabajo con consorcios bacterianos definitivamente es la mejor alternativa para la biooxidación de residuos de minería. El trabajo conjunto de varios microorganismos parece mejorar la solubilización de los sulfuros y por ende la recuperación de metales valiosos. En este sentido, para futuras investigaciones sobre biooxidación de residuos mineros, se recomienda evaluar diferentes mezclas de microorganismos.

Se recomienda realizar a nivel de laboratorio una evaluación y comparación del proceso de biooxidación empleando agua corriente y agua destilada; con esto se podría establecer si realmente las características fisicoquímicas del agua contribuyen con la oxidación de los minerales. Así mismo, añadir a la caracterización mineralógica inicial del mineral, una caracterización microbiológica con el fin de establecer la existencia y de ser posible el tipo de microorganismos en el mineral que se puedan desarrollar durante el proceso de biooxidación.

Respecto al reactor de 4000L, se recomienda la instalación de un tanque adicional para la preparación del inóculo. Mejorar la configuración del fondo tanque, actualmente plano. La consecución de bombas de sólidos, tornillos sin fin u otro tipo de equipos que faciliten el suministro y extracción de mineral hasta y desde el tanque, equipos de este tipo harían posible el montaje de procesos en continuo, y de esta manera quizás, se logre mantener la temperatura óptima para el crecimiento microbiano. También se sugieren estudios de aireación, hidrodinámicos (evaluación de otras velocidades de agitación y/o la forma de escalar) y de ser posible térmicos, que permitan entender de forma profunda los mecanismos de transferencia de masa, calor y suspensión de sólidos dentro del tanque; de esta manera se podrán tomar decisiones correctivas que conduzcan a una mejor disolución de los sulfuros

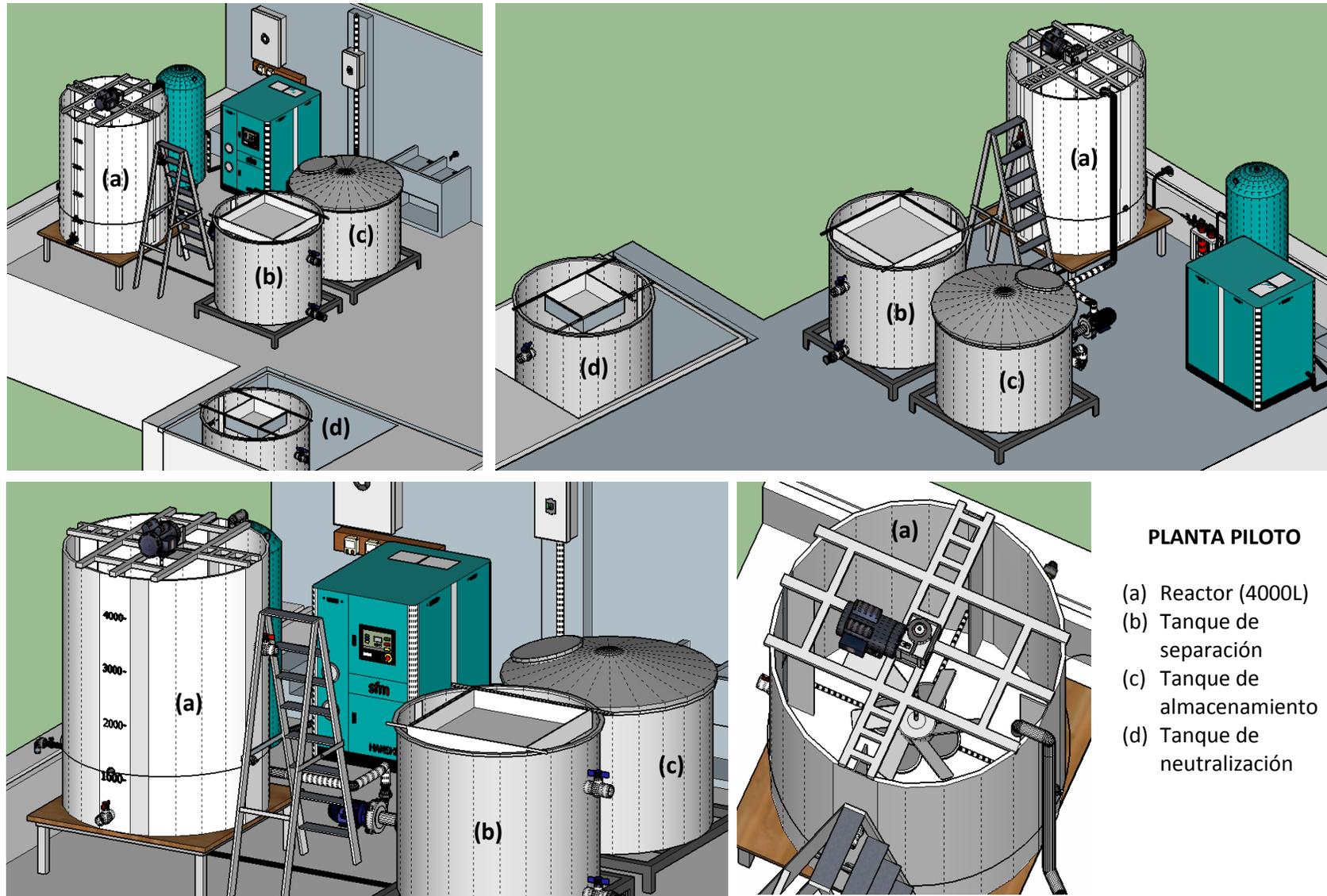


Figura 5-20: Esquema tridimensional de la planta piloto desde diversos ángulos.

A. Anexo: Breve registro fotográfico

Figura A-1: Reactores en diferentes escalas

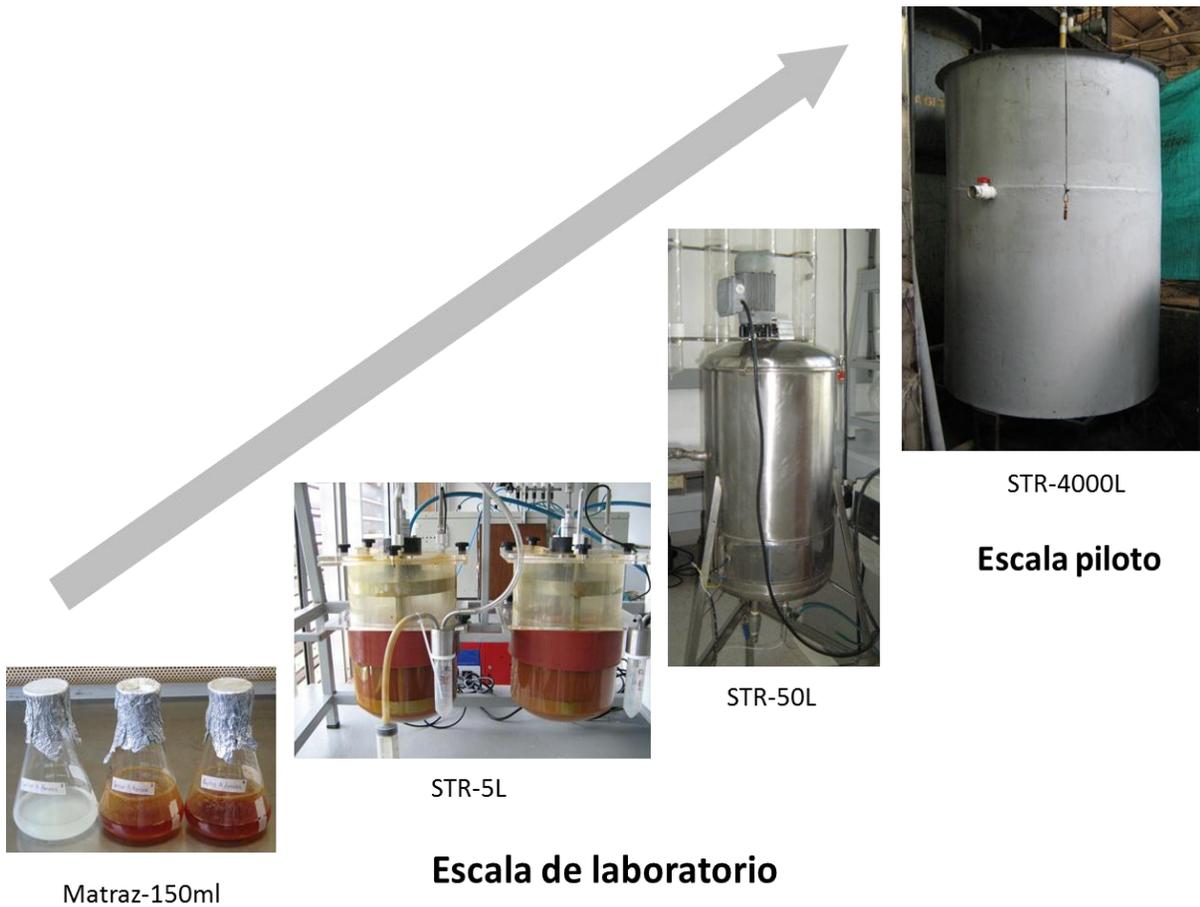
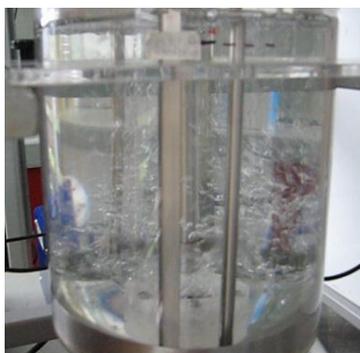


Figura A-2: Ensayos en laboratorio, reactores de 5L



Figura A-3: Dispersión del aire y suspensión de los sólidos en los ensayos de biooxidación realizados en el reactor de 5L variando la velocidad de agitación



300 r.p.m



500 r.p.m



700 r.p.m

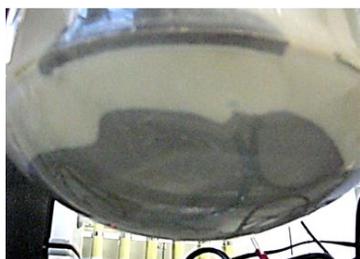


Figura A-4: Ensayos en planta piloto. Vista desde arriba del reactor. (A) Inóculo día 0; (B) Proceso de biooxidación día 10; (C) Proceso de biooxidación día 16.



Bibliografía

Acevedo F y Gentina C. 2005. Biolixiviación de minerales de cobre. En: Acevedo F y Gentina M, Fundamentos y perspectivas de las tecnologías mineras. Chile. Ediciones Universitarias de Valparaíso.79-91.

Acevedo F. 2000. The use of reactors in biomining processes. *Electronic Journal of Biotechnology*; (3), pp 184-190.

Addler H, Kerr F. 1965. Variations in infrared spectra, molecular symmetry of sulfate minerals. *The American Mineralogist*, vol. 50, pp. 132-147.

Ahonen L, Tuovinen O. 1993. Alterations in surfaces and textures of minerals during the bacterial leaching of a complex sulfide ore. *Geomicrobiology Journal* 10; 207-217

Ahonen L, Tuovinen O. 1994. Solid-phase alteration and iron transformation in column bioleaching of a complex sulfide ore. In: *Environmental Geochemistry of sulfide oxidation*. ACS Symposium Series550. American Chemical Society, Washington

Akcil A, Ciftci H, Deveci H. 2007. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Mineral Engineering*, 20: 310-318.

Akcil A, Sekhar C, Erust C, Tuncuk A. 2014. Influence of Chloride on the Chemolithotrophic Acidophiles in Biohydrometallurgy: A Review. En Pramanik K, Kumar J. *Industrial and Environmental Biotechnology*. Studium Press India Pvt Ltd: 45-69

Allan G, Woodcock J. 2001. A review of the flotation of native gold and electrum. *Minerals Engineering*, Vol. 14, No. 9; 931-962

Amaro A, Chamorro D, Seeger M, Arredondo R, Peirano I, Jerez C A. 1991 Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*, 173(2), 910–915

- Anjum F, Shahid Muhammad, Akcil At.** 2012. Biohydrometallurgy techniques of low grade ores: A review on black shale. *Hydrometallurgy* 117–118; 1–12
- Apel A, Dugan R.** 1978 Hydrogen ion utilization by iron grown *Thiobacillus ferrooxidans*: Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. Eds. Murr EL, Torma AE, Brierley AJ, Academic Press, New York, San Francisco, London, 45–58.
- Arroyave D.** 2008. Evaluación del proceso de Biooxidación a escala de laboratorio del mineral aurífero de la mina El Zancudo, Titiribí-Antioquia. [Tesis de maestría]. Departamento de Materiales y minerales, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Aston E, Peyton M, Lee B, Apel A.** 2010. Effects of ferrous sulfate, inoculum history, and anionic form on lead, zinc, and copper toxicity to *Acidithiobacillus caldus* strain BC13. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29 (12): 2669-2675
- Attia A, Elzaky M.** 1995. Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides. *Chemical Engineering Journal*. 56: 115–124.
- Baldi F, Clark T, Pollack S, Olson G.** 1992. Leaching of pyrites of various reactivities by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(6); 1853.
- Bailey A, Hansford G.** 1993. Factors Affecting Bio-Oxidation of Sulfide Minerals at High Concentrations of Solids: A Review. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 42; 1164-1 174
- Ballester A, 2005.** Mecanismos de la biolixiviación. En: Acevedo F y Gentina M. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías Mineras. Ediciones universitarias de Valparaíso. Valparaíso; 9-24
- Banfield J, Hamers R.** 1997. Processes at minerals and surfaces with relevance to microorganisms and prebiotic synthesis. En: *Reviews in mineralogy*. Ed. Mineralogical Society of America 35:81-117.
- Barton P, Bethke P.** 1987. Chalcopyrite disease in sphalerite: Pathology and epidemiology *American Mineralogist* 72; 451-467.
- Battaglia F, Morin D, Olliver P.** 1994. Dissolution of cobaltiferous pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*: factors influencing bacterial leaching efficiency. *Journal of Biotechnology* 32; 11-16
- Bennett J, Tributsch H.** 1978. Bacterial leaching patterns on pyrite crystal surfaces. *Journal of Bacteriology*, 134; 310-317.
- Bhappu R.** 1990. Hydrometallurgical processing of precious metal ores. *Mineral processing and Extractive Metallurgy Review*; Vol. 6, pp. 67-80
- Bhatti M, Bigham M, Vuorinen A, Tuovinen H.** 1993. Biological leaching of sulfides with emphasis on pyrrhotite and pyrite. In: *Proceedings of International Symposium on Biotechnology*

for Sustainable Development, Kauser A, Malik, Anwar Nasim y Ahmad M. Khalid, NIBGE, Faisalabad, Pakistan, pp. 299-308.

Boon M, Luyben K, Heijnen J. 1998. The use of on-line off-gas analyses and stoichiometry in the bio-oxidation kinetics of sulphide minerals. *Hydrometallurgy* 48; 1–26.

Boon M, Heijnen J. 1998. Chemical oxidation kinetics of pyrite in bioleaching processes. *Hydrometallurgy* 48; 27–41

Boon M., Ras C, Heijnen J. 1999a. The ferrous iron oxidation kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* in batch cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 813–819.

Boon M., Meeder A, Thione C, Ras C, Heijnen J. 1999b. The ferrous iron oxidation kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 820–826.

Boon M, Brassler H, Hansford G, Heijnen J. 1999c. Comparison of the oxidation kinetics of different pyrites in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 55; 57–72

Braddock F, Luong V, Brown E. 1984. Growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* isolated from arsenic mine drainage. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 48-55

Brierley C, Brierley J. 2013. Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-013-5095-3

Cabrera, G., Gómez, J., Cantero, D. 2005. Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 301-306

Caicedo G, Prada M, Peláez H, Moreno C, Márquez M. 2012. Evaluation of a coal biodesulfurization process (semi-continuous mode) on the pilot plant level. *Dyna*, Nro. 174; 114-118.

Carretero E, Gonzaga L, Souza C, Monteiro D. 2011. Bioleaching of metal sulphides ores and concentrates. En: Santos L, Monteiro D, Gomes C. Biohydrometallurgical process: A practical approach. CETEM/MTC. Rio de Janeiro. 3-20.

Caruccio F. 1970. Abstr. 3rd Symp. Coal Mine Drainage Res., Mellon Institute, Pittsburgh, Pa., 19-20 May 1970, p. 123.

Cerpa A, Tartaj P, García M, Garcell L, Serna C. 2001. Efecto del pH, concentración de sólidos y tamaño de partícula en las curvas de flujo de suspensiones lateríticas. *Tecnología Química* Vol. XXI, No. 1; 54-60

Chandra A, Gerson A. 2010. The mechanisms of pyrite oxidation and leaching: A fundamental perspective. *Surface Science Reports* 65; 293–315

- Chandraprabha M, Modak J, Natarajan K, Raichur A.** 2002. Strategies for efficient start-up of continuous biooxidation process for refractory gold ores. *Minerals Engineering*, Vol. 15. 751–753
- Chukanov N.** 2014. *Infrared spectra of minerals species*. Springer. New York.
- Chryssoulis S, McMullen J.** 2005. Mineralogical investigation of gold ores. En Adams M. *Developments in Mineral Processing*. Elsevier B.V. Vol. 15.
- Ciftci H, Akcil A.** 2010. Effect of biooxidation conditions on cyanide consumption and gold recovery from a refractory gold concentrate. *Hydrometallurgy* 104; 142–149
- Climo M, Watling H and Bronswijk W.** 2000. Biooxidation as pre-treatment for a telluride-rich refractory gold concentrate, *Minerals Engineering* Vol. 13. No. 12; 1219-1229.
- Collinet M, Morin D.** 1990. Characterization of arsenopyrite oxidizing *Thiobacillus*. Tolerance to arsenite, arsenate, ferrous and ferric iron. *Antonie van Leeuwenhoek*. 57: 237-244
- Córdoba E, Muñoz J, Blázquez M, González F., Ballerter A.** 2008. Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: General aspects. *Hydrometallurgy* 93, 2008, 81–87
- Corkhill, C.L., Vaughan, D.J.,** 2009. Arsenopyrite oxidation – A review. *Applied Geochemistry*. doi:10.1016/j.apgeochem.2009.09.008.
- Cortes M, Ortiz P.** 2004. Corrosión. *Apuntes científicos Uniandinos* N° 4; 12-18
- Cruz R, Monroy M. González I.** 2006. Evaluación de la reactividad de sulfuros de hierro y residuos mineros: una metodología basada en la aplicación de la voltamperometría cíclica. *Química Nova*, Vol. 29, No. 3, 510-519
- Curutchet G, Pogliani C, Donati E, Tedesco P.** 1992. Effect of iron (III) and its hydrolysis products (jarosites) on *Thiobacillus ferrooxidans* growth and on bacterial leaching. *Biotechnol Lett* 14, 329–334
- Daoud J, Karamanev D.** 2006. Formation of jarosite during Fe²⁺ oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering* 19; 960–967
- Da Silva G, Lastra M, Budden J.** 2003. Electrochemical passivation of sphalerite during bacterial oxidation in the presence of galena. *Minerals Engineering* 16; 199–203
- Da Silva G.** 2004. Kinetics and mechanism of the bacterial and ferric sulphate oxidation of galena. *Hydrometallurgy*, 75: 99-110
- Das T, Ayyappan S, Chaudhury G.** 1999. Factors affecting bioleaching kinetics of sulfide ores using acidophilic micro-organisms. *BioMetals*; 12: 1–10
- Das T, Sen P.** 2001. Bio-reactor simulation and modeling for a gold bioleaching process. *Minerals Engineering* 14; 305-316.

- De C, Oliver J, Pesic M.** 1996. Effect of silver on the ferrous iron oxidizing ability of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 41; 211–229
- Demergasso C, Soto P, Zepeda V, Gallerguillos P.** 2011. Scientific monitoring of industrial bioleaching process. En: Santos L, Monteiro D, Gomes C. *Biohydrometallurgical process: A practical approach*. CETEM/MTC. Rio de Janeiro. 3-20.
- Deveci H.** 2002. Effect of solids on viability of acidophilic bacteria. *Minerals Engineering* 15: 1181–118.
- Deveci H.** 2004. Effect of particle size and shape of solids on the viability of acidophilic bacteria during mixing in stirred tank reactors. *Hydrometallurgy* 71; 385–396.
- Dew, D., Lawson, E., Broadhurst, J.** 1997. The BIOX® process for biooxidation of gold-bearing ores or concentrates. En Rawlings D. *Biomining: Theory, Microbes and Industrial* Springer-Verlag y Landes Bioscience 1997.
- d'Hugues P, Cezaco P, Cabral T, Battagliaio F, Truong-Meyer X, Morins D.** 1997. Bioleaching of a cobaltiferous pyrite: a continuous laboratory-scale study at high solids concentration. *Minerals Engineering*, Vol. 10, No. 5; 507-527,
- Dickey D, Fenic C.** 1976. Dimensional analysis for fluid agitation systems. *Chemical Engineering*, 139-145.
- Dimitrijevic M, Antonijevis M and Dimitrijevic V.** 1999. Investigation of the kinetics of pyrite oxidation by hydrogen peroxide in hydrochloric acid solutions. *Minerals Engineering* 12: 165-174
- Doe R, Chodos A, Rose W, Godijn E.** 1961. The determination of iron in sphalerite by X-ray fluorescence spectrometry. *The American Mineralogist* 46.
- Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi R, Bond P.** 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology* 149, 1959–1970
- Dopson M, Lövgren L, Boström D.** 2009. Silicate mineral dissolution in the presence of acidophilic microorganisms: Implications for heap bioleaching. *Hydrometallurgy* 96; 288–293
- Doran P.** 1998. *Principios de la Ingeniería de los bioprocesos*. Zaragoza – España : Edt. Acribia S.A.
- Elzety, M., Attia, Y.** 1995. Effect of bacterial adaptation on kinetics and mechanisms of bioleaching ferrous sulfides. *The Chemical Engineering Journal* 56; 115-124.
- Escalona H.** 1999. *Ingeniería ambiental* 2 ed. Pearson Educación.
- Frattini C, Leduc L, Ferroni G.** 2000. Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 57–64.

- Gallego D.** 2002a. Manual para el estudio del comportamiento hidráulico de un reactor continuo con los modelos de un factor. Investigación, Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Gallego, D.** 2002b. Introducción a la ingeniería bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Medellín
- García O, Bigam J, Tuovinen O.** 1995. Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. Canadian journal of microbiology. 41: 508-514
- García F, Gómez, E.** 2004. Theoretical prediction of gas – liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. Chemical Engineering Science 59; 2489 – 2501
- García F, Gómez E.** 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. Biotechnology Advances 27; 153–176
- García F, Gómez E, Santos V, Merchuk J.** 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. Biochemical Engineering Journal 49; 289–307
- García F, Santos V, Gómez E.** 2011. Stirred Tank Bioreactors. En: *Moo-Young M.* Comprehensive Biotechnology (Second edition). Elsevier; 179-198.
- Gasparrini C.** 1993. Gold and other precious metals from ore to market. Springer-Verlag Hilderberg. New York.
- Gentina J, Acevedo F.** 2005. Biolixiviación de minerales de oro. En: Acevedo F y Gentina M. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías mineras. Chile. Ediciones Universitarias de Valparaíso.
- Gericke M, Neale J, Stade P.** 2009. A Mintek perspective of the past 25 years in minerals bioleaching. The Journal of The Southern African Institute of Mining and Metallurgy 9; 567-585
- Gómez J, Cantero D.** 1998. Modelling of Ferrous Sulphate Oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* in Discontinuous Culture: Influence of Temperature, pH and Agitation Rate. Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 86, No. I, 79-83.
- Gómez J, Cantero D.** 2005. Biooxidación del ion ferroso. En: Acevedo F y Gentina M. Fundamentos y perspectivas de las tecnologías Mineras. Ediciones universitarias de Valparaiso. Valparaiso; 9-24.
- González R, Gentina J, Acevedo F.** 1999. Attachment behaviour of *Thiobacillus ferrooxidans* cells to refractory gold concentrate particles. Biotechnology Letters 21; 715-718.
- Gonzalez R, Gentina J, Acevedo F.** 2003. Optimisation of the solids suspension conditions in a continuous stirred tank reactor for the biooxidation of refractory gold concentrates. Electronic Journal of Biotechnology. Vol 6; 233-243.

González R, Gentina J, Acevedo F. 2004. Biooxidation of a gold concentrate in a continuous stirred tank reactor: mathematical model and optimal configuration. *Biochemical Engineering Journal* 19; 33–42

Gordillo F, Suarez J, Sanmartín V, Aguirre P, Gentina J, Donati E. 2009 Mineralogical Characterization of a Polymetallic Concentrate Portovelo Mining District. Bioleaching by a Native Bacterial Consortium. *Advanced Materials Research*, 71-73, 481

Gormeley L. 1992. Mechanical agitation and aeration. En hydrometallurgical reactors. *Hidrometallurgy* 29 pp 217-230.

Gramp J, Jones F, Bigham J, Tuovinen O. 2008. Monovalent cation concentrations determine the types of Fe(III) hydroxysulfate precipitates formed in bioleach solutions. *Hydrometallurgy* 94, 29–33

Groudev S, Spasova I, Ivanov I. 1996. Two-stage microbial leaching of a refractory gold-bearing pyrite ore. *MineralsEngineering*, Vol.9, No. 7; 707-713

Haghshenas D, Alamdari E, Torkmahalleh M, Bonakdarpour B, Nasernejad B. 2009. Adaptation de *Acidithiobacillus ferrooxidans* to high grade sphalerite concentrate. *Minerals Engineering* 22; 1299-1306.

Haris M, Kumar A, Kumar K, Arif J. 2009. Biomining - A Useful Approach Toward Metal Extraction. *American-Eurasian Journal of Agronomy* 22; 84-88

Harvey I, Crundwell K. 1996. The effect of As (III) on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* in an electrolytic cell under controlled redox potentials. *Minerals Engineering*. 9(10): 1059-1068.

Hayward T, Satalic D, Spencer P. 1997. Engineering, equipment and materials: developments in the design of a bacterial oxidation reactor. *Minerals Engineering*, Vol. 10, No. 10; 1047-1055.

Hoque M, Hobbard J. 2011. Biotechnological recovery of heavy metals from secondary sources—an overview, *Materials Science and Engineering C* 31; 3157–66.

Hossain M, Das M, Begum M, Anantharaman N. 2004. Bioleaching of zinc sulphide (ZnS) ore using *Thiobacillus ferrooxidans*. *Institution of Engineers (India) Chemical Division* 85; 7-11

Hsu Y, Wu W. 2002. A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal* 11; 123–130

Huthins S, Davidson J, Brierley J, Brierley C. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. *Annual Review of Microbiology* 40; 311-36

Iglesias N, Carranza F. 1994. Refractory gold-bearing ores: a review of treatment methods and recent advances in biotechnological techniques. *Hydrometallurgy* 34; 383-39

Jaeheon L. 2011. Biooxidation of gold ores. En: Santos L, Monteiro D, Gomes C. *Biohydrometallurgical process: A practical approach*. CETEM/MTC. Rio de Janeiro. 3-20.

- Janzen M, Nicholson R, Scharer J.** 2000. Pyrrhotite reaction kinetics: Reaction rates for oxidation by oxygen, ferric iron, and for nonoxidative dissolution. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Vol. 64, No. 9; 1511–1522.
- Johnson D.B.** 2014. Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 30; 24–31
- Joshi J, Elias C, Patole M.** 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *The Chemical Engineering Journal*, 6; 121-141.
- Jowkarderis L, Van de Ven T.** 2014. Intrinsic viscosity of aqueous suspensions of cellulose nanofibrils. *Cellulose*. DOI 10.1007/s10570-014-0292-5
- Jyothi, N., Sudha, K. and Natarajan, K.** 1989. Electrochemical aspects of selective bioleaching of sphalerite and chalcopyrite from mixed sulphides. *International journal of mineral processing* 27;189-20
- Ju L, Chase G.** 1992. Improved scale-up strategies of bioreactors. *Bioprocess Engineering* 8; 49-53
- Junker B.** 2004. Scale-Up Methodologies for *Escherichia coli* and Yeast Fermentation Processes. *Journal of bioscience and bioengineering* Vol. 97, No. 6; 347–364.
- Kaksonen A, Mudunuru B, Hackl R.** 2014a. The role of microorganisms in gold processing and recovery - A review. *Hydrometallurgy* 144; 70–83
- Kaksonen A, Morris C, Rea S, Li J, Usher K, McDonald R, et al.** 2014b. Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: Part II – Jarosite precipitate characterisation and acid recovery by conversion to hematite. *Hydrometallurgy*, doi: 10.1016/j.hydromet.2014.04.015
- Kaksonen A, Morris C, Rea S, Li J, Usher K, McDonald R, et al.,** 2014c. Biohydrometallurgical iron oxidation and precipitation: Part I - Effect of pH on process performance, *Hydrometallurgy* (2014), doi:10.1016/j.hydromet.2014.04.016
- Karamanev D, Margaritis N, Chong N.** 2001. The application of ore immobilization to the bioleaching of refractory gold concentrate. *International Journal of Mineral Processing*. Vol 62; 231-241.
- Kinnunen P, Puhakka J.** 2004. Chloride-promoted leaching of chalcopyrite concentrate by biologically-produced ferric sulfate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 79 (8); 830–834
- Kinzler K, Gehrke T, Sand W.** 2003. Bioleaching—a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* 7; 83–88

Kodali B, Rao B, Narasu L, Pogaku R. 2004. Effect of biochemical reactions in enhancement of rate of leaching. *Chemical Engineering Science* 59; 5069 – 5073

Korcak R. 1998. *Agricultural Uses of Phosphogypsum, Gypsum, and Other Industrial Byproducts*. En: Wright R, Kemper W, Millner P, Power J, Korcak R, Agricultural Uses of Municipal, Animal, and Industrial Byproducts. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Conservation Research Report 44

Kundu K, Kumar A. 2014. Biochemical engineering parameters for hydrometallurgical processes: steps towards a deeper understanding. *Journal of Mining*. Volume 2014; Article ID 290275, 10 páginas

Liang C, Xia J, Nie Z, Yang Y, Ma Y. 2012. Effect of sodium chloride on sulfur speciation of chalcopyrite bioleached by the extreme thermophile *Acidianus manzaensis*. *Bioresour. Technol.* 110 (2012) 462–467

Liu G, Yin J, Cong W. 2007. Effect of fluid shear and particles collision on the oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering* 20; 1227–1231

Liu H, Gu G, Xu Y. 2011. Surface properties of pyrite in the course of bioleaching by pure culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and a mixed culture of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Hydrometallurgy* 108; 143–148

Liu Y, Dang Z, Lu G, Wu P, Feng C, Yi X. 2011. Utilization of electrochemical impedance spectroscopy for monitoring pyrite oxidation in the presence and absence of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering* 24; 833–838

Lusk J, Calder B. 2004. The composition of sphalerite and associated sulfides in reactions of the Cu–Fe–Zn–S, Fe–Zn–S and Cu–Fe–S systems at 1 bar and temperatures between 250 and 535 °C. *Chemical Geology* 203; 319–345

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2010. *Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid: Pearson Educación.

Maddox L, Bancroft G, Scaini M, Lorimer J. 1998. Invisible gold: Comparison of Au deposition on pyrite and arsenopyrite. *American Mineralogist*, Volume 83; 1240–1245

Maier U, Losen M, Büchs J. 2004. Advances in understanding and modeling the gas–liquid mass transfer in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17; 155–167

Makita M, Esperón M, Pereyra B, López A, Orrantía E. 2004. Reduction of arsenic content in a complex galena concentrate by *Acidithiobacillus ferrooxidans* [J]. *Bio Med Central (BMC) Biotechnology*; 4: 22.

Maldonado J, Martínez C, Bonilla M, Viña, G, Brugés L, Sanchez C, et al. 2002. Diagnóstico y proyecciones de la gestión minero ambiental para las regiones auríferas de Colombia [Informe] Ministerio del medio ambiente. Bogotá D.C.

- Marchand E**, 2003. Minerals and mine drainage. *Water Environment Research* 75; 975–1011.
- Maranga L, Cunha A, Clemente J, Cruz P, Carrondo M**. 2004. Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *Journal of Biotechnology*. Vol. 107. 55–64.
- Márquez M, Gaspar J, Bessle K, Magela G**. 2006. Process mineralogy of bacterial oxidized gold ore in São Bento Mine (Brasil). *Hydrometallurgy* 83; 114 – 123
- Marquez M, Ospina J, Morales A**. 2012. New insights about the bacterial oxidation of arsenopyrite: a mineralogical scope. *Minerals Engineering* 39. 2012; 248–254
- Mason L, Rice N**. 2002. The adaptation of *Thiobacillus ferrooxidans* for the treatment of nikel – iron sulphide concentrates. *Minerals Engineering*. 15: 795-808.
- Mazuelos A, Palencia I, Romero R, Rodriguez G, Carranza F**. 2001. Ferric iron production in packed bed bioreactors: Influence of pH, temperature, particle size, bacterial support material and type of air distributor. *Minerals Engineering*, 14: 507-514
- May N, Ralph D, Hansford G**. 1997. Dynamic redox potential measurement for determining the ferric leach kinetics of pyrite. *Minerals Engineering*, Vol. 10 ,No. 11; 1279-1290.
- Mc Cabe, Smith J, Harriot P**. Operaciones unitarias en Ingeniería Química. México: McGraw-Hill. 2007.
- Mejía E, Ospina J, Márquez M**. 2007. Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de la galena (PbS) por *Acidithiobacillus ferrooxidans*, mediante análisis de Microscopia Electrónica de Barrido, FTIR Y DRX. *Scientia et Technica* Año XIII, No 36, Septiembre 2007. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701
- Mejía E**. 2010. Mineralogía del proceso de lixiviación bacteriana de calcopirita (FeAsS), esfalerita (ZnS) y galena (PbS) [Tesis de maestría]. Departamento de Materiales y minerales, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.
- Mejía E, Ospina J, Osorno L, Márquez M, Morales A**. 2011. Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1: 132-143
- Mishra D, Rhee Y**. 2014. Microbial Leaching of Metals from Solid Industrial Wastes. *Journal of Microbiology*. Vol. 52, No. 1; 1 –7.
- Molaei S, Yaghmaei S, Ghobadi Z**. 2011. A study of *Acidithiobacillus ferrooxidans* DSMZ 583 adaptation to heavy metals. *Iranian journal of biotechnology*, Vol. 9, No. 2
- Morin D**. 1995. “Bacterial leaching of refractory gold sulfide ores” Bioextraction and biodeterioration of metals, Cambridge University Press; 25-54.

- Mousavi S, Yaghmaei S, Vossoughi M, Jafari A, Roostaazad R, Turunen I.** 2007. Bacterial leaching of low-grade ZnS concentrate using indigenous mesophilic and thermophilic strains. *Hydrometallurgy* 85, 59–65
- Natarajan K, Modak J, Raichur A.** 2001. Bioreactor Engineering for treating refractory gold-bearing concentrates: An Indian Experience. In: Ciminelli and Garcia Jr. (Editors). *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Tecnology and Sustainable Development. Part A.* 183-189.
- Nazari G, Dixon D, Dreisinger D.** 2012. The role of galena associated with silver-enhanced pyrite in the kinetics of chalcopyrite leaching during the Galvanox™ process. *Hydrometallurgy* 111-112; 35–45
- Nemati M, Lowenadler J, Harrison T.** 2000. Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Sulfolobus metallicus* (BC). *Applied Microbiology and Biotechnology* 53; 173-179
- Nies D.** 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes. *Plasmid* 27: 17-28.
- Nienow A, Bujalski W.** 1997. Recent studies on agitated three phase (gas-solid-liquid) systems in the turbulent regime. In: *Engineering Foundation Conference on Biochemical Engineering.*
- Nikolov L, Valkova-Valchanova, Mehochev D.** 1988, Oxidation of high ferrous iron concentration by chemolithotrophic *T. ferrooxidans* in packed bed bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 7: 87-94
- Nikumbh A, Schmidt H, Porz M.** 1991. Slip casting of partially stabilized zirconia. *Journal of Materials Science* 26; 3649-3656
- Norris R, Kelly D.** 1978. Toxic metals in leaching systems. In *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*, pp. 85–102. Edited by L. E. Murr, A. E. Torma & J. A. Brierley. New York & London: Academic Press.
- Norris R, Barr D, Hinson D.** 1987. Iron and mineral oxidation by acidophilic bacteria: affinities for iron and attachment to pyrite, in: P.R. Norris, D.P. Kelly Eds, *Biohydrometallurgy, Proc. Int. Symp.* Warwick; 43–59.
- Norris R.** 1990. Acidophilic bacteria and their activity in mineral sulphide oxidation. In *Microbial Mineral Recovery*, pp. 3–27. Edited by H. L. Ehrlich & C. L. Brierley. New York: McGraw-Hill.
- Nurmi P, Özkaya B, Sasaki K, Kaksonen A, Tuovinen H, Riekkola-Vanhanen M, et al.** 2010. Biooxidation and precipitation for iron and sulfate removal from heap bioleaching effluent streams. *Hydrometallurgy* 100; 7-14.
- Ollin T, Donovan K.** 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in the relation to the microbiological leaching of sulphide ores.

- Olson G, Brierley J, Brierley C.** 2003. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol*; 63:249–257
- Olson G, Harvey T.** 2011. Biooxidation amenable testing. . En: Santos L, Monteiro D, Gomes C. *Biohydrometallurgical process: A practical approach*. CETEM/MTC. Rio de Janeiro. 3-20.
- Olubambi P, Potgieter J, Borode J.** 2009. Electrochemical studies on interplay of mineralogical variation and particle size on bioleaching low grade complex sulphide ores. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 19; 1312-1325.
- Orozco F.** 2012. Escalado de bioprocesos con microorganismos y células vegetales. En Rodríguez M, Orozco F. *Escalado de bioprocesos y entrenamiento en operación de biorreactores*. Curso internacional. Medellín Colombia. 2012.
- Ospina J.** 2010. Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de arsenopirita (FeAsS) y piritita (FeS₂) [tesis de maestría]. Departamento de Materiales y minerales, Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín
- Ossa D, Márquez M.** 2010. Jarosite pseudomorph formation from arsenopyrite oxidation using *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 104: 162–168
- Parga J, Carrillo F.** 1995. Avances en los métodos de recuperación de oro y plata de minerales refractarios. *Revista de hidrometalurgia*; 254-261
- Pérez L, Garcell L, Rojas A, Rómulo A.** 2010. Mineralogía y reología de suspensiones minerales del proceso de lixiviación ácida a presión en Moa, Cuba. *Minería y Geología / v.26 n.4*; 16-35
- Pinches A, Al-jaid O, Williams A.** 1976. Leaching of chalcopyrite concentrates with *Thiobacillus ferrooxidans* in batch culture. *Hydrometallurgy* 2; 87-103.
- Pollack S, Martello R, Graham J, Diehl, Tamilya J.** 1991. Reactivity of pyrites and dislocation density, p. 885-888. In International Energy Agency (ed.), *Proceedings of the International Conference on Coal Science*. Butterworth Heinemann, Oxford
- Quintero R.** 1981. *Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones*. Editorial Alhambra Mexicana. Primera edición.
- Rahman S, McDonald B, Gagnon G.** 2007. Impact of secondary disinfectants on copper corrosion under stagnation conditions, *J. Environmental Engineering*; 133(2), 180-185.
- Raph Kretz.** 1983. Symbols for rock-forming minerals. *American Mineralogist* 68; 277-279.
- Rawlings, D.** 1997. *Biomining: Theory, Microbes and Industrial Processes*. Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 45–80

Rawlings D, Tributsch H, Hansford S. 1999. Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 145; 5–13

Rawlings D, 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annual Review of Microbiology* 56, 65–91

Rawlings D, Dew D, Plessis C. 2003. Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology* Vol.21 No.1; 38-44.

Rawlings D. 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories*.; 4-13

Rawlings D, Johnson D. 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153; 315–324

Rivadeneira J, 2011. Challenges in practicing the bioleaching process. En: Santos L, Monteiro D, Gomes C. *Biohydrometallurgical process: A practical approach*. CETEM/MTC. Rio de Janeiro. 3-20.

Rodes Y, Valdivia S, Valdés P, Gómez M. 2010. Agua para uso en laboratorios. *Boletín Científico Técnico INIMET*, núm. 1; 3-10

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

Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W. 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol*; 63: 239–248.

Rossi G. 1990. *Biohydrometallurgy*. Hamburg-New York. McGraw Hill.

Ruiz A. 2009. Factores de escala para la producción biotecnológica de etanol carburante [Tesis doctoral] Facultad de Minas, Universidad Nacional de Colombia (Medellín).

Sampson, M., Van der Merwe, J., Harvey, T., Bath, M. 2005. Testing the ability of a low grade sphalerite concentrate to achieve autothermality during biooxidation heap leaching. *Minerals Engineering*. 18: 427-437

Sand W, Gehrke T, Hallmann R, Schippers A. 1995. Sulfur chemistry, and the (In)direct attack mechanism- a critical evaluation of bacterial leaching. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 43. 961–966.

Sand W, Gehrke T, Jozsa P, Schippers A. 2001. Biochemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59; 159–175

- Sand W, Gehrke T.** 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* 157; 49–56
- Sarpong G, Osseo K, Tien M.** 2011. Fungal pretreatment of sulfides in refractory gold ores. *Minerals Engineering* 24. 499–504
- Sasaki K,** 1997. Raman study of the microbially mediated dissolution of pyrite by *Thiobacillus ferrooxidans*. *The Canadian Mineralogist*. 35, 999-1008
- Schippers A, Sand W.** 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and environmental microbiology*; 319–321
- Schippers A, Nagy A, Kock D, Melcher F, Gock E.** 2008. The use of FISH and real-time PCR to monitor the biooxidation and cyanidation for gold and silver recovery from a mine tailings concentrate (Ticapampa, Peru). *Hydrometallurgy* 94; 77–81.
- Schippers A, Hedrich S, Vasters J, Drobe M, Sand W, Willscher S.** 2013. Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. DOI: 10.1007/10_2013_216.
- Sekhar C, Cunha M, Sandström A.** 2009a. Comparative study on different steel slags as neutralising agent in bioleaching. *Hydrometallurgy* 95; 190–197
- Sekhar C, Sundkvist J, Sandström Å.** 2009b. A study on the toxic effects of chloride on the biooxidation efficiency of pyrite. *Journal of Hazardous Materials* 172; 1273–1281.
- Sekhar C, Sundkvist J, Dopson M, Sandström Å.** 2010. Effect of Chloride on Ferrous Iron Oxidation by a *Leptospirillum ferriphilum*-Dominated Chemostat Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 106, No. 3; 422-431
- Sekhar C, Srichandan H, Kim D, Akcil D.** 2012. Biohydrometallurgy and Biomineral Processing Technology: A Review on its Past, Present and Future. *Research Journal of Recent Sciences*. Vol. 1(10); 85-99
- Shehata F, Whitton B.** 1982. Zinc tolerance in strains of blue-green algae, *Anacystis nidulans*. *European Journal of Phycology* 17; 5-12.
- Shiers D, Blight K, Ralph, D.E.** 2005. Sodium sulphate and sodium chloride effects on batch culture of iron oxidising bacteria. *Hydrometallurgy*, 80: 75–82
- Shrihari R. Gandhi K.** 1990. Modelling of Fe²⁺ oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 33, 524–528.

- Shrihari R, Gandhi K, Natarajan K.** 1991. Role of cell attachment in leaching of chalcopyrite mineral by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 36: 278-282
- Simate G, Ndlovu S.** 2014. Acid mine drainage: Challenges and opportunities. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2; 1785–1803
- Smith F.** 1942. Variation in the properties of pyrite. *American Mineralogist*. 27; 1-19.
- Solá C, Gódia F.** 1995. Scale-Up. In: Asenjo J.A., Merchuk J.C. (Editors). *Bioreactor System Desing*. Marcel Dekker Inc. New York; 511 -552.
- Sonnleitner B.** 1998. Dynamic adaptation of microbes. *Journal of Biotechnology* 65; 47–60
- Stromberg B. Banwart S.** 1999. Experimental study of acidity-consuming processes in mining waste rock: some influences of mineralogy and particle size. *Applied Geochemistry* 14: 1-16
- Sun L, Zhang X, Tan W, Zhu M.** 2012. Effect of agitation intensity on the biooxidation process of refractory gold ores by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 127-128. 2012; 99–103
- Suzuki I.** 2001. Microbial leaching of metals from sulfide minerals. *Biotechnology Advances* 19: 119 - 132
- Tao H, Dongwei L.** 2014. Presentation on mechanisms and applications of chalcopyrite and pyrite bioleaching in biohydrometallurgy – a presentation. *Biotechnology Reports* 4; 107–119
- Tanaka M, Yamaji Y, Fukano Y, Shimada K, Ishibashi J, Hirajima T, et al.** 2014. Biooxidation of gold-, silver, and antimony-bearing highly refractory polymetallic sulfide concentrates, and its comparison with abiotic pre-treatment techniques. *Geomicrobiology Journal*, DOI: 10.1080/01490451.2014.981645
- Torma E, Walden C, Duncan W, Branion R.** 1972. The effect of carbon dioxide and particle surface area on the microbiological leaching of a zinc sulphide concentrate. *Biotechnology and Bioengineering* 14; 777-786.
- Tributsch H, Bennett J.** 1981. Semiconductor-electrochemical aspects of bacterial leaching. Part 2. Survey of rate-controlling sulphide properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 31; 627-635
- Tributsch H.** 2001. Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59; 177–185.
- Tributsch H, Rojas-Chapana J.** 2004. Bio-leaching of pyrite accelerated by cysteine. *Electrochemical Acta*. 45, 4705–4716.
- Trujillo M, Valdez N.** 2006. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista latinoamericana de microbiología*. Vol. 48, N. 3-4. 269 – 280.
- Trujillo E, Martínez V, Flores N.** 2008. Ajuste del Equilibrio Químico del Agua Potable con Tendencia Corrosiva por Dióxido de Carbono. *Información tecnológica*, vol. 19; 89-101

- Tufvesson P, Fu W, Jensen J, Woodley J.** 2010. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food and bioproducts processing* 88; 3–11
- Tuovinen O, Niemelä S, Gyllenberg H.** 1971. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. *Antonie Van Leeuwenhoek* 37; 489-496.
- Tuovinen O, Kelly D.** 1972. Biology of *Thiobacillus ferrooxidans* in the relation to the microbiological leaching of sulphide ores.
- Tuttle J, Dugan P.** 1976. Inhibition of growth, iron and sulfur oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans* by simple organic compounds. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 22; 729-730.
- Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson R, Tettelin H, Blake II R, Eisen J, Holmes D.** 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*; 9:597
- Valencia H.** 2004 Manual de prácticas de microbiología básica. Unilibros, Bogota Colombia.
- Veglio F, Beolchini F, Ubaldini S.** 1998. Empirical models for oxygen mass transfer, a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. *Process Biochemistry* Vol. 33, No. 4; 367-376.
- Wang Z, Che J, Ye C.** 2010. Application of ferric chloride both as oxidant and complexant to enhance the dissolution of metallic copper. *Hydrometallurgy* 105; 69–74
- Watling H.** 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – a review. *Hydrometallurgy* 84; 81–108
- Watling H.** 2011. Adaptability of biomining organisms in hydrometallurgical processes. En Santos L, Monteiro D, Gomes C. *Biohydrometallurgical processes: A practical approach*. CETEM. Rio de Janeiro
- Wiersma L, Rimstidt D.** 1984. Rates of reaction of pyrite and marcasite with ferric iron at pH 2. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48; 85-92.
- Xia L, Liu, X, Zeng J, Yin C, Gao J, Liu J, Qiu G.** 2008. Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite. *Hydrometallurgy* 92; 95-101.
- Xun Z, Guohua G, Keting H, Chongqing W.** 2014. Bioleaching behavior and surface property of pyrites in different metallogenic conditions. *Chin.J.Geochem.* 33:256–261
- Yagi D, Yoshida F,** 1975. Gas adsorption by Newtonian and Non-newtonian fluids in sparged agitated vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*. 14 , 488-493
- Yahya A, Johnson D.** 2002. Bioleaching of pyrite at low pH and low redox potentials by novel mesophilic Gram-positive bacteria. *Hydrometallurgy* 63; 181– 188

Yuan F. 2012. Corrosive Effects of Chlorides on Metals, Pitting Corrosion, Prof. Nasr Bensalah (Ed.). ISBN: 978-953-51-0275-5, InTech

Zahari M, Jaapar J, Bunyok A, Sohor S, Ahmad W. 2003. Biooxidation of mine tailings using mixed bacterial population. 15th International Biohydrometallurgy Symposium.

Zammit C, Cook N, Brugger J, Ciobanu C, Reith F. 2012. The future of biotechnology for gold exploration and processing. *Minerals Engineering* 32; 45–53

Zapata H. 2004. Manual de prácticas de microbiología básica. UNIBIBLOS. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia

Zapata D. 2006. Mineralogía del proceso de oxidación bacteriana de esfalerita, proveniente del distrito minero de Marmato (Caldas). [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.

Zapata M, Márquez M, Ossa M. 2007. Sulphur product layer in sphalerite biooxidation: Evidences for a mechanism of formation. *Advances Materials Research*, 20 (21); 134-138

Zhang L, Qiu Z, Hu Y, Sun X, Li J, Gu, G. 2008. Bioleaching of pyrite by *A. ferrooxidans* and *L. ferriphilum*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18(6), 1415–1420.