



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

CONICET



---

C I N D E F I

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

**Camila Safar**

*"Estudios sobre la biolixiviación de sulfuros metálicos  
utilizando especies de arqueas"*

**Director**

Dr. Edgardo Donati

**Tutora**

Dra. Camila Castro

**- Agosto de 2018 -**

## RECONOCIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) por permitirme utilizar sus espacios y equipamiento para realizar mi Trabajo Final de Carrera.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA) por otorgarme la beca de entrenamiento BENTR18 que facilitó el desarrollo de este Trabajo Final de Carrera.

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por formarme como profesional y como persona.

## AGRADECIMIENTOS

A mi director, Dr. Edgardo Donati, por brindarme la posibilidad de realizar mi trabajo final de grado en su laboratorio. Por otorgarme la libertad de elegir y participar. Por formarme y guiarme en mis inicios en la ciencia y la investigación.

A mi tutora, Dra. Camila Castro, por acompañarme en cada momento en el desarrollo de mi trabajo. Por su paciencia y calidez. Por ayudarme en cada cosa que necesité y por confiar en mí. Por hacerme notar cuando las cosas estaban bien y por la buena disposición cuando había cosas que mejorar.

A mis compañeros del Laboratorio 678 por ayudarme siempre y hacerme sentir bienvenida desde el principio. A Marce, Gra y Ceci por la paciencia, la ayuda y por transmitirme calma cuando las cosas no iban bien. A Ger, Fran, Monse y Ale por los almuerzos, el apoyo y por hacerme pasar muy buenos momentos en esta última etapa de la carrera.

A mis amigos, por estar siempre para mí en cada etapa de mi vida. Porque son fundamentales, por escucharme y aconsejarme sea cual sea el problema. Porque los momentos más lindos de mi carrera y de mi vida, siempre fueron en su compañía.

Y en especial, a toda mi familia. A mis padres, Patricia y Félix, y a mis hermanos, Augusto, Julieta y Santiago, porque sin ellos no sería lo que soy hoy en día. Por darme la posibilidad de estudiar y de elegir una carrera universitaria con su total apoyo. Por aguantarme en momentos de estrés y de crisis. Por sentir mi felicidad como si fuera suya.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	6
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	8
2.1. Metales y minería: impacto histórico y social.....	8
2.2. Técnicas metalúrgicas.....	9
2.3. Biolixiviación.....	11
2.3.1. Microorganismos lixiviantes.....	12
2.3.2. La importancia de los biofilms.....	13
2.3.3. Sulfuros metálicos. Calcopirita: mecanismos de disolución .....	14
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	17
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES.....</b>	18
4.1. Microorganismos utilizados.....	18
4.1.1. <i>Acidians copahuensis</i> .....	18
4.1.2. <i>Sulfolobus metallicus</i> .....	18
4.1.3. <i>Acidians ambivalens</i> .....	19
4.2. Concentrado de mineral.....	19
4.3. Espectrofotometría de absorción atómica con llama.....	20
4.4. Determinación del pH y Eh de los cultivos mediante electrodos.....	21
4.5. Recuento celular en cámara Thoma.....	21
4.6. Medio Mackintosh (MAC).....	22
<b>5. PRIMERA PARTE: Cinéticas de crecimiento.....</b>	23
5.1. Introducción y objetivos.....	23
5.2. Ensayo: materiales y métodos.....	23
5.3. Resultados y discusión.....	24
5.4. Conclusiones.....	26
<b>6. SEGUNDA PARTE: Adhesión al mineral.....</b>	27
6.1. Introducción y objetivos.....	27
6.2. Microscopías y tinciones: materiales y métodos.....	28
6.3. Resultados y discusión.....	29
6.4. Conclusiones.....	33
<b>7. TERCERA PARTE: Biolixiviaciones.....</b>	35
7.1. Introducción y objetivos.....	35
7.2. Ensayo: materiales y métodos.....	35
7.2.1. Preparación del inóculo.....	35

7.2.2. Armado de los sistemas.....	36
7.2.3. Muestreo y parámetros a evaluar.....	38
7.3. Resultados y discusión.....	39
7.4. Conclusiones.....	49
<b>8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>52</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>54</b>
9.1. Método de cuantificación de Fe <sup>+2</sup> por o-fenantrolina.....	54
9.2. Protocolo FISH para muestras sólidas.....	56
9.3. Protocolo de tinción de muestras sólidas usando concanavalina A.....	59
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>60</b>

## 1. RESUMEN

En este trabajo se estudió la biolixiviación de un mineral que contiene principalmente calcopirita, un sulfuro doble de Cu y Fe que es la principal mena de Cu en el mundo. Es prácticamente insoluble en medio acuoso, por lo que se buscó solubilizar los metales que componen a este mineral a partir de la catálisis microbiana. Tiene la particularidad de ser refractario a la lixiviación química y biológica, característica se ve disminuida a medida que aumenta la temperatura del proceso. Fue por eso entonces que, dentro de la gama de microorganismos lixiviantes disponibles, se eligió trabajar con arqueas termófilas cuyas temperaturas óptimas de crecimiento rondan los 70°C. Los estudios realizados con este tipo de microorganismos son muy escasos: la información disponible de microorganismos lixiviantes es, en su mayoría, de bacterias mesófilas, las cuales se utilizan con éxito en diversos lugares del mundo en aplicaciones de biolixiviación a gran escala. En el caso particular del mineral de trabajo, estos microorganismos no son convenientes debido a que la temperatura de crecimiento óptima no es lo suficientemente alta como para minimizar el efecto refractario.

A partir de los ensayos preliminares de crecimiento, se seleccionó a *Acidianus copahuensis* como microorganismo de trabajo para las experiencias de biolixiviación. Esta nueva especie de arqueas aislada y estudiada por integrantes del grupo, posee la capacidad de biolixiviar diversos minerales, incluyendo a la calcopirita.

Teniendo en cuenta estos últimos aspectos, en este trabajo se estudió la recuperación de cobre utilizando el microorganismo seleccionado, teniendo presente que este metal es extremadamente valioso para la humanidad y la explotación de ese recurso sería muy beneficioso desde el punto de vista

económico para el país. Se ensayaron diversas condiciones que permitieron sacar algunas conclusiones acerca de qué tipo de etapas son las involucradas en la biolixiviación y cuáles podrían llegar a ser las limitantes de la misma. El mejoramiento del proceso resulta importante especialmente en función de utilizar esta metodología como una posible alternativa para la minería metalífera. Este trabajo pretende brindar herramientas para continuar investigando sobre la temática y profundizar sobre los aspectos aquí analizados.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### ***2.1. Metales y minería: impacto histórico y social***

Los metales comprenden un conjunto de materiales utilizados por el hombre desde épocas prehistóricas. Sus principales características incluyen la capacidad de transmitir la electricidad y el calor, su maleabilidad, ductilidad, dureza y brillo. Los elementos metálicos son sólidos (a excepción del mercurio) y poseen la capacidad de formar aleaciones muy diversas. Eran sólo el oro, la plata, el cobre, entre otras pocas especies, los metales que se encontraban disponibles como tal en la naturaleza. Se los trabajaba mecánicamente, generando estructuras tipo láminas. Luego, con los avances tecnológicos de la época, comenzaron a utilizarse minerales metalíferos como materia prima para obtener diversos tipos de materiales, como aleaciones y algunos nuevos metales con relativo grado de pureza. El uso de hornos y moldes dio origen a la metalurgia, la cual provocó avances tecnológicos significativos en la historia de la humanidad. Con el transcurso del tiempo, los métodos de obtención/purificación se fueron perfeccionando, consiguiendo así otros tipos de metales con nuevas propiedades que permitieron que hoy tengamos la amplia disponibilidad de materiales que se emplean en los más diversos rubros como la construcción, la electrónica, la medicina, el transporte, entre otros.

La minería es una actividad necesaria y que lleva consigo problemáticas ambientales y sociales que, en países menos desarrollados, pueden ser realmente dramáticas. La falta de regulación en muchos países respecto de cómo deben llevarse a cabo las actividades mineras, genera la contaminación de zonas aledañas a las minas e incluso de áreas que se encuentran a varios kilómetros, río abajo del recorrido que naturalmente toman los cauces que



atraviesan las zonas explotadas. La contaminación por metales pesados y drenajes ácidos no sólo afecta directamente a las personas sino también a todo el ecosistema que las rodea: se alteran equilibrios naturales en todos sus niveles generando muchos problemas a las sociedades que se encuentran próximas a las minas. Estos tipos de inconvenientes se ven incrementados cuando el metal deseado se encuentra en una muy baja proporción o ley dentro de mineral, ya que en ese caso, los métodos extractivos suelen ser más agresivos, generan más residuos y, consecuentemente, producen un mayor impacto ambiental.

## **2.2. Técnicas metalúrgicas**

Paralelamente a estas problemáticas, sabemos que es prácticamente imposible prescindir del uso de metales en la vida moderna. Esto nos lleva a una controversia que moviliza a la comunidad científica y tecnológica, generando que se estén desarrollando nuevas metodologías metalúrgicas, menos agresivas, con el objetivo principal de minimizar los daños inherentes a la minería tradicional y encontrar nuevas tecnologías que optimicen los procesos relacionados con la recuperación de metales en todas sus variedades. Cada metodología posee ventajas y desventajas, por lo que en general la obtención de metales en la actualidad se da a través de una combinación de éstas y no de un reemplazo total de los métodos tradicionales. Además, la elección de una técnica metalúrgica depende muy fuertemente de la naturaleza química del mineral a trabajar.

La **pirometalurgia** fue la principal técnica de obtención de metales a lo largo de la historia y también lo es en la actualidad en la mayoría de los países. Consiste principalmente en someter a los minerales metalíferos a tratamientos fisicoquímicos con altas temperaturas, lo cual es muy eficiente pero conlleva a

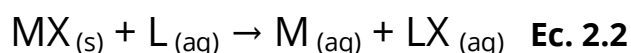
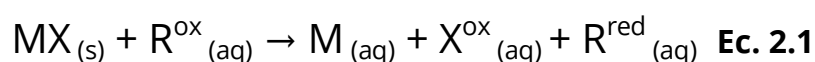
consumos de energía extremadamente elevados. Tiene la ventaja de que las velocidades de reacción son altas y, además, pueden tratarse una gran variedad de compuestos, siempre y cuando no posean al metal en baja ley. Generalmente, se producen gases y subproductos tóxicos en el proceso que finalmente terminan liberándose al ambiente. Es por eso que en muchos países el uso de la pirometalurgia se encuentra muy regulado, impidiendo su utilización en determinados casos. A causa de este tipo de inconvenientes, surgieron nuevas técnicas para reemplazar estos procedimientos, siendo una de ellas la **hidrometalurgia**. El principio de esta técnica consiste en solubilizar (lixiviar) los metales en medios acuosos a través de un proceso químico o biológico para luego recuperarlos mediante electrólisis. Muchos metales en la naturaleza se encuentran combinados con otras especies formando sulfuros, óxidos, fosfatos, etc., muchos de ellos muy poco solubles; el proceso de lixiviación los solubiliza y permite recuperarlos finalmente desde soluciones acuosas. Este tipo de procedimiento se realiza usualmente a temperaturas mucho más bajas que aquellas utilizadas en la pirometalurgia aunque su cinética se puede incrementar a medida que se aumenta la temperatura.

La **biominería**, comprende un conjunto de técnicas hidrometalúrgicas que se basan en la acción de microorganismos (en su mayoría procariotas) en pos de facilitar la extracción y recuperación de metales a partir de minerales y materiales de desecho (Johnson, 2014). La remediación de residuos con metales pesados, el pretratamiento de minerales para facilitar la recuperación metálica (biooxidación) y la recuperación de metales presentes en minerales (biolixiviación) son tecnologías comprendidas dentro de la biominería.

### 2.3. Biolixiviación

Consiste en el proceso de solubilización de metales presentes en diversos minerales prácticamente insolubles a partir de la acción microbiana. La biolixiviación comprende un caso particular dentro de la biohidrometalurgia y es una alternativa biológica a los métodos tradicionales de la minería, siendo una opción menos contaminante y, en muchos casos, menos costosa. Las desventajas que presenta esta metodología es que los tiempos de reacción son lentos cuando se los compara con la pirometalurgia. Aún así, el empleo de la biolixiviación en el mundo es creciente, existiendo numerosos países del mundo que la utilizan con éxito.

El metabolismo de obtención de energía de los microorganismos involucrados genera agentes lixiviantes que catalizan indirectamente la disolución del mineral, en un proceso que puede ser redox o no:

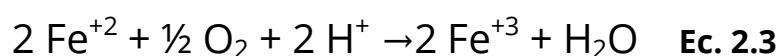


donde  $MX_{(s)}$  es un mineral insoluble,  $M_{(aq)}$  es el catión correspondiente al metal de interés, X es un grupo genérico que podría ser un óxido, un fosfato, un sulfuro, etc., y que puede oxidarse y disolverse frente a  $R^{ox}_{(aq)}$  como en el caso de la Ecuación 2.1 (nótese que los supraíndices "ox" y "red" corresponden a oxidado y reducido, respectivamente) o simplemente disolverse, como en el caso de la Ecuación 2.2. Finalmente el metal  $M_{(aq)}$  puede recuperarse a través de un proceso electrolítico o similar para obtener el metal puro  $M_{(s)}$ . Los roles de las especies R y L son claves en el proceso de solubilización del mineral por acción microbiana y se generan a partir del metabolismo microbiano.

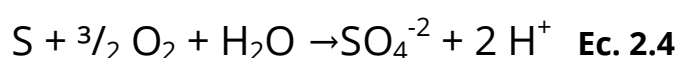
### 2.3.1. *Microorganismos lixiviantes*

La solubilización de la mayoría de los metales se realiza en condiciones ácidas, por lo que una de las principales características de los microorganismos empleados en la biolixiviación es que son acidófilos. Además, otra cualidad que los caracteriza es que toleran elevadas concentraciones de metales pesados, que son tóxicos, en general, para la mayoría de los seres vivos. Son quimiolitautótrofos, es decir, utilizan las especies inorgánicas del medio para obtener energía y además fijan CO<sub>2</sub> como fuente de carbono. Pueden clasificarse en tres grandes grupos en función de la temperatura óptima de crecimiento: mesófilos (entre 25°C-40°C), termófilos intermedios (entre 40°C-55°C) y termófilos extremos (entre 55°C-70°C).

Los principales géneros de microorganismos lixiviantes son *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Sulfobacillus*, *Ferroplasma*, *Sulfolobus*, *Metallosphaera*, *Acidianus*, entre otros, pertenecientes a los dominios Bacteria y Arquea. Como fue mencionado previamente, el metabolismo de obtención de energía de estos microorganismos genera especies reactivas que son finalmente las que disuelven el mineral de interés. La mayoría de estos microorganismos tiene la capacidad de catalizar la oxidación de Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup> bajo condiciones aeróbicas con oxígeno como último aceptor electrónico:



Algunas especies hierro-oxidantes también pueden oxidar azufre elemental a sulfato, proceso que también puede ser catalizado por otros microorganismos que no son capaces de oxidar hierro:



Nótese que los protones, además de actuar como agentes lixiviantes, proveen el medio ácido necesario para que el  $\text{Fe}^{+3}$  permanezca disuelto y activo. La posibilidad de algunos microorganismos de oxidar azufre elemental evita la acumulación del azufre que puede depositarse sobre la superficie del mineral dificultando la accesibilidad de los reactivos al mismo. El ion  $\text{Fe}^{+3}$  y los protones generados en la oxidación del azufre pueden actuar como agentes lixiviantes frente a la mayoría de los minerales, provocando, generalmente a través de una serie de etapas, la liberación del catión metálico a la solución. Estos procesos se describen con mayor detalle en la sección 2.3.3.

### **2.3.2. La importancia de los biofilms**

La velocidad global del proceso de ataque al mineral por parte de un agente lixiviante queda determinada por la velocidad de dos de sus etapas: la difusión de dicho agente hasta la superficie del mineral y la reacción química en sí misma. En la mayoría de los casos, la difusión del agente lixiviante es el paso limitante del proceso. Un gran número de microorganismos lixiviantes posee la capacidad de adherirse al mineral para finalmente formar un biofilm en una estructura compuesta por células y sustancias poliméricas extracelulares (EPS). De este modo, el proceso de ataque al mineral tiene lugar esencialmente dentro de la estructura del biofilm lo que minimiza los tiempos de difusión y acelera el proceso de solubilización. La capacidad de un microorganismo de generar biofilms le brinda una ventaja adaptativa clave en el proceso de obtención de energía y de solubilización de metales y es por eso que en este trabajo se ha estudiado la formación y desarrollo de los mismos. Por otro lado, las células planctónicas que se encuentran en el seno de la solución (no asociadas al biofilm) también contribuyen, aunque en menor medida, al ataque del mineral por productos metabólicos. Debido a ello se habla de un mecanismo de ataque

por contacto (debido a las células sésiles y al biofilm) y un mecanismo de no-contacto (propio de las células planctónicas) (Sand, et al. 2001; Rawlings, 2002).

### **2.3.3. Sulfuros metálicos. Calcopirita: mecanismos de disolución.**

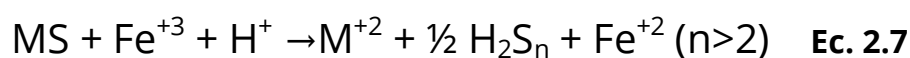
Hay acuerdo en la comunidad científica acerca de que el proceso de biolixiviación de un sulfuro metálico es esencialmente indirecto y que está mediado principalmente por los iones  $\text{Fe}^{+3}$  y/o  $\text{H}^+$  generados por los microorganismos lixiviantes en busca de energía (Watling, 2006).

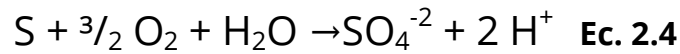
Dependiendo del tipo de sulfuro metálico, existen dos vías propuestas para la oxidación de los mismos (Schippers, et al. 1996, 1999; Schippers & Sand, 1999; Sand, et al. 2001). En el caso de sulfuros que no son atacados por protones (por ejemplo, pirita) la vía propuesta es la del tiosulfato. Por otro lado, los sulfuros que sí pueden ser lixiviados por protones (calcopirita, entre otros) son oxidados por la vía de polisulfuros o politionatos.

La primera de estas vías consiste en la oxidación del mineral por parte de los iones  $\text{Fe}^{+3}$  generados por los microorganismos hierro oxidantes, según las siguientes reacciones:



mientras que el mecanismo vía politionatos ocurre a través de los  $\text{H}^+$  y/o el  $\text{Fe}^{+3}$  generados por los microorganismos hierro y azufre oxidantes:

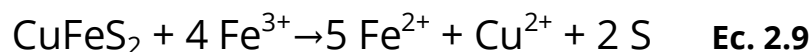




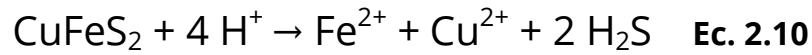
La estequiometría de las ecuaciones implicadas en la vía del tiosulfato, fueron determinadas utilizando isótopos estables de oxígeno y azufre (Balci, et al. 2007). Para el caso de la vía de los polisulfuros, se empleó la misma metodología (Thurston, et al. 2010; Balci, et al. 2012). Se puede observar que en ambas vías, los protones son un producto neto del proceso de biolixiviación, lo cual implica que a medida que se oxida el sulfuro metálico, el pH del medio decrece.

Los sulfuros de cobre son minerales representativos en los procesos de biolixiviación, ya que existen numerosas aplicaciones comerciales para los mismos. Entre ellos, la calcopirita es el más abundante en el mundo y además es el más refractario: este "cuello de botella" es el blanco de numerosas investigaciones, ya que optimizar el método de recuperación de cobre a partir de este mineral provocaría, con mucha seguridad, un salto importante en la industria mundial de este metal. Al ser la calcopirita uno de los sulfuros metálicos que puede disolverse por la acción de protones, podemos suponer que la vía predominante de los ensayos realizados en este trabajo es la de polisulfuros.

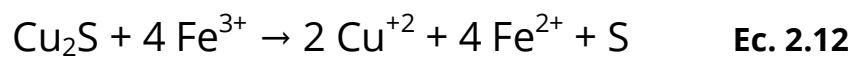
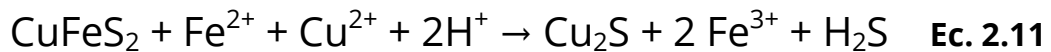
El proceso de lixiviación de calcopirita por  $\text{Fe}^{3+}$  estaría representado por la siguiente ecuación:



Por otro lado, la calcopirita también puede ser solubilizarse en respuesta a una reacción no-oxidativa generada por los protones (Nicol & Lázaro, 2003):



Además de las vías oxidativas de la calcopirita, existen algunas condiciones en las que se produce la lixiviación reductiva de este mineral, según las siguientes ecuaciones:



Este mecanismo reductivo ocurre cuando el potencial redox es relativamente bajo mientras que el oxidativo ocurre en la condición contraria.

Los procesos comerciales de biolixiviación para la recuperación de cobre se realizan en pilas de lixiviación y, en mucha menor medida, en tanques agitados; en la mayoría de ellos se utilizan microorganismos mesófilos o termófilos moderados, cuya eficiencia es alta excepto cuando se trata de minerales refractarios como la calcopirita. Esto justifica los intentos por utilizar microorganismos termófilos para minimizar el efecto refractario de este tipo de minerales con la temperatura y consecuentemente, hacer más eficiente el proceso de recuperación de metales.



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las **hipótesis** planteadas para este trabajo se elaboraron a partir de la información descrita en la sección introductoria y se detallan a continuación:

1. Los microorganismos termófilos serán eficientes en la biolixiviación de calcopirita.
2. La formación de biofilms de estos microorganismos, tal cual ocurre para los mesófilos, es una etapa importante que determina la velocidad y la eficiencia del proceso.

En función de estas hipótesis, se establecen los siguientes objetivos para esta tesina:

El **objetivo general**, además de involucrar la adquisición de competencias relacionadas al trabajo experimental y de laboratorio, es evaluar y comparar las eficiencias de recuperación metálica por biolixiviación de un mineral utilizando microorganismos termófilos.

Los **objetivos específicos** consisten en lo siguiente:

1. Comparar el crecimiento de distintas especies de arqueas termófilas y determinar la especie potencialmente más adecuada para la biolixiviación de calcopirita.
2. Evaluar la recuperación metálica por biolixiviación de calcopirita bajo diferentes condiciones. Analizar el rol de la etapa de colonización de la superficie del mineral y su posible influencia durante el proceso de biolixiviación.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES**

### **4.1. *Microorganismos utilizados***

#### **4.1.1. *Acidianus copahuensis***

Esta arquea termófila fue aislada recientemente en la zona geotermal Caviahue-Copahue, Neuquén (Giaveno, et al. 2013). Se encuentra dentro de las nueve especies de *Acidianus* conocidas, todas aisladas de ambientes ácidos y termales. Sus condiciones óptimas de crecimiento son: pH de aproximadamente 2,5 y temperatura cercana a los 75°C. Aún así, este microorganismo tiene la capacidad de crecer en un rango amplio de temperaturas. Fue caracterizado fisiológicamente por los integrantes del grupo de trabajo en el que se realizó esta tesina y se han realizado diversos estudios previamente que demostraron su capacidad lixivante. Puede crecer utilizando una amplia diversidad de fuentes de energía, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Es un microorganismo hierro y azufre oxidante que, si bien puede crecer en condiciones autotróficas, suele desarrollarse mejor en condiciones mixotróficas (adicionando extracto de levadura al cultivo). Por su amplia versatilidad metabólica y de crecimiento, esta arquea podría llegar a emplearse en procesos a gran escala (pilas de lixiviación) ya que tolera condiciones muy diversas. Debido a que este microorganismo ha sido aislado recientemente, aún existen muchos aspectos pendientes de estudio y es por eso que se escogió para este trabajo.

#### **4.1.2. *Sulfolobus metallicus***

Se trata de otra arquea termófila, aislada en el año 1991 en Islandia, y que

pertenece al género *Sulfolobus*, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el mundo. Las especies del género son estrictamente aeróbicas y, *S. metallicus* particularmente, tiene la restricción de crecer únicamente de forma quimiolitotrófica, es decir, que no puede utilizar fuentes de carbono orgánico para desarrollarse. Su temperatura óptima de crecimiento ronda los 65°C. Esta especie fue elegida porque ya es utilizada en algunas aplicaciones comerciales biohidrometalúrgicas.

#### **4.1.3. *Acidianus ambivalens***

*A. ambivalens* es otra arquea termófila cuya temperatura óptima de crecimiento ronda los 75°C. Puede crecer tanto aeróbica como anaeróbicamente pero únicamente bajo condiciones quimiolitotróficas, al igual que *S. metallicus*. Su pH óptimo de crecimiento ronda los 2,5 y, si bien no existen trabajos publicados que demuestren su capacidad lixivante, se realizaron ensayos en nuestro laboratorio que demostraron que *A. ambivalens* puede lixiviar calcopirita. Esto era esperable debido a las semejanzas genéticas y metabólicas que posee con *A. copahuensis*. Debido a esta última razón, se escogió como el tercer microorganismo para este trabajo.

#### **4.2. *Concentrado de mineral***

Se utilizó un concentrado de mineral proveniente del yacimiento de Bajo La Alumbra que explota la Minera Alumbra desde 1997. Dicho yacimiento se encuentra ubicado en el departamento de Belén, al noroeste de la provincia de Catamarca, Argentina. El concentrado producido por la minera se caracteriza por ser refractario y poseer un elevado contenido de cobre, molibdeno y oro.

Mediante difracción de rayos X, se determinó que los principales sulfuros

presentes en el mineral son calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$  77,4%), pirita ( $\text{FeS}_2$  19,6%), molibdenita ( $\text{MoS}_2$  2,0%) y esfalerita ( $\text{ZnS}$  1,0%). La estimación cuantitativa de la composición mineralógica se realizó mediante el análisis Rietveld. Además, mediante espectrofotometría de emisión óptica asociada al plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se realizaron determinaciones químicas de los principales elementos presentes en la muestra, previa digestión completa: Cu (24,20%), Fe (31,15%), Mo (0,76%), Zn (0,56%), Pb (0,26%), Ag (0,02%), Au (0,002%), Ni (0,002%), entre otros. Estas determinaciones no se hicieron dentro del trabajo de la tesina pero son datos útiles que se utilizaron en el análisis de los resultados.

### **4.3. Espectrofotometría de absorción atómica con llama**

Se utilizó este método analítico para evaluar la concentración metálica de los lixiviados a lo largo del tiempo. En este caso se describe la metodología con más detalle porque las determinaciones en este equipo formaron parte del trabajo en esta tesina.

El principio de funcionamiento de esta metodología es la absorción de radiación de longitud de onda específica por parte de los átomos de un determinado elemento en estado fundamental. Cuando se introduce una muestra líquida en forma de pequeñas gotitas en el seno de una llama apropiada, ocurren una serie de etapas que finalizan en la formación de un vapor atómico. Dichos átomos se encuentran en estado fundamental y tienen la capacidad de absorber determinada longitud de onda ( $\lambda$ ) para pasar a un primer estado excitado. Dicho  $\lambda$  depende de la identidad química del elemento en cuestión.

Cuando se irradia una muestra con un haz de luz monocromático

(correspondiente a la longitud de onda de la primera línea de resonancia de un elemento), la intensidad del haz decrece a causa de que los átomos de dicho elemento absorben, siempre y cuando estén presentes en la muestra. Dicha absorción es directamente proporcional a la concentración de átomos presentes en la llama, con lo cual se puede cuantificar censando cuánto decrece la intensidad de luz luego del paso a través de la muestra.

Para emitir este tipo de haz, se utilizan lámparas de cátodo hueco de cada elemento a determinar. En nuestro caso particular, se utilizaron lámparas de Cu y Fe para determinar sus concentraciones totales solubles en los lixiviados. Se realizó una curva de calibración correspondiente a cada elemento, utilizando soluciones de concentración conocida de los mismos y HNO<sub>3</sub> 0,14 N como blanco (solvente de las muestras).

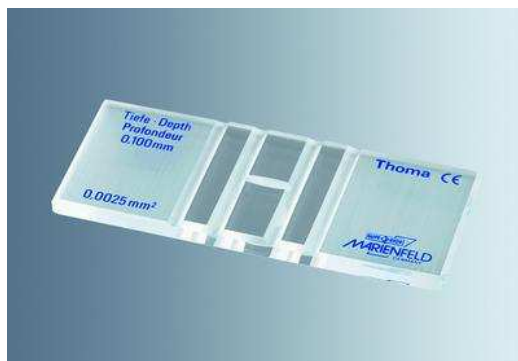
#### ***4.4. Determinación del pH y Eh de los cultivos mediante electrodos***

Se realizó seguimiento de pH y del potencial redox (Eh) mediante electrodos específicos. Las determinaciones de pH se realizaron tanto en cultivos como en los sistemas de biolixiviación. Los valores de pH dan cuenta del consumo o de la producción de protones mientras que los valores de Eh están principalmente determinados por la relación Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup>.

#### ***4.5. Recuento celular en cámara Thoma***

Se realizaron recuentos en cámara de los microorganismos en suspensión con la finalidad de determinar la concentración celular planctónica de los cultivos. El método consiste en realizar conteos de los microorganismos que se observan al microscopio, los cuales se encuentran en un pequeño volumen conocido de la cámara. Se realiza un promedio entre los conteos en distintos

campos para que el recuento sea representativo del total del cultivo. Finalmente, conociendo el número de microorganismos que se encuentra en el volumen de la cámara, se determina la concentración celular planctónica por mililitro.



**Figura 4.1.** Cámara Thoma.

#### **4.6. Medio Mackintosh (MAC)**

Se preparó el medio mediante disolución de las sales en el volumen adecuado y posterior esterilización a 121°C y 1 atm de sobrepresión por veinte minutos. La composición del medio se detalla en la siguiente tabla:

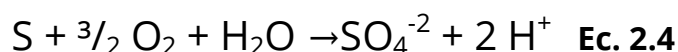
Componentes	(mM)	Componentes	( $\mu$ M)
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	1,00	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	0,5
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	0,20	<b>MnCl<sub>2</sub></b>	0,5
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	1,00	<b>CoCl<sub>2</sub></b>	0,5
		<b>H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub></b>	0,5
		<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	0,05
		<b>CuCl<sub>2</sub></b>	0,05
		<b>MgSO<sub>4</sub></b>	125

**Tabla 4.1.** Componentes del medio MAC.

## 5. PRIMERA PARTE: Cinéticas de crecimiento

### 5.1. Introducción y objetivos

Se realizaron cinéticas de crecimiento de cada uno de los tres microorganismos seleccionados para evaluar cuál es el que podría utilizarse más favorablemente en un proceso de biolixiviación de calcopirita. Se utilizó la misma temperatura y el mismo pH aunque los agregados de fuentes de energía se seleccionaron para ser los óptimos para cada especie. Teniendo presente que la calcopirita puede ser lixiviada bajo condiciones ácidas, tanto en ambientes reducidos como oxidados, el pH fue considerado el mejor parámetro para analizar el potencial lixivante de cada especie. Por esa razón, las tres especies se cultivaron individualmente usando azufre como fuente de energía. Como se indicó previamente, el proceso catalizado por estas especies es el siguiente:



### 5.2. Ensayo: materiales y métodos

Se cultivó la cepa de *A. copahuensis* ALE1 DSM 29038 en aerobiosis a 65°C con agitación (150 rpm) en matraces de Erlenmeyer de cuello fino con medio MAC, ajustado a pH 2, suficiente para alcanzar un volumen final de 100 ml. Se inoculó al 10% con un cultivo crecido en iguales condiciones. El medio se suplementó con 1 % p/v de azufre en polvo (BIOPACK) y 0,1% p/v de extracto de levadura (OXOID).

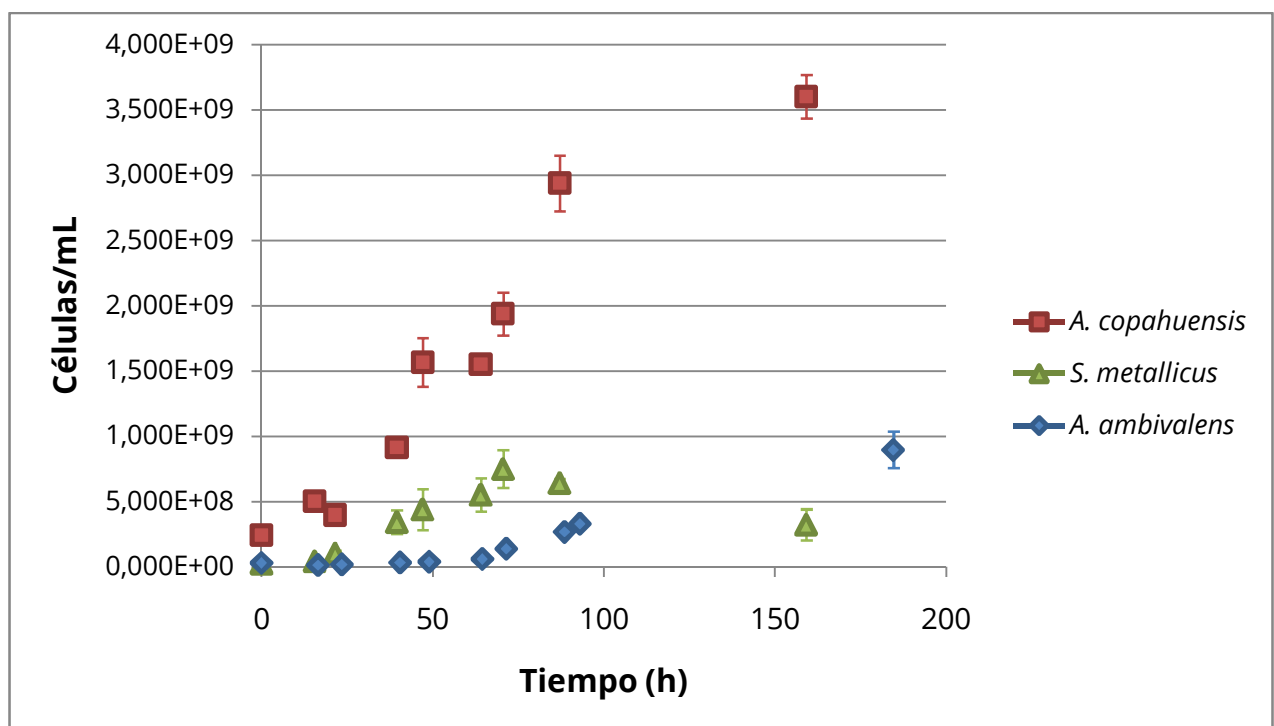
Además, se cultivaron las cepas *S. metallicus* DSM 6482 y *A. ambivalens* DSM 3772 (adquiridas de la colección alemana DSMZ) individualmente en

matraces de Erlenmeyer de cuello fino con suficiente medio MAC, ajustado a pH 2, para completar un volumen de 100 ml; los cultivos se mantuvieron en aerobiosis y a 65°C con agitación (150 rpm). Se inoculó también al 10% con cultivos crecidos en condiciones idénticas. El medio se suplementó con 0,5% p/v de azufre precipitado BIOPACK y 0,02% p/v de extracto de levadura OXOID. Los cultivos para cada microorganismo fueron realizados por triplicado.

Se tomaron dos muestras por día de los distintos cultivos durante el transcurso de una semana. Se realizó un seguimiento del pH de las muestras y un recuento celular en cámara Thoma.

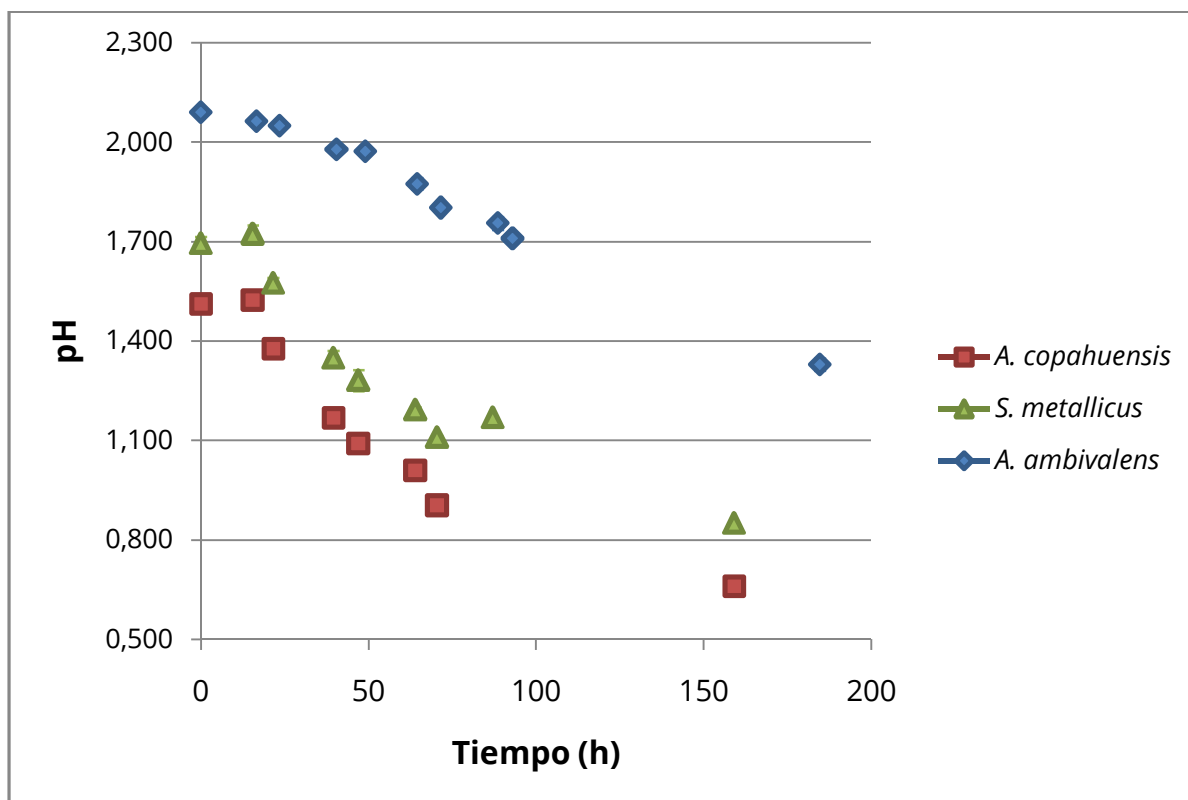
### 5.3. Resultados y discusión

La Figura 5.1 muestra la concentración de células planctónicas en suspensión en función del tiempo para cada cultivo. La Figura 5.2 muestra la evolución del pH en esos mismos cultivos.



**Figura 5.1.** Población celular en suspensión en función del tiempo.





**Figura 5.2.** pH de los cultivos en función del tiempo.

Al comparar ambas gráficas se observa una correlación inicial que indica que la generación de ácido está acoplada al crecimiento microbiano. Al final del ensayo (Figura 5.1), *A. copahuensis* alcanzó un promedio de  $3,6 \times 10^9$  células/ml, mientras que *S. metallicus* y *A. ambivalens* alcanzaron un promedio de  $3,2 \times 10^8$  células/ml y  $9,0 \times 10^8$  células/ml, respectivamente. Aunque esto sugiere un mayor crecimiento de la primera especie, hay que tener presente que estos valores de concentración celular tienen en cuenta solamente a la población que se encuentra en suspensión y no incluye a las células adheridas al azufre elemental. Esto se manifiesta al observar que sigue habiendo descenso de pH en los cultivos aún cuando la población en suspensión se mantiene relativamente constante. Los valores finales de pH para los cultivos de *A. copahuensis*, *S. metallicus* y *A. ambivalens* fueron 0,66, 0,85 y 1,33,

respectivamente. En base a ello, se evidencia que *A. copahuensis* es mucho más eficiente para acidificar el medio generando al menos uno de los agentes lixiviantes de calcopirita.

#### **5.4. Conclusiones**

Los resultados obtenidos indican que *A. copahuensis* es la especie más adecuada para realizar el ensayo de biolixiviación ya que provocó un descenso de pH mayor seguido de modo cercano por *S. metallicus*. También se consiguió una población planctónica de *A. copahuensis* muy superior a la de las otras especies (un orden de magnitud más que la de *S. metallicus* y cuatro veces más que la de *A. ambivalens*) lo que, en principio, sugiere que es más adecuado para preparar inóculos y transferirlo a nuevos cultivos.

## 6. SEGUNDA PARTE: Adhesión al mineral

### 6.1. Introducción y objetivos

La adhesión de microorganismos lixiviantes sobre los sulfuros metálicos es de gran importancia en los procesos de biolixiviación. En general la adhesión a la superficie mineral está mediada principalmente por los EPS producidos por los microorganismos (Vera, et al. 2013). Sin embargo, los procesos de adhesión, producción de EPS y formación de biofilms sobre superficies minerales han sido escasamente estudiados en el caso de las arqueas termoacidófilas (Orell, et al. 2013). Para comprender el rol de estos microorganismos en los procesos de biolixiviación es importante estudiar y visualizar la adhesión y distribución sobre superficies minerales.

Teniendo en cuenta estos aspectos, en esta sección se estudiará la adhesión de *A. copahuensis* sobre el mineral de trabajo con el que se realizarán además los estudios de biolixiviación. Para ello, a distintos tiempos se tomarán muestras sólidas de cultivos de *A. copahuensis* con el concentrado de mineral de trabajo. Se visualizará mediante microscopía láser de barrido confocal (CLSM), la disposición de los microorganismos y el desarrollo de biofilm sobre la superficie del mineral. Se utilizará la técnica FISH (Hibridación Fluorescente *In Situ*) para distinguir microorganismos metabólicamente activos adheridos a la superficie mineral. Además se visualizará la producción de EPS en células sésiles mediante el empleo de la lectina concanavalina A (ConA) conjugada al fluoróforo tetrametilrodamina-tiocianano (TRITC) que se asocia a residuos de  $\alpha$ -glucosa y  $\alpha$ -manosa.

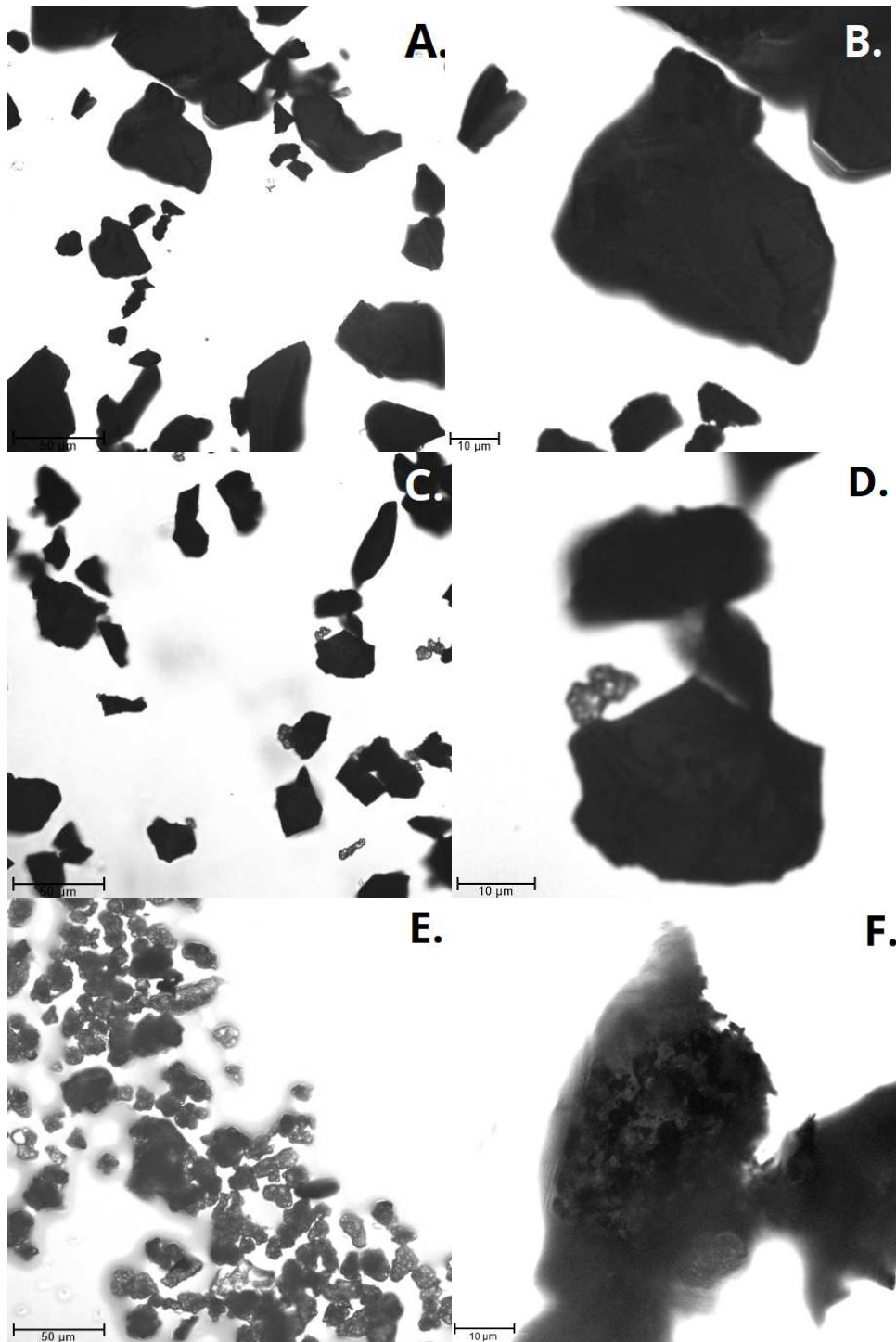
## **6.2. Microscopías y tinciones: materiales y métodos**

*A. copahuensis* se cultivó en 150 ml de medio MAC pH 2 suplementado con el concentrado de mineral a razón de 1 %p/v por 42 días. El cultivo se mantuvo en agitación (150 rpm) y a una temperatura de 65°C. Se tomaron muestras del sólido con el transcurso de 1, 20 y 42 días del cultivo y se fijaron con *p*-formaldehído, siguiendo el protocolo detallado en el Anexo 2, con el objetivo de mantener la integridad morfológica celular de las muestras. Las muestras fijadas de los sólidos a distintos tiempos se conservaron a -18°C para luego realizar las tinciones detalladas a continuación.

Se utilizó la técnica de FISH para observar y analizar la adhesión de los microorganismos a la superficie del mineral: se basa en la hibridación de ácidos nucleicos fijados sobre una muestra con sondas específicas asociadas a fluoróforos. Las muestras previamente fijadas se hibridaron con sondas de distinta especificidad y con el colorante de ADN Syto 62 y se lavaron siguiendo los pasos detallados del protocolo detallado en el Anexo 2. Las sondas probadas fueron ACI175 ([Cy-3] 5' GCAACCUUUAUCUGCCCC 3') específica para la especie *A. copahuensis*, ARCH915 ([Cy-3] 5' GTGCTCCCCCGCCAATTCCT 3') específica para el dominio *Arqueas* y SL ([Cy-3] 5' ACCTCCTCTCCGCGAGTC 3') específica para el orden de arqueas *Sulfolobales*. La sonda que mejor hibridó en la prueba (utilizando controles de muestras de cultivos puros disponibles en el laboratorio) fue la ARCH915, por lo que se seleccionó dicha sonda para seguir trabajando con resto de las muestras.

Muestras de los sólidos fijados se tiñeron con la lectina fluorescente ConA para visualizar la producción de EPS en las células adheridas al mineral, siguiendo los pasos detallados del Anexo 3.

### 6.3. Resultados y discusión



**Figura 6.1.** Imágenes CLSM del mineral con distinto aumento luego de 1 día (A y B), 20 días (C y D) y 42 días de cultivo (E y F).

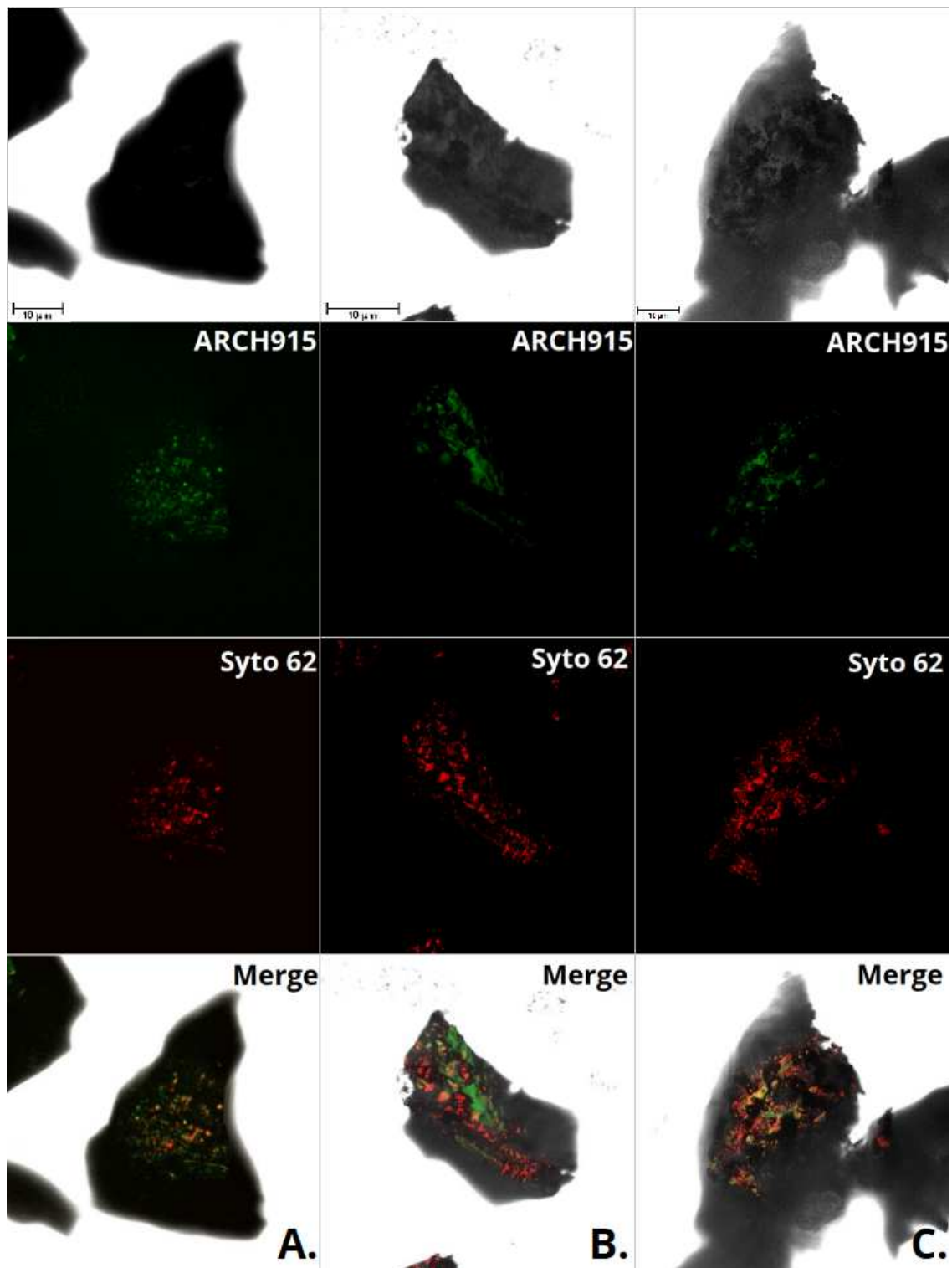
En la Figura 6.1 se muestran imágenes del mineral durante el proceso de biolixiviación con *A. copahuensis*. Inicialmente la apariencia de los granos de mineral es limpia, lisa y se observan algunas grietas e imperfecciones sobre la superficie (Fig. 6.1 A y 6.1 B). Con el transcurso del tiempo los granos de mineral comienzan a verse más corroídos y con bordes más irregulares debido al proceso de lixiviación. En las imágenes correspondientes a los 20 días (Fig. 6.1 C y 6.1 D), se observa además la aparición de granos de otra coloración y tamaño, los cuales podrían corresponderse con la formación de precipitados. Los mismos pueden ser de otras fases sulfuradas formadas durante el ataque microbiano o precipitados de hierro(III), entre otras posibilidades. Luego de 42 días (Fig. 6.1 E y 6.1 F), el mineral se observa altamente corroído, con hoyos en la superficie y una mayor cantidad de posibles precipitados.

En las micrografías con tinciones realizadas mediante la técnica de FISH pueden observarse, además de la degradación del grano, microorganismos adheridos a la superficie mineral luego de 1 día de incubación (Fig. 6.2 A). En las imágenes iniciales la señal de la población total (rojo) teñida con Syto 62 mayoritariamente colocaliza con la señal de la sonda ARCH915 (verde), indicando que la mayor parte de las células *A. copahuensis* adheridas a la superficie mineral se encontraban activas en ese momento. Además, mediante la tinción con la lectina ConA se detectó la producción de EPS que median el contacto de *A. copahuensis* con la superficie mineral (Fig. 6.3). Estos resultados coinciden con previos estudios realizados con arqueas en los que se detectó la producción de EPS en células adheridas a superficies sólidas (Castro, et al. 2016; Zhang, et al. 2014). También se pudo visualizar que la colonización de los granos de mineral se localizó mayoritariamente sobre imperfecciones, como grietas o huecos. En el mineral se pudieron evidenciar algunas zonas sin señal de Syto 62, pero claramente conteniendo "huellas" microbianas debido a la señal de la

lectina ConA. Este mismo fenómeno ha sido encontrado en los biofilms de otras especies de arqueas acidófilas (Zhang, et al. 2015). Esto sugiere que el proceso de dispersión cumple un rol activo durante la colonización y desarrollo de biofilms de arqueas termoacidófilas.

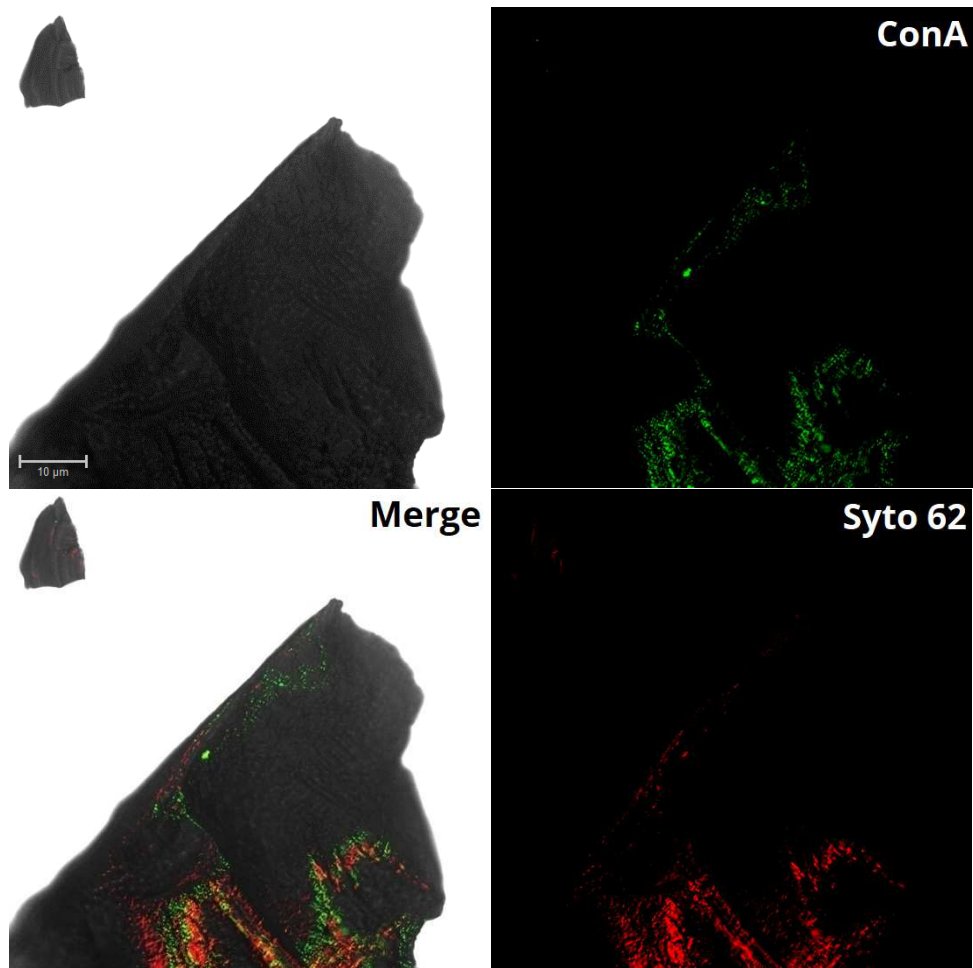
Luego de 20 días (Fig. 6.2 B) de incubación se observa una mayor colonización del mineral, se registran zonas que hibridan con Syto 62 pero no con la sonda ARCH915, indicando que son partes inactivas del biofilm. El motivo por el cual algunas zonas hibridan con Syto 62 y no con la sonda podría deberse también a que esta última no haya difundido correctamente hacia el interior de las células por una acumulación de EPS.

Con el transcurso del tiempo, los microorganismos continúan adheridos a la superficie mineral (Fig. 6.2 C); sin embargo, la señal de la sonda ARCH915 sólo se localiza en pocos sectores de la superficie mineral, indicando un aumento de la población inactiva, lo cual es esperable en los tiempos prolongados del ensayo.



**Figura 6.2.** Granos de mineral colonizados luego de 1 día (A), 20 días (B) y 42 días de cultivo (C), teñidos con ARCH915 (verde) y Syto 62 (rojo).





**Figura 6.3.** Granos de mineral colonizados luego de 1 día de cultivo teñidos con Syto 62 (rojo) y ConA (verde).

#### **6.4. Conclusiones**

Este ensayo mostró la capacidad de *A. copahuensis* de degradar y corroer el mineral. También se comprobó la formación de biofilms sobre la superficie del mismo mediada por la producción de EPS. El desarrollo de biofilms de *A. copahuensis* es un proceso dinámico en el que ocurre dispersión del biofilm y que con el transcurso del tiempo la población sésil se vuelve más inactiva. Finalmente, también fue posible observar la formación de otras fases sólidas no

identificadas (podrían ser otras fases sulfuradas, precipitados férricos o azufre elemental) que podrían bloquear la superficie del mineral provocando problemas difusionales y deteniendo los procesos de biolixiviación.

## **7. TERCERA PARTE: Biolixiviaciones**

### **7.1. Introducción y objetivos**

El diseño de esta experiencia se realizó con la intención de comprobar la eficiencia de *A. copahuensis* para la recuperación de cobre a partir de calcopirita y de evaluar el rol de la colonización y los biofilms durante el proceso. Para ello se incluyó un sistema en el cual se facilitó la colonización inicial sobre la superficie del mineral; para ello se puso el mineral en contacto con los microorganismos durante 24 hs y este mineral colonizado se utilizó en una experiencia de biolixiviación. Por otro lado, se preparó un sistema en el cual la superficie fue bloqueada con células inactivadas lo que podría alterar tanto la difusión de especies químicas como la interacción de las células viables con la superficie (ver diseño más abajo).

### **7.2. Ensayo: materiales y métodos**

#### **7.2.1. Preparación del inóculo**

Se cultivó la cepa de *A. copahuensis* ALE1 DSM 29038 condiciones óptimas de crecimiento por un período de aproximadamente siete días. El medio de cultivo utilizado fue exactamente idéntico al del ensayo de cinética de crecimiento.

Luego del desarrollo de la biomasa necesaria, se filtraron los cultivos a través de papel de filtro banda azul en el cual se retuvo el azufre excedente. Se recolectó el filtrado en mamaderas para luego proceder al centrifugado de 15 minutos a 8000 rpm. El pellet de células resultante se separó cuidadosamente

del sobrenadante y se resuspendió en un pequeño volumen de medio MAC pH 2. Finalmente, se realizó un recuento de número de células en cámara Thoma para conocer la concentración celular del inóculo.

### **7.2.2. Armado de los sistemas**

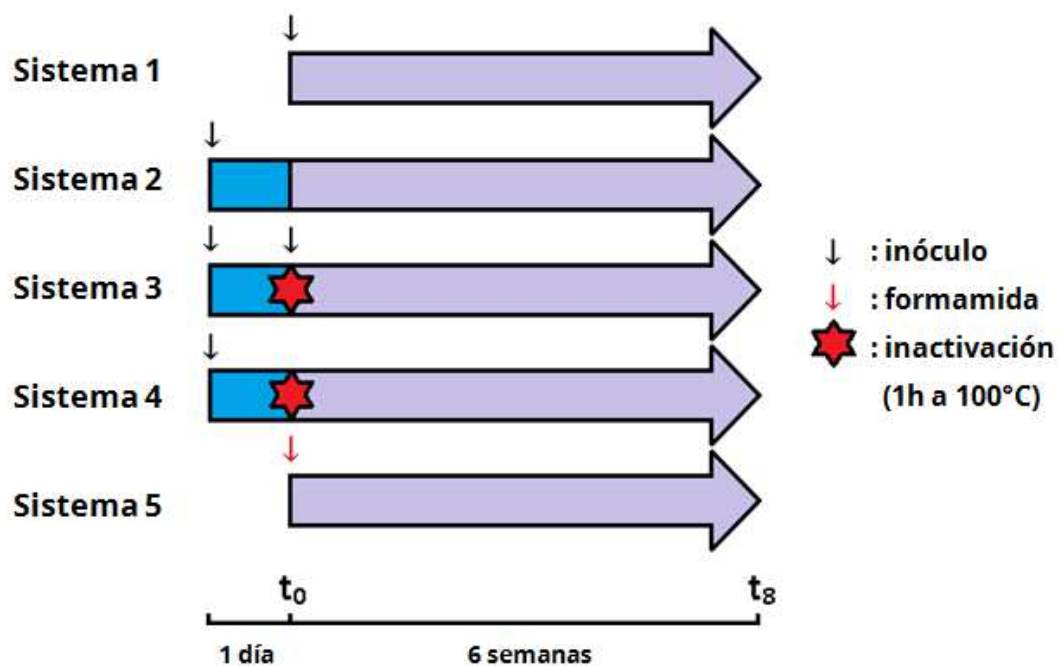
Los ensayos de biolixiviación se realizaron en matraces Erlenmeyer de cuello fino con medio MAC pH 2 suficiente como para alcanzar un volumen final de 150 ml. Se adicionó mineral a razón de 1 % p/v y se inoculó para alcanzar una concentración celular inicial de  $1 \times 10^8$  células/ml. Los sistemas de biolixiviación se cultivaron bajo condiciones de aerobiosis a 65 °C con agitación (150 rpm) por un período de aproximadamente seis semanas.

A continuación se describen los sistemas utilizados:

- **Sistema 1.** Se inoculó al comienzo al ensayo.
- **Sistema 2.** El mineral se puso en contacto con el inóculo un día antes del comienzo formal del ensayo. Antes de comenzar efectivamente el ensayo, el medio fue reemplazado por medio fresco, manteniendo sólo el mineral colonizado.
- **Sistema 3.** El mineral se puso en contacto con el inóculo un día antes del comienzo formal del ensayo. Antes de comenzar efectivamente el ensayo, se inactivaron los microorganismos (1 hora a 100°C en autoclave, sin sobrepresión), se renovó el medio y luego se volvió a inocular el sistema.
- **Sistema 4.** Ídem al sistema 3 pero sin nueva inoculación.

- **Sistema 5 (control estéril).** El inóculo fue reemplazado por un volumen idéntico de *p*-formaldehído (impide el desarrollo microbiano).

Vale aclarar que en el Sistema 3 (el cual fue inoculado en dos ocasiones) la cantidad de células adicionadas en total es exactamente el doble que en el resto de los sistemas, ya que la mitad de ese número total de microorganismos son inactivados por calor dejando la matriz de la colonización. Finalmente, la concentración celular activa fue exactamente igual en todos los sistemas, exceptuando el caso de los controles. En el Esquema 7.1 se puede observar un resumen del diseño experimental previamente descrito.



**Esquema 7.1**

### **7.2.3. Muestreo y parámetros a evaluar**

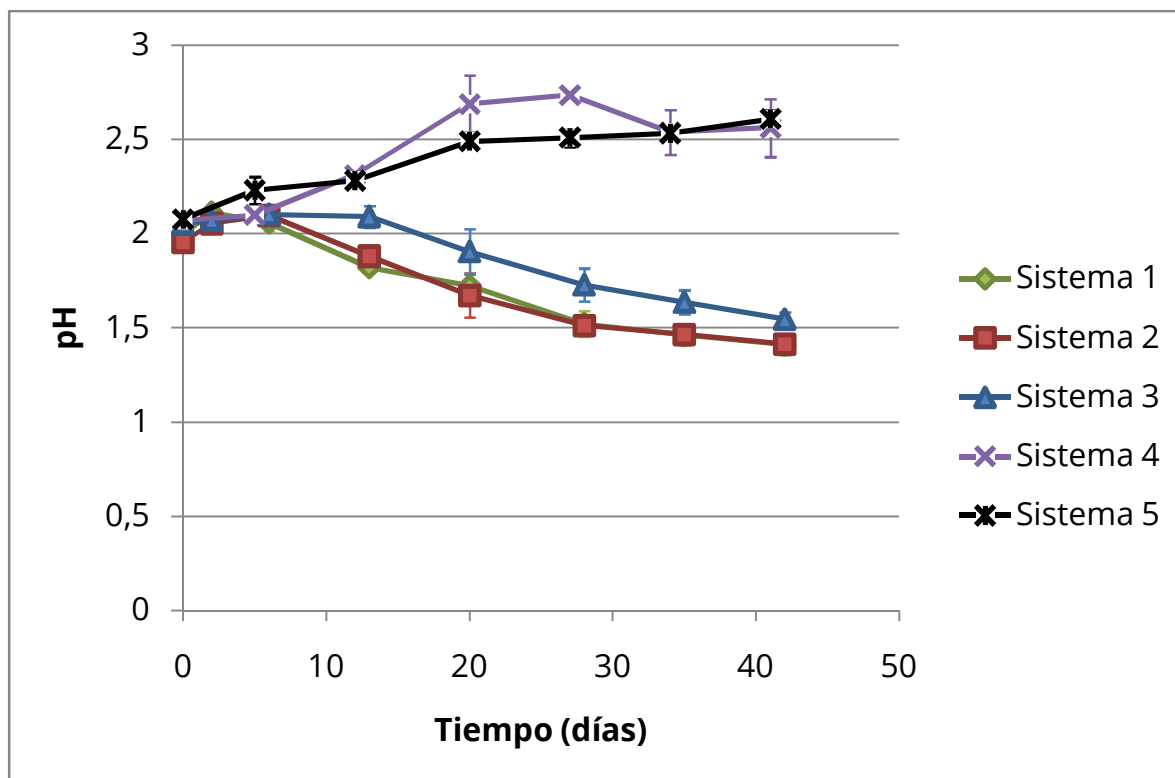
Se tomaron muestras a distintos tiempos para evaluar los parámetros posteriormente detallados. Se reposó el agua de los cultivos perdida por evaporación; se registraron las masas luego de cada toma de muestra y en el siguiente muestreo se adicionó agua suficiente como para alcanzar la masa registrada al final del muestreo previo. Luego, se filtraron aproximadamente 3 ml de cada cultivo a través de papel de filtro banda azul para eliminar el mineral. El filtrado se recolectó en tubos plásticos. Finalmente, se registró la masa del sistema luego de dicho procedimiento por lo explicado previamente. Las muestras se tomaron semanalmente excepto los primeros tres puntos tomados cada tres días aproximadamente.

A lo largo del ensayo, se realizó un seguimiento de los siguientes parámetros:

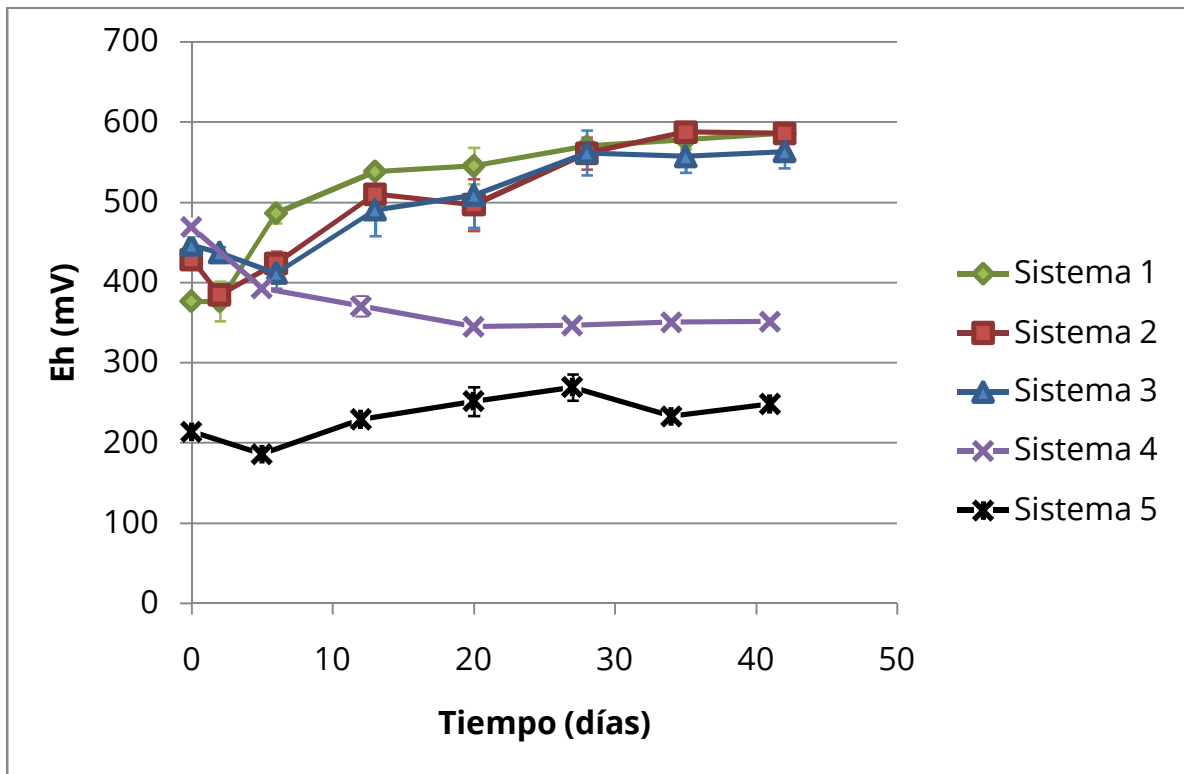
1. **pH y Eh.** Ambos fueron medidos con electrodos específicos conectados a un multímetro.
2. **Concentración de metales.** Se determinaron las concentraciones de Cu y Fe solubles totales. Se realizó a través de espectrofotometría de absorción atómica. Para ello, las muestras se diluyeron en HNO<sub>3</sub> 0,14 N hasta llegar a valores de concentración que estuvieran contenidos en la curva de calibración del equipo. Las muestras diluidas en HNO<sub>3</sub> se filtraron utilizando membranas de 0,45 micrones de poro para eliminar residuos sólidos del mineral que pudiesen permanecer en suspensión.
3. **Concentración de Fe<sup>+2</sup>.** Se determinó mediante el método colorimétrico de o-fenantrolina (detallado en el Anexo 1).

### 7.3. Resultados y discusión

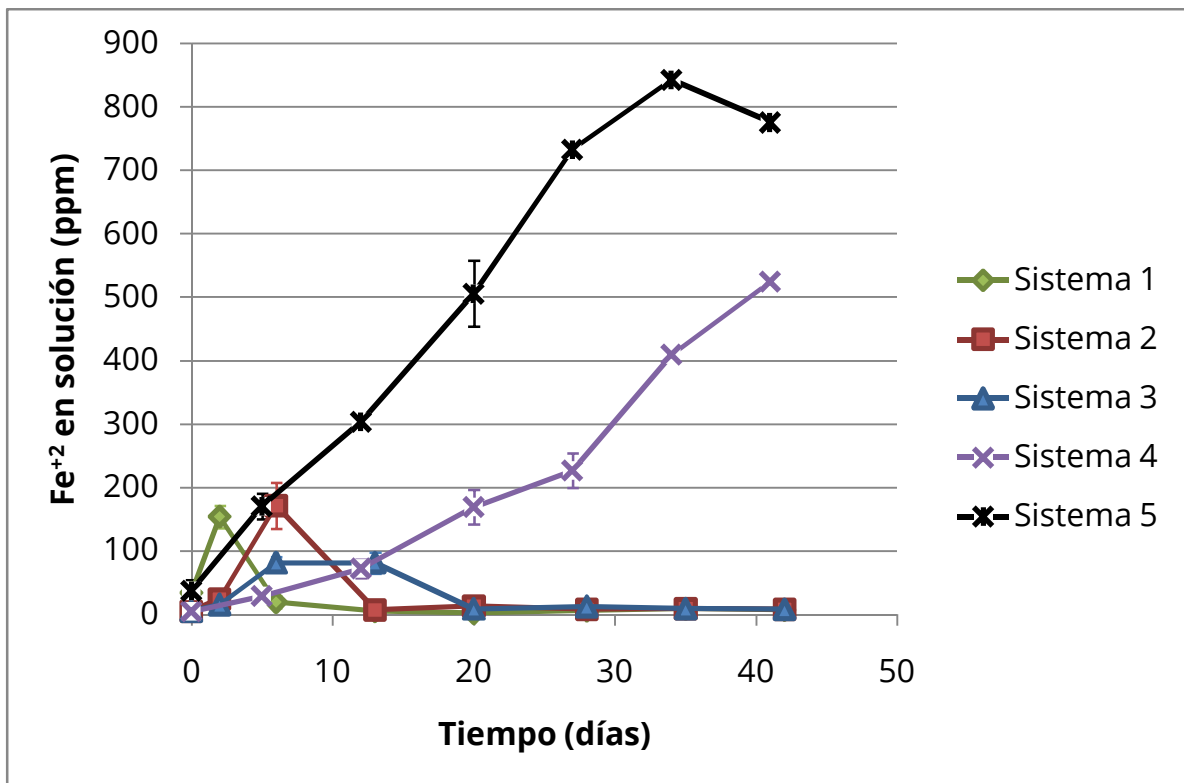
Las Figuras 7.1 y 7.2 muestran los comportamientos de pH y Eh en los distintos sistemas; en las Figuras 7.3 y 7.4 se han graficado las concentraciones de hierro(II) y el porcentaje de hierro total disuelto en función del tiempo y finalmente, la Figura 7.5 muestra el porcentaje de cobre recuperado a lo largo de la experiencia.



**Figura 7.1.** Evolución de pH durante la (bio)lixiviación de calcopirita.



**Figura 7.2.** Evolución de Eh durante la (bio)lixiviación de calcopirita.



**Figura 7.3.** Concentración de hierro(II) durante la (bio)lixiviación de calcopirita.



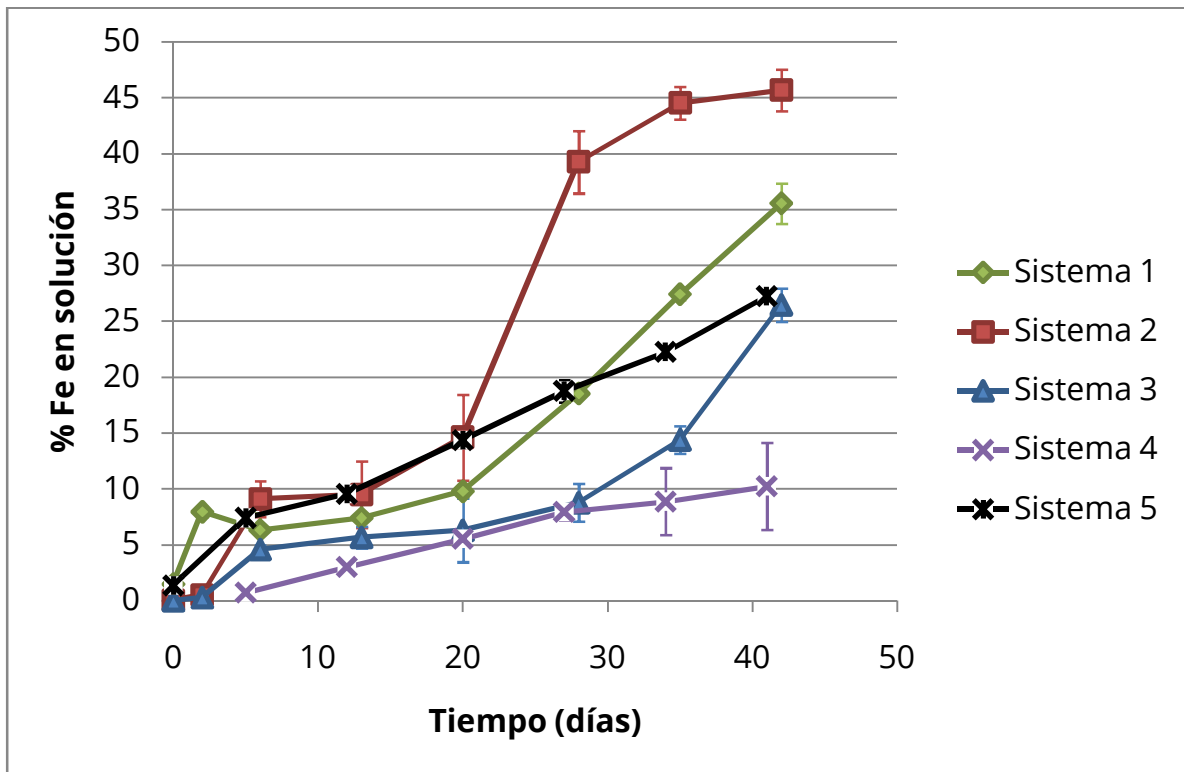


Figura 7.4. Porcentaje de hierro disuelto durante la (bio)lixiviación de calcopirita.

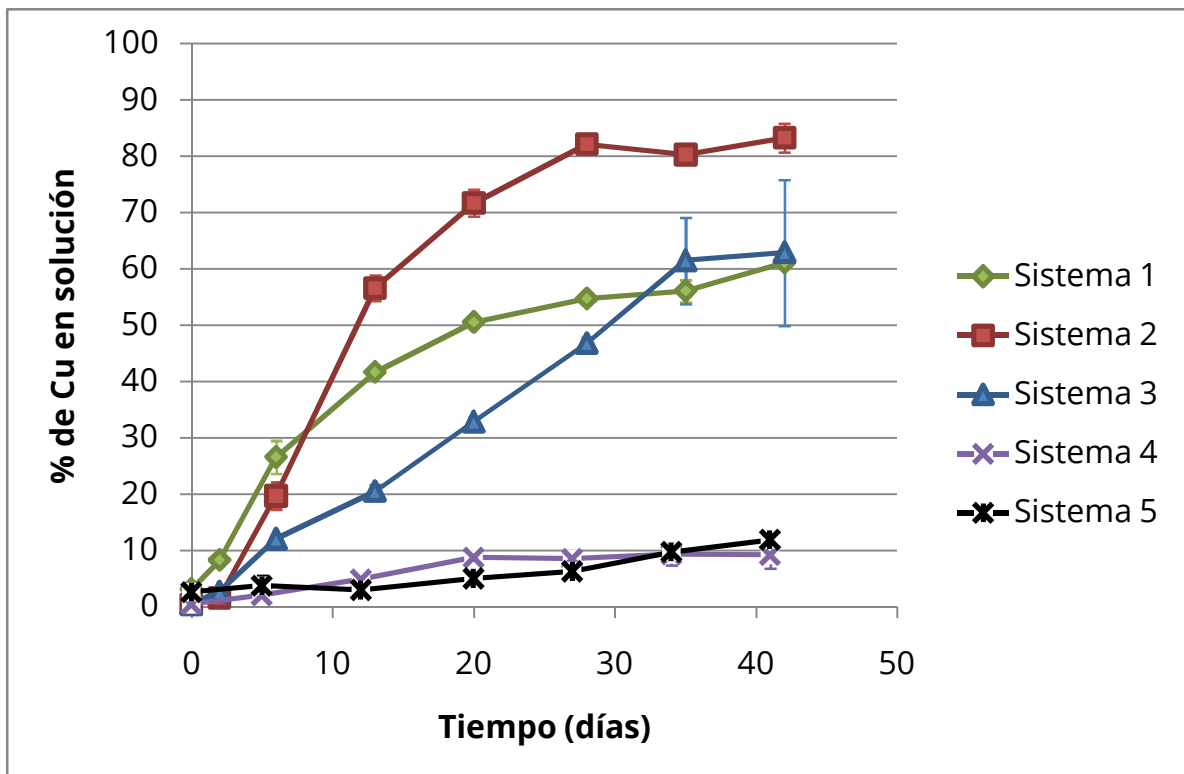
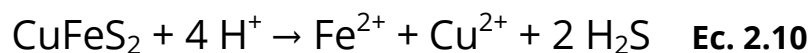


Figura 7.5. Porcentaje de cobre disuelto durante la (bio)lixiviación de calcopirita.

En los sistemas abióticos la disolución de calcopirita sólo es posible inicialmente a través del mecanismo ácido:

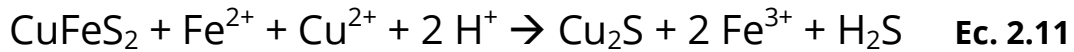


Esto explica el rápido ascenso del pH tanto en el sistema 4 como en el sistema 5. El ligero retraso del primero puede obedecer al cubrimiento parcial de la superficie por las células adheridas durante la colonización inicial antes de la inactivación de las mismas.

El valor del Eh responde básicamente al par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ; debido a que la disolución de calcopirita genera hierro(II) y la oxidación de éste es muy lenta en ausencia de células y al pH de los sistemas, el Eh se mantiene en valores muy bajos en los controles abióticos. En el caso del sistema 4 se observa un valor elevado de partida que puede responder a una oxidación catalizada por células durante el primer día en que las mismas se mantuvieron activas; luego, el incremento en la concentración de hierro(II) reduce el valor de Eh hasta valores cercanos al sistema estéril (5).

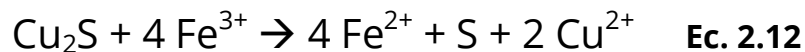
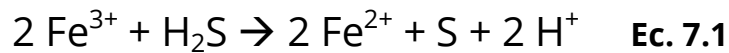
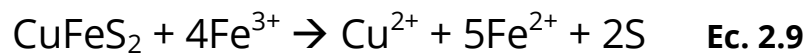
En las figuras que muestran la evolución de hierro(II) y de hierro total en solución, se ratifica el retraso del sistema 4 respecto del 5 que se suma al reemplazo del medio de cultivo por medio fresco luego del primer día. Del mismo modo, la evolución del cobre es similar en ambos sistemas aunque inicialmente hay una ventaja apenas significativa para el control estéril.

Inicialmente la relación molar entre el hierro y el cobre en solución se mantiene cercana a 1 como se espera según la estequiometría de la reacción de disolución ácida. Luego, hierro(II) y cobre se acumulan en solución, y en condiciones de bajos Eh como se dan en los sistemas control, habilitan un segundo mecanismo de disolución de calcopirita que se denomina reductivo:



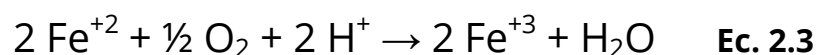
Esto provoca inmediatamente un descenso de la relación entre cobre y hierro disuelto (baja hasta valores cercanos a 0,2).

La presencia de hierro(III) produce un ataque oxidante sobre las especies reducidas de azufre tal cual se muestra en las ecuaciones más abajo. Este ataque sobre la calcopirita se denomina oxidativo.



Estos procesos, que ocurren en baja medida, van solubilizando más cobre y la relación molar comienza a crecer hasta valores de 0,30 al final de la experiencia.

En los sistemas bióticos la evolución del pH es claramente diferente a la de los sistemas control. Excepto en los primeros días, el pH comienza a descender de manera semejante en todos los sistemas bióticos. Esto sugiere que el mecanismo reductivo (el cual consume protones) no es relevante salvo en los estadios iniciales en los que el pH tiende a crecer por ese mecanismo y por la catálisis oxidativa de hierro(II):

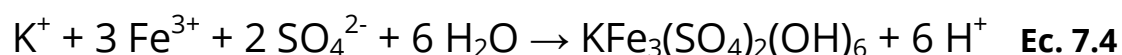
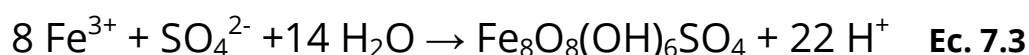
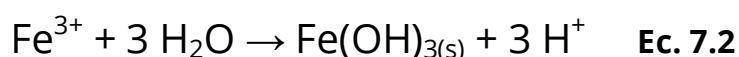


Al acumularse hierro(III) se habilita el mecanismo oxidativo y aparece azufre

elemental que también puede ser oxidado bióticamente:



Además, la hidrólisis de hierro(III), incrementada notablemente por la temperatura, también genera descenso del pH. La hidrólisis puede provocar distintas fases sólidas: goetita y schwertmannita, como muestran las Ecuaciones 7.2 y 7.3, respectivamente, pero la favorecida en las condiciones de pH y Eh de los cultivos es la jarosita cuya formación se representa en la Ecuación 7.4:



La evolución de Eh en los sistemas bióticos es consistente con este análisis y tiende a aumentar a lo largo de la experiencia hasta llegar a valores entre 550 y 600 mV. Los dos sistemas que tuvieron una colonización previa (sistemas 2 y 3) manifiestan un ascenso inicial que luego decae para volver a seguir posteriormente un comportamiento similar al sistema 1. Una explicación a este comportamiento es que durante el período de colonización se produjo una pequeña pero significativa oxidación de hierro(II) disuelto en el rápido ataque ácido inicial sobre la calcopirita; esa oxidación generó hierro(III) que quedó asociado a las células adheridas y fue parcialmente liberado al reemplazar el medio.

En la Figura 7.3 puede observarse que en los tres sistemas abióticos se

produce un incremento inicial de la concentración de hierro(II) –como se ha indicado, seguramente generado por ataque ácido- aunque desplazado en el tiempo; su desaparición posterior indica la oxidación a hierro(III) que es suficientemente rápida como para mantener la concentración de hierro(II) en valores casi nulos durante toda la experiencia.

Las relaciones molares en los sistemas bióticos son muy por encima de lo esperado estequiométricamente aunque con gran variabilidad entre triplicados y a lo largo del tiempo; estos valores oscilan entre 1,5-3,5 (sistema 1), 1,2-4,5 (sistema 2) y 1,5-7,3 (sistema 3). Estas relaciones elevadas indican que:

a) no está ocurriendo de modo significativo el mecanismo reductor (lo que es esperable debido a los valores de Eh) que forma una fase sólida que retiene cobre y que haría descender la relación cobre/hierro disueltos por debajo de la estequiométrica.

b) que debe haber una importante precipitación de hierro que es la única posibilidad para lograr que la relación supere la estequiométrica tal cual se observa en los sistemas bióticos.

Si bien en los tres sistemas el proceso es esencialmente el mismo, el reemplazo del medio desplazó en el tiempo el incremento de la concentración de hierro(III) y la consecuente hidrólisis y precipitación. Una posible consecuencia de ello es que se haya formado una capa significativa de fases sólidas de hierro(III) que impidió parcialmente o al menos dificultó la adhesión posterior de células directamente sobre la superficie y consecuentemente el mecanismo de contacto.

Esta hipótesis queda parcialmente comprobada ya que la disolución de cobre, si bien ligeramente superior inicialmente en el sistema 1, es claramente superior en el sistema 2 (con una extracción cercana al 85 % en menos de 30 días) donde probablemente la colonización se produjo antes de la precipitación

significativa de compuestos de hierro(III). El sistema 1 continúa con una cinética más lenta de disolución y alcanza una meseta con una extracción máxima apenas superior al 60 % del cobre total, lo cual sugiere un cubrimiento progresivo de la superficie y problemas de difusión a través de esa cobertura para continuar el ataque.

El sistema 3 es aún más lento al comienzo ya que la superficie está parcialmente cubierta por células inactivas (y quizás también por el depósito de fases oxidadas luego del tratamiento de inactivación por calor, fenómeno que también se observa en alguna medida en el sistema 4). Luego adquiere un comportamiento similar al sistema 1 ya que también en este caso la precipitación de compuestos sólidos de hierro(III) ocurre desde las primeras etapas de colonización por células viables. Precisamente, la extracción final de cobre en este sistema es similar a la obtenida en el sistema 1. No obstante, es en este sistema donde se espera una mayor dificultad para el acceso de células viables a la superficie y por ende, una mayor dificultad para que tenga lugar el mecanismo de contacto.

Para verificar la existencia de problemas difusionales en la interfaz del mineral, se aplicó el modelo del *shrinking core/product layer* (Fowler & Crundwell, 1999; Giaveno et al., 2007; Marchevsky et al., 2015). Este modelo describe a la partícula de mineral como un núcleo que va reaccionando pero cuyo diámetro no se ve afectado ya que, a medida que el reactivo se consume, se depositan productos sobre la superficie generando una capa no reactiva a través de la cual deben difundir compuestos para que el proceso continúe. La velocidad que gobierna el proceso global se compone de tres etapas: la difusión a través de la película estanca de líquido, la difusión a través de la capa de producto y la velocidad asociada a la reacción química.

En sistemas agitados se puede despreciar la difusión a través de la

película estanca de líquido que usualmente es mucho más rápida que las otras dos (Mishra et al., 2008). Es posible obtener expresiones distintas para la constante de velocidad de acuerdo a que la velocidad limitante del proceso esté asociada a la reacción química o a la velocidad de difusión a través de la capa de producto.

Cuando los valores experimentales ajustan a la Ecuación 7.5 se puede concluir que la velocidad del proceso analizado está controlada por la difusión a través de una capa de producto.

$$K_p t = 1 - \frac{2}{3}x - (1 - x)^{\frac{2}{3}} \quad \text{Ec. 7.5}$$

donde  $K_p$  es la constante de velocidad ( $\text{días}^{-1}$ ),  $t$  es el tiempo (días) y  $x$  es la fracción de reactivo que ha reaccionado.

En cambio, si la velocidad limitante del proceso es la de la reacción química, los valores experimentales ajustarán mejor con la Ecuación 7.6.

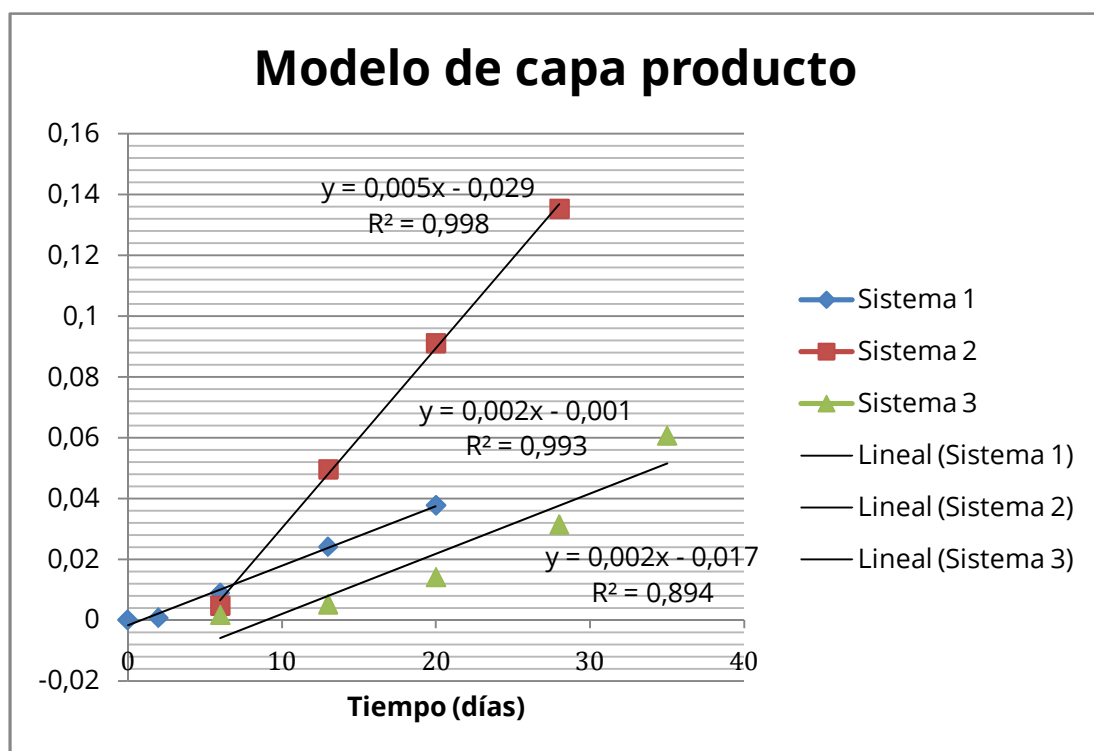
$$K_p t = 1 - (1 - x)^{\frac{1}{3}} \quad \text{Ec. 7.6}$$

Las Figuras 7.6 y 7.7 muestran los ajustes lineales para los tres sistemas biológicamente activos; para ello se graficó  $1 - \frac{2}{3}x - (1 - x)^{\frac{2}{3}}$  versus  $t$  para el modelo de capa producto (Figura 7.6) y  $1 - (1 - x)^{\frac{1}{3}}$  versus  $t$  para el modelo de reacción química (Figura 7.7).

Los resultados demostraron que los sistemas 1 y 2 ajustan mejor al primer caso, siendo sus  $R^2$  de 0,993 y 0,998 respectivamente, mientras que en el modelo de reacción tomaron valores de 0,970 y 0,967. Esto es consecuente con la existencia de una capa producto, probablemente de jarosita, aunque aún no se pudo confirmar por difracción de Rayos X. En los gráficos de ajuste puede observarse que la tendencia al comportamiento lineal en el sistema 1 comienza

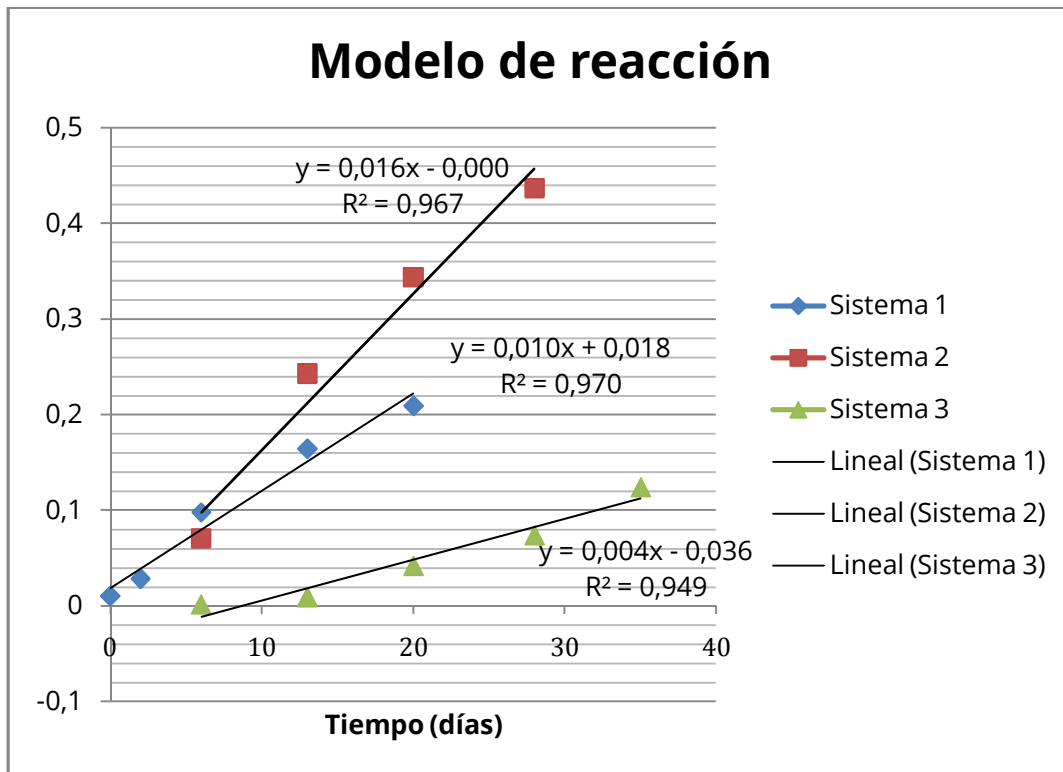
antes que en el sistema 2 lo que es consistente con nuestra hipótesis.

En el caso del sistema 3, el modelo que mejor ajustó fue el de reacción química ( $R^2$  de 0,949 frente a 0,894 para el caso de la capa producto). Aunque las diferencias encontradas en los ajustes no son suficientemente grandes (especialmente para el sistema 3) como para decidir que uno de los mecanismos es claramente predominante sobre el otro, este resultado es consistente con las mayores dificultades para que las células viables alcancen la superficie proporcionando el “entorno de reacción”; es decir, que en este caso la limitante es la reacción en sí misma más que el acceso de reactivos hasta el lugar (o la salida de productos desde) donde la misma ocurre.



**Figura 7.6.**  $1 - \frac{2}{3}x - (1 - x)^{\frac{2}{3}}$  en función del tiempo.





**Figura 7.7.**  $1 - (1 - x)^{1/3}$  en función del tiempo

#### 7.4. Conclusiones

Esta experiencia ha permitido comprobar que los microorganismos termófilos como *A. copahuensis* son efectivos para recuperar cobre a partir de una especie refractaria como la calcopirita. La máxima extracción alcanzada fue 83 % que es claramente superior a las máximas alcanzadas utilizando microorganismos mesófilos, las cuales usualmente son inferiores al 40-50 % (Akçil, et al. 2007). La abundante precipitación de fases férricas sólidas propiciada por los altos potenciales redox alcanzados en los sistemas bióticos, justifica no haber alcanzado una disolución total como previamente se había logrado con este microorganismo (Castro & Donati, 2016).

Por otro lado, la experiencia realizada permitió analizar los mecanismos

de solubilización de calcopirita que tuvieron lugar, mostrando que en los sistemas bióticos predomina un ataque oxidativo luego de una primera etapa de ataque ácido, mientras que en los abióticos predomina el mecanismo reductivo.

También pudo comprobarse el rol fundamental del mecanismo de contacto de acción microbiana y, por ende, de la colonización de la superficie durante la biolixiviación de la calcopirita. Se comprobó que el bloqueo parcial de la superficie por células inactivas (y, probablemente, por depósito de fases sólidas formadas durante la inactivación) no sólo disminuye la velocidad y la extracción final de cobre sino que también hace más importante la contribución de la reacción en la velocidad total del proceso, probablemente por la mayor dificultad para el acceso de células viables sobre la superficie que son necesarias para generar el entorno de reacción.

En los sistemas bióticos en los que la superficie no está inicialmente bloqueada, la formación de fases sólidas de hierro(III) reduce progresivamente la difusión de reactivos hacia las células viables que colonizan la superficie (o de productos formados luego de la reacción) provocando que sea precisamente este fenómeno el que regule la velocidad del proceso. Con el diseño particular de la experiencia realizada que permitía que en un sistema se produzca una colonización mayor de la superficie antes que comenzara la progresiva precipitación de compuestos de hierro(III), se comprobó que la extensión del mecanismo de contacto (mayor cuanto menor es la cobertura de la superficie mineral por especies inertes) es crítico para lograr extracciones mayores de cobre.

Estos resultados permiten concluir que la disolución de calcopirita por acción de microorganismos termófilos es posible aunque su eficiencia es mayor si se mantienen bajos valores de Eh (Ketamani & Aoki, 1985), lo cual provoca una menor precipitación de fases férricas y/o si se logra que ésta se produzca en

forma tardía de modo que no impida la colonización de la superficie y la consecuente acción microbiana por contacto.

## 8. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El análisis de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesina permitió alcanzar las siguientes conclusiones generales:

- 1) De los microorganismos termófilos ensayados, *A. copahuensis* mostró ser más eficiente para el crecimiento sobre azufre. Esta capacidad permitiría una mayor acción ácida de disolución de calcopirita y además permitiría una menor precipitación de compuestos oxidados de hierro; de estos dos procesos, el segundo resultará de importancia para aumentar la eficiencia en la recuperación de cobre.
- 2) Las células de *A. copahuensis* mostraron capacidad para colonizar la superficie del concentrado de calcopirita y para formar biofilms sobre ella, mostrando que la proporción de células viables expuestas disminuye progresivamente probablemente por el cubrimiento de las mismas con compuestos oxidados de hierro.
- 3) La biolixiviación del mineral por este microorganismo fue eficaz y se demostró que el proceso ocurre esencialmente por el mecanismo oxidativo de disolución de calcopirita y por un mecanismo de contacto en el que es necesario la colonización previa de la superficie por las células de *A. copahuensis*. En condiciones de altos valores de Eh se produce una abundante precipitación que retrasa y finalmente detiene la biolixiviación por problemas difusionales.

Las perspectivas futuras en este tema implicarían la búsqueda de alternativas que permitiesen la continuidad de un mecanismo oxidativo pero en condiciones de Eh relativamente bajos y/o de condiciones en las cuales se produzca la colonización de la superficie antes de que ocurra una oxidación

significativa del hierro y la consecuente precipitación. Algunas de estas alternativas serían:

- a) Un contacto inicial entre el mineral y concentración elevadas de células que permita una rápida cobertura de la superficie antes de que se produzca oxidación de hierro(II).
- b) El uso de una especie microbiana de baja cinética de oxidación de hierro(II).
- c) El agregado de azufre colonizado junto con el inóculo para hacer descender significativamente el pH y retrasar la precipitación.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1- Método de cuantificación de $\text{Fe}^{+2}$ por o-fenantrolina

Con este método se evalúa la concentración del catión  $\text{Fe}^{+2}$  en una muestra aprovechando que el mismo forma un complejo coloreado con la o-fenantrolina que puede cuantificarse por absorbancia. El protocolo fue adaptado para trabajar en placas de Elisa:

#### 1. Soluciones

- **Solución I (acetato de amonio):** se requieren 400 g de acetato de amonio y 500 ml de ácido acético glacial para preparar 1 L de solución, llevando a volumen con agua destilada suficiente.
- **Solución II (o-fenantrolina):** 5 g de cloruro de 1,10-fenantrolina monohidratado deben disolverse en 1 L de agua destilada con calor. Conservar en oscuridad.
- **Solución III (estándar de hierro):** para la curva de calibración se debe preparar una solución de 0,8 g/L de  $\text{Fe}^{+2}$ . Para ello se disuelven 3,98 g de sulfato de hierro (II) en 10 ml de ácido clorhídrico 1M. Luego se agregan 100 ml de agua destilada y se conserva a 4°C para evitar la oxidación del hierro.

#### 2. Mezcla de reacción

Se mezclan 40  $\mu\text{l}$  de la solución I y 40  $\mu\text{l}$  de la solución II por cada 870  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Se calcula la cantidad de mezcla necesaria en función de la

cantidad requerida para la curva de calibración (950  $\mu\text{l}$  por cada punto) y por cada *well* a utilizar (190  $\mu\text{l}$  cada uno). Se realizan las mediciones por duplicado, tanto de la curva de calibración como de las muestras.

### 3. Curva patrón

Se elabora la siguiente curva de calibración: en seis tubos Eppendorf, se diluyen 2, 4, 6, 8, 10 y 15  $\mu\text{l}$  de la solución III en 950  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción y suficiente agua destilada como para completar un volumen final de 1000  $\mu\text{l}$  en cada tubo.

### 4. Medidas en placa de ELISA

En los distintos *wells* de la placa de ELISA se colocan 200  $\mu\text{l}$  de las seis soluciones correspondientes a la curva patrón, por duplicado. En el caso de las muestras, se colocan 190  $\mu\text{l}$  de la mezcla de reacción y 10  $\mu\text{l}$  de muestra (mezclar con el *tip*) en cada *well*. En caso de ser posible, se realizan también por duplicado. Se incuban por aproximadamente quince minutos en oscuridad y luego se realizan las lecturas en el lector de placas a 492 nm.

## 9.2. Anexo 2 – Protocolo FISH para muestras sólidas

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) es una técnica que utiliza sondas fluorescentes específicas que permiten localizar secuencias determinadas en microorganismos previamente fijados. En este caso particular, la fijación se realiza directamente sobre el mineral, pudiendo entonces observar al microscopio la distribución de las células sobre la superficie del mismo. Los pasos se detallan a continuación:

### 1. Fijación

Se colectan las muestras sólidas en tubos Eppendorf y se las lava con un volumen de medio MAC pH 2 suficiente como para cubrir la totalidad del sólido. Se resuspende el mineral en el medio y, mediante un *spin* de centrifuga, se separa nuevamente para eliminar el líquido. Se repite el lavado dos o tres veces hasta que el sobrenadante sea incoloro y transparente. Se elimina el medio y se añade un volumen tal de PBS suficiente como para cubrir el sólido en su totalidad y, además, un 10% de dicho volumen de *p*-formaldehído. Se deja reposar a 4°C entre 2 y 16 horas, mezclando por inversión ocasionalmente.

Pasado el tiempo de incubación, se realiza un *spin* de centrifuga para separar las fases y eliminar todo el líquido de las muestras. Se realizan dos lavados con PBS de manera idéntica al realizado con el medio MAC pH 2 al comienzo del protocolo.

Por último, para conservar, se prepara una solución 50% v/v de PBS usando etanol absoluto como solvente. Se cubre la totalidad del sólido con un volumen suficiente de dicha solución y se conserva a -18°C hasta el momento de realizar la hibridación.



## 2. Hibridación

Se prepara el buffer de hibridación en función del porcentaje de formamida necesario para la sonda de trabajo. Para el caso particular de la sonda ARCH915, se requiere un buffer con la siguiente composición:

<b>Buffer de Hibridación (formamida al 30%)</b>	
Tris HCl (1 M pH 8)	360 $\mu$ l
NaCl (5 M)	40 $\mu$ l
Formamida	700 $\mu$ l
Agua	900 $\mu$ l
SDS 5%	4 $\mu$ l

**Tabla 9.1.** Componentes del buffer de hibridación.

Se toma una pequeña porción del sólido de las muestras previamente fijadas y se realiza un lavado con PBS idéntico a los realizados anteriormente. Separar las fases mediante un *spin* y eliminar el líquido. Se adiciona buffer de hibridación suficiente como para cubrir la muestra y la sonda ARCH915 (5 mM), manteniendo una proporción de 16  $\mu$ l cada 2  $\mu$ l, respectivamente. Se incuba 2 horas a 46°C en oscuridad.

## 3. Lavado

Se prepara el buffer de lavado en función del porcentaje de formamida requerido por la sonda. Para ARCH915, la composición se detalla a continuación:

<b>Buffer de Lavado (formamida al 30%)</b>	
Tris HCl (1 M pH 8)	1000 µl
NaCl (5 M)	1020 µl
EDTA (0,5 M pH 8)	500 µl
Agua	47,38 ml
SDS 5% (agregar al final)	100 µl

**Tabla 9.2.** Componentes del buffer de lavado.

Transcurrido el tiempo de incubación de las muestras, se elimina el buffer de hibridación y se realizan dos lavados con el buffer de lavado; se resuspende el mineral, se separan las fases mediante un *spin* de centrifuga y se elimina el líquido.

#### 4. Tinción con Syto 62

Además de teñir las células activas con la sonda para arqueas, se realizó una tinción con un colorante de ADN, Syto 62, para observar el resto del biofilm. Para ello, luego de realizar el lavado con el buffer de lavado, se elimina el mismo y se agrega Syto 62 (10 µM) suficiente como para cubrir el sólido. Se incuba 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido dicho tiempo, se elimina el colorante y se realizan dos lavados con H<sub>2</sub>O ultra pura.

Se mezcla el sólido de las distintas muestras con medio de montaje y se distribuye sobre un portaobjetos. Se cubre y envuelve en papel aluminio. Se conserva a 4°C hasta el momento de la microscopía.

### 9.3. Anexo 3 – Protocolo de tinción de muestras sólidas usando concanavalina A

La concanavalina A (ConA) es una lectina que posee la capacidad de fluorescer y de unirse específicamente a residuos  $\alpha$ -D-manosa y  $\alpha$ -D-glucosa. Dicha unión se produce con la matriz del biofilm permitiendo observar, mediante microscopía de fluorescencia, la presencia y distribución del mismo.

#### 1. Fijación

Se realiza siguiendo el protocolo para FISH detallado en el Anexo 2.

#### 2. Hibridación

Se elimina el líquido de las muestras previamente fijadas y se realiza un lavado: se cubre el sólido con un pequeño volumen de PBS, se resuspende y se vuelven a separar las fases mediante un *spin* de centrifuga. Se elimina el líquido nuevamente. Luego, se cubre el sólido con una solución de la lectina preparada según el protocolo del comerciante. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad.

#### 3. Lavado

Transcurrido el tiempo de incubación, se elimina la solución de lectina y se realizan dos lavados con H<sub>2</sub>O ultra pura, de manera idéntica al realizado previamente con PBS.

#### 4. Tinción con Syto 62

Se realiza siguiendo el protocolo para FISH detallado en el Anexo 2.

Se mezcla el sólido de las distintas muestras con medio de montaje y se distribuye sobre un portaobjetos. Se cubre y se envuelve en papel aluminio. Se conserva a 4°C hasta el momento de la microscopía.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Akcil, A., Ciftci, H., & Deveci, H. (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering*, 20(3), 310-318.
- Balci, N., Shanks III, W. C., Mayer, B., & Mandernack, K. W. (2007). Oxygen and sulfur isotope systematics of sulfate produced by bacterial and abiotic oxidation of pyrite. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(15), 3796-3811.
- Balci, N., Mayer, B., Shanks III, W. C., & Mandernack, K. W. (2012). Oxygen and sulfur isotope systematics of sulfate produced during abiotic and bacterial oxidation of sphalerite and elemental sulfur. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 77, 335-351.
- Castro, C., & Donati, E. (2016). Effects of different energy sources on cell adhesion and bioleaching of a chalcopyrite concentrate by extremophilic archaeon *Acidianus copahuensis*. *Hydrometallurgy*, 162, 49-56.
- Fowler, T. A., & Crundwell, F. K. (1999). Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: bacterial oxidation of the sulfur product layer increases the rate of zinc sulfide dissolution at high concentrations of ferrous ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5285-5292.
- Giaveno, A., Lavallo, L., Chiacchiarini, P., & Donati, E. (2007). Bioleaching of zinc from low-grade complex sulfide ores in an airlift by isolated *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 89(1-2), 117-126.
- Giaveno, M. A., Urbieto, M. S., Ulloa, J. R., Toril, E. G., & Donati, E. R. (2013).

Physiologic versatility and growth flexibility as the main characteristics of a novel thermoacidophilic *Acidianus* strain isolated from Copahue geothermal area in Argentina. *Microbial Ecology*, 65(2), 336-346.

- Johnson, D. B. (2014). Biomining—biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 24-31.
- Jordan, H., Sanhueza, A., Gautier, V., Escobar, B., & Vargas, T. (2006). Electrochemical study of the catalytic influence of *Sulfolobus metallicus* in the bioleaching of chalcopyrite at 70 C. *Hydrometallurgy*, 83(1-4), 55-62.
- Kametani, H., & Aoki, A. (1985). Effect of suspension potential on the oxidation rate of copper concentrate in a sulfuric acid solution. *Metallurgical Transactions B*, 16(4), 695-705.
- Khoshkhoo, M., Dopson, M., Engström, F., & Sandström, Å. (2017). New insights into the influence of redox potential on chalcopyrite leaching behaviour. *Minerals Engineering*, 100, 9-16.
- Li, Y., Kawashima, N., Li, J., Chandra, A. P., & Gerson, A. R. (2013). A review of the structure, and fundamental mechanisms and kinetics of the leaching of chalcopyrite. *Advances in colloid and interface science*, 197, 1-32.
- Marchevsky, N., Urbieto, M. S., Bernardelli, C., Mas, M., & Donati, E. R. (2015). Zinc recovery during refractory ore biooxidation by an indigenous consortium. *International Journal of Mineral Processing*, 138, 30-37.

- Mishra, M., Singh, S., Das, T., Kar, R. N., Rao, K. S., Sukla, L. B., & Mishra, B. K. (2008). Bio-dissolution of copper from Khetri lagoon material by adapted strain of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25(3), 531-534.
- Nicol, M. J., Lázaro I. (2003). The role of non-oxidative processes in the leaching of chalcopyrite. *Hydrometallurgy of Copper*, VI: 367–381.
- Orell, A., Fröls, S., & Albers, S. V. (2013). Archaeal biofilms: the great unexplored. *Annual Review of Microbiology*, 67.
- Panda, S., Akcil, A., Pradhan, N., & Deveci, H. (2015). Current scenario of chalcopyrite bioleaching: a review on the recent advances to its heap-leach technology. *Bioresource technology*, 196, 694-706.
- Rawlings, D. E. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 65-91.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G., & Schippers, A. (2001). (Bio)chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 159-175.
- Schippers, A., Jozsa, P., & Sand, W. (1996). Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3424-3431.
- Schippers, A., Rohwerder, T., & Sand, W. (1999). Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and

biodepyritization of coal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(1), 104-110.

- 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*, 65(1), 319-321.
- Thurston, R. S., Mandernack, K. W., & Shanks III, W. C. (2010). Laboratory chalcopyrite oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: oxygen and sulfur isotope fractionation. *Chemical Geology*, 269(3-4), 252-261.
- Vera, M., Schippers, A., & Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation—part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7529-7541.
- Vilcáez, J. (2015). On the mechanism of chalcopyrite bioleaching with thermophiles. *Austin Journal of Earth Science*, 2, 1-4.
- Wang, J., Gan, X., Zhao, H., Hu, M., Li, K., Qin, W., & Qiu, G. (2016). Dissolution and passivation mechanisms of chalcopyrite during bioleaching: DFT calculation, XPS and electrochemistry analysis. *Minerals Engineering*, 98, 264-278.
- Watling, H. R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—a review. *Hydrometallurgy*, 84(1-2), 81-108.
- Zhang, R., Bellenberg, S., Castro, L., Neu, T. R., Sand, W., & Vera, M. (2014). Colonization and biofilm formation of the extremely acidophilic archaeon

*Ferroplasma acidiphilum*. *Hydrometallurgy*, 150, 245-252.

- Zhang, R., Neu, T. R., Zhang, Y., Bellenberg, S., Kuhlicke, U., Li, Q., ... & Vera, M. (2015). Visualization and analysis of EPS glycoconjugates of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7343-7356.