



**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**  
**Facultad de Ingeniería**  
**Centro de Investigación y Estudios de Posgrado**

**Caracterización de los cambios físicos y químico mineralógicos  
de sulfuros en una operación de biolixiviación de minerales de  
cobre en terreros**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería de Minerales

Presenta:

Daniel Pacheco Carmona

Asesor:

Dr. Antonio Aragón Piña

Co-asesor:

M.C. Ana María González Amaro

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)  
(CVU/Becario): 630412 / 331605



San Luis Potosí, S. L. P.

Septiembre de 2017



**UASLP**

Universidad Autónoma  
de San Luis Potosí

24 de noviembre de 2016

**ING. DANIEL PACHECO CARMONA  
P R E S E N T E.**

En atención a su solicitud de Temario, presentada por el **Dr. Antonio Aragón Piña y la M.C. Ana María González Amaro**, Asesor Y Co-asesora de la Tesis que desarrollará Usted con el objeto de obtener el Grado de **Maestro en Ingeniería de Minerales**, me es grato comunicarle que en la Sesión del H. Consejo Técnico Consultivo celebrada el día 24 de noviembre del presente, fue aprobado el Temario propuesto:

**TEMARIO:**

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS FÍSICOS Y QUÍMICO  
MINERALÓGICOS DE SULFUROS EN UNA OPERACIÓN DE  
BIOLIXIVIACIÓN DE MINERALES DE COBRE EN TERREROS”**

Introducción.

1. Justificación en explicar los cambios físicos y químicos en minerales por acción de microorganismos.
2. Antecedentes sobre el proceso de oxidación biológica de sulfuros y aplicación en la industria minera.
3. Metodología para la caracterización mineralógica de terreros en donde ocurre biolixiviación e interacción de microorganismos.
4. Resultados.  
Conclusiones.  
Referencias.

**“MODOS ET CUNCTARUM RERUM MENSURAS AUDEBO”**

**A T E N T A M E N T E**

**M. I. JORGE ALBERTO PÉREZ GONZÁLEZ  
DIRECTOR.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DIRECCION



**FACULTAD DE  
INGENIERÍA**

Av. Manuel Nava 8  
Zona Universitaria • CP 78290  
San Luis Potosí, S.L.P.  
tel. (444) 826 2330 al39  
fax (444) 826 2336  
www.uaslp.mx

Copia. Archivo.  
\*etn.

## RESUMEN

La aplicación de sistemas biológicos para facilitar la extracción de metales a partir de cuerpos minerales de baja ley representa un método alternativo a las técnicas convencionales de procesamiento en la industria minera. Extensamente empleada a nivel industrial en otros países, el proceso de biolixiviación para la disolución y extracción de cobre a partir de sulfuros minerales comienza a ser desarrollado en el sitio minero metalúrgico de “La Caridad”, Sonora, México; donde se encuentra una operación de biolixiviación de residuos mineros para la extracción de cobre mediante la acción de un consorcio de microorganismos ferro y sulfo oxidantes nativos del propio sitio.

En este estudio, las características mineralógicas de material directamente extraído de terreros y la interacción de microorganismos acidófilos con la superficie de diferentes fases de sulfuros metálicos fueron evaluadas mediante el uso de técnicas de caracterización mineralógica como Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), Espectroscopia de Energía Dispersa (EDS) y Difracción de Rayos X (DRX); para generar información de los cambios químicos, morfológicos y mineralógicos que pudiera impactar en la eficiencia del proceso. Las principales fases minerales identificadas fueron cuarzo, ortoclasa, illita, moscovita, albita y pirita como la fase de sulfuros más abundante. La principal fase de cobre en los terreros fue calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), seguida de calcocita ( $\text{CuS}_2$ ) y covelita ( $\text{CuS}$ ), así como otros sulfuros secundarios cuyo proceso de transformación química y morfológica de estas fases minerales, así como la identificación de fases minerales secundarias de oxi hidróxidos de hierro y sulfuros de cobre permitieron indicar procesos de oxidación, precipitación y disolución de sulfuros y mineral de ganga que se encontraron ocurriendo. Señalando distintas condiciones y cambios en acidez, potencial redox y composición del medio a través de diferentes profundidades de los depósitos de terreros; observando así la evolución geoquímica del medio y la generación de microambientes sobre las partículas minerales examinadas.

El procedimiento de preparación de muestras biológicas que involucro la fijación, deshidratación y el punto crítico de secado (PCS) de los microorganismos

posicionados sobre la superficie mineral para preservar su estructura, en conjunto con la microscopia electrónica de barrido (MEB), permitió detectar y observar de forma *in situ* colonias de organismos bacilares y cocoides, así como formaciones de biopelícula sobre la superficie mineral a través de diferentes profundidades en los terreros de biolixiviación.

La adhesión de los microorganismos mostró ser específica pero no limitada a sulfuros metálicos; encontrando células bacterianas individuales, así como micro colonias y biopelícula sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ), calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), silicatos cercanos a estas y sobre capas de alteración de oxi-hidróxidos de Fe e Fe(III) oxi-hidroxisulfatos (jarosita) desarrollados sobre calcopirita, indicando su participación en los procesos de oxidación bajo ambientes ácidos  $\text{pH} < 3$ . Su distribución dentro de los terreros encontró una preferente e importante presencia a través de los primeros 20 metros de profundidad, ya que se localizaron colonias de hasta 95 microorganismos bacilares distribuidas sobre calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y la convivencia de colonias mixtas de bacilos con organismos cocoides adheridos sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 10-20 metros en el terrero 1320. Además, el desarrollo de biopelícula de hasta 100  $\mu\text{m}$  de longitud que recubrieron heterogéneamente la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 0 a 10 m de profundidad del terrero 1440. Esta preferente actividad se encontró asociada a zonas de los terreros con un potencial redox superior a los 500 mV vs SHE, en el que se encontrarían altas concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$ , así como sulfato y condiciones de  $\text{pH} < 3$  en base a la formación de minerales secundarios detectados, como jarosita, principal fase secundaria que se encuentra pasivando la superficie de calcopirita, evitando así su progresiva disolución.

Además, muestras minerales de los mismos terreros sometidas a un proceso de biolixiviación en columnas a nivel laboratorio fueron caracterizadas con la finalidad de observar potenciales distinciones con respecto a los terreros. Una mayor actividad microbiana en las columnas fue evidenciada por la amplia alteración morfológica de la superficie de pirita en secciones finales, encontrando zonas de clivaje directamente asociada a la adhesión de microorganismos bacilares y cocoides, además de la formación de productos minerales secundarios como óxidos de hierro y azufre elemental.



## ABSTRACT

The application of biological systems to facilitate and catalyze the extraction of metals from low-grade ores represents an alternative method to conventional extraction procedures applied by the mining industry. Widely applied at industrial scale, the biological dissolution of copper from sulfide mineral has begun to be developed in Mexico at the mining and metallurgical site of La Caridad, Sonora; where the leaching of waste rocks mine by a consortium of native ferro and sulfo oxidant microorganism is taken place for copper extraction.

In this study, the waste rock dumps' mineralogical characteristics and the interaction of microorganisms with different sulfides mineral surfaces was investigated. Given the importance of this process and the impact of a consortium the objective was to determine the processes and the involvement of the microorganisms on the chemical, mineralogical and morphological changes to provide information that could impact on the efficiency of the operation using mineralogical characterization techniques such as Scanning electron microscopy (SEM), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and powder X-ray diffraction (XRD).

The principal mineralogical phases of the waste rock dumps were quartz ( $\text{SiO}_2$ ), orthoclase, illite, muscovite, albite, and pyrite being the most abundant sulfur phase. The principal copper sulfide identified was chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), followed by chalcocite ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) and covellite ( $\text{CuS}$ ), as well as other secondary copper sulfides that showed extended morphological and mineralogical characteristics associated to the bio oxidation process that were subjected to. The mineralogical and morphological transformation of these and other mineral phases, thw identification of secondary mineral phases such as Fe(III) oxy-hydroxide, Fe(III) oxy-hydroxysulfates and elemental sulfur formed upon pyrite and chalcopyrite surfaces, as well on the silicate matrix through different depths of the waste rock dumps indicated several oxidation, dissolution and precipitation of sulfides and gangue minerals, which occurred at variables redox and acid conditions. Showing the geochemical evolution on the waste rock dumps and the microenvironment development thorough different depth profiles.

Weathered mineral samples collected from three waste rock piles were prepared for the fixation, dehydration and the critical point of drying of microorganisms potentially positioned on the mineral surface to preserve their natural structure, that along with scanning electron microscopy (SEM) enabled the *in-situ* visualization and detection of bacillus and coccus colonies, as well as biofilm structures through different depths of the dumps.

The attachment showed to be specific but not limited, to certain mineral phases and sites on the surface; finding individual bacterial cells, micro colonies and biofilm upon pyrite ( $\text{FeS}_2$ ), chalcopyrite ( $\text{CuFeS}_2$ ), silicates near those and on Fe(III) oxy-hydroxide, Fe(III) oxy-hydroxysulfates developed over chalcopyrite, pointing out their involvement in the oxidation processes at acidic environments  $\text{pH} < 3$ . Their distribution and appearance through the waste rock dumps 1320 and 1440 found an important occurrence at the first 20 meters depth from the top surface, where colonies up to 95 bacillar microorganisms on chalcopyrite were spotted as well as mixed colonies of bacillus and coccus attached on the pyrite surface at the 10-20m depth level. Furthermore, biofilm monolayer structures attached heterogeneously upon pyrite at the 0 – 10 m depth level from the waste dump 1440, which displayed different morphologies and extensions up to 100  $\mu\text{m}$  long. This preferential activity, in close association with the occurrence of secondary minerals, pitting and cleavage development on target minerals were in close association and indicated the development of redox potential that surpassed 500Mv vs SHE, showed high  $\text{Fe}^{3+}$  and sulfate concentrations as well as  $\text{pH} < 3$ . Parameters required to the changes and the detection of secondary minerals as jarosite, principal passivating product of chalcopyrite.

Mineral samples from bioleaching columns were also studied, on these laboratories carried experiments a greater microbial activity was spotted on column 4 due the morphological alteration on pyrite particles, which was directly associated to the microorganism attachment and secondary minerals formation such as iron oxides and elemental sulfur. Moreover, the presence of microorganisms and EPS and biofilm where undergoing a mineralization process, findings that show a difference from those on the waste rock dumps, where the attachment and their relationship with morphological changes showed to be isolated.

# Contenido

RESUMEN.....	I
ABSTRACT .....	III
Introducción.....	1
<b>1. Justificación en explicar los cambios físicos y químicos en minerales por acción de microorganismos.....</b>	<b>3</b>
1.1 Pregunta de investigación.....	5
1.2 Hipótesis.....	5
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general .....	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
<b>2. Antecedentes sobre el proceso de oxidación biológica de sulfuros y aplicación en la industria minera. ....</b>	<b>7</b>
2.1 Producción y procesamiento del Cobre. ....	7
2.2 Biominería.....	11
2.3 Mecanismos de lixiviación microbiana.....	15
2.3.1 Mecanismo de biolixiviación indirecta o de no-contacto .....	16
2.3.2 Mecanismo de biolixiviación de contacto .....	16
2.3.3 Mecanismo cooperativo de biolixiviación .....	17
2.4 Rutas metabólicas de oxidación de metales en bacterias.....	19
2.4.1 Mecanismos de oxidación biológica del hierro .....	19
2.4.2 Mecanismos de oxidación biológica del azufre .....	20
2.5 Mecanismo vía Tiosulfato y vía Polisulfuro. ....	21
2.6 Biolixiviación.....	26
2.7 Factores que afectan el proceso de biolixiviación.....	29
2.8 Adhesión de microorganismos a la superficie mineral .....	31
2.8.1 Sustancias Extracelulares Poliméricas (EPS) .....	32
2.8.2 Desarrollo de Biopelícula .....	34
2.9 Descripción del sitio y caso de estudio .....	35
2.9.1 Microorganismos nativos de “La Caridad” .....	38

<b>3. Metodología para la caracterización mineralógica de terreros en donde ocurre biolixiviación e interacción de microorganismos.....</b>	<b>41</b>
3.1 Lugar de realización .....	41
3.2 Muestreo y obtención de muestras minerales .....	41
3.3 Preparación física de muestras minerales y biológicas.....	46
3.3.1 Fijación de microorganismos sobre muestras minerales .....	46
3.3.2 Deshidratación .....	47
3.3.3 Punto crítico de secado.....	48
3.3.4 Recubrimiento y montaje de muestras .....	50
3.4 Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	51
3.5 Microanálisis efectuado mediante Espectrometría de energía dispersa (EDS) .....	53
3.6 Caracterización mineralógica por Difracción de Rayos X .....	54
<b>4. Resultados .....</b>	<b>55</b>
4.1. Caracterización mineralógica de terreros y columnas de biolixiviación .....	55
4.1.1 Terreros de Biolixiviación .....	56
4.1.2. Columnas de biolixiviación.....	130
4.1.3. Identificación de las fases minerales mayoritarias de terreros y columnas de biolixiviación por difracción de rayos X .....	139
4.2. Presencia de microorganismos en la superficie mineral de sulfuros .....	144
4.2.1 Adhesión y contacto de microorganismos sobre partículas de pirita (FeS <sub>2</sub> ).....	146
4.2.1.1 Terrero 1320 (T – 1320).....	147
4.2.1.2 Terrero 1440 (T-1440).....	155
4.2.1.3 Columnas de biolixiviación .....	168
4.2.2 Adhesión y contacto de microorganismos sobre sulfuros de cobre.....	173
4.2.3 Adhesión y contacto de microorganismos sobre silicatos .....	197
4.3 Discusión de resultados .....	204
4.3.1 Terrero 1320 .....	204
4.3.2 Terrero 1440 .....	217
4.3.3 Terrero 1545 .....	220
4.3.4 Columnas de biolixiviación .....	221
<b>Conclusiones .....</b>	<b>232</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>237</b>
<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>239</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Procesos de transformación de metales y minerales en los que microorganismos se ven involucrados (Konhauser, 2007).....	3
<b>Figura 2.</b> Número de microorganismos acidófilos (Bacteria y Archea) aislados en ambientes relevantes para los procesos de biolixiviación desde el descubrimiento de <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> hasta febrero 2016.....	8
<b>Figura 3.</b> Aspecto del Río Tinto, Andalucía, España.....	13
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de los factores que intervienen en el proceso de generación de Drenaje Ácido de Roca (DAR).....	15
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de contacto por el cual se lleva a cabo la biolixiviación de sulfuros minerales.....	17
<b>Figura 6.</b> Mecanismo cooperativo de biolixiviación de sulfuros metálicos.....	18
<b>Figura 7.</b> Modelo de la oxidación de Fe (II) por <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	20
<b>Figura 8.</b> Modelo de la oxidación de partículas de azufre elemental. ....	21
<b>Figura 9.</b> Esquema comparativo de los mecanismos de biolixiviación vía Tiosulfato y Polisulfuro.....	23
<b>Figura 10.</b> Diagrama de Pourbaix para el sistema $\text{CuFeS}_2 - \text{H}_2\text{O}$ a 25° C. ....	24
<b>Figura 11.</b> Diagrama de una operación de biolixiviación en montones.. ....	28
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática de los diferentes factores y sub procesos que ocurren y determinan la eficiencia en una operación de biolixiviación de montones o terreros a diferentes escalas.....	29
<b>Figura 13.</b> Diagrama de la interacción de la capa de EPS producida por los microorganismos con metales presentes en el medio (Li y Yu. 2014).....	33
<b>Figura 14.</b> Interacción de bacterias con la superficie mineral y el consecuente desarrollo de biopelícula. ....	34
<b>Figura 15.</b> Ubicación de la mina “La Caridad”, Nacozari, Sonora. ....	36
<b>Figura 16.</b> Modelo de Lowell y Guilbert (1970) para un depósito tipo pórfido de cobre, se señalan las zonas de alteración y mineralización del yacimiento. ....	37
<b>Figura 17.</b> Muestreo de material que compone terreros de biolixiviación en la mina “La Caridad”, Sonora. ....	42
<b>Figura 18.</b> Terreros de biolixiviación de La Caridad .....	45
<b>Figura 19.</b> A) Diagrama de fase de $\text{CO}_2$ B)Equipo Leica EM CPD030 para realizar punto crítico de secado.....	49

<b>Figura 20.</b> A) Montaje directo de muestras minerales sobre pines de aluminio y B) Recubridora de oro JEOL JFC-1100.....	50
<b>Figura 21.</b> Microscopio electrónico de barrido Jeol modelo JSM-6610LV y Phillips modelo XL30.....	51
<b>Figura 22.</b> Difractómetro de Rayos-X marca Bruker modelo D8 ADVANCE.....	54
<b>Figura 23.</b> Oxidación localizada de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y formación de capa de oxidación sobre calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 0 -10m del terrero 1320. ....	58
<b>Figura 24.</b> Partículas de calcopirita incrustadas en la matriz de silicatos del nivel 0-10m del terrero 1320. ....	60
<b>Figura 25.</b> Aspecto de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 0-20m del terrero 1320.....	61
<b>Figura 26.</b> Precipitados esferoidales de sulfuro de cobre de variable composición sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y silicatos.....	63
<b>Figura 27.</b> Precipitados esferoidales de sulfuro de cobre de variable composición sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y silicatos.....	64
<b>Figura 28.</b> Alteración química mineralógica de la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y formación de partículas de azufre en el terrero 1320 en el nivel 10-20 de profundidad.. ....	65
<b>Figura 29.</b> Alteración superficial de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20 m del terrero 1320. ....	67
<b>Figura 30.</b> Precipitados de óxidos de hierro y aluminio y partículas de fosfato de calcio sobre partículas de silicatos en el nivel 10-20m del terrero 1320.....	68
<b>Figura 31.</b> Pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y calcocita a 20 metros de profundidad en el terrero T 1320. ....	69
<b>Figura 32.</b> Formaciones de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 30-40m del terrero 1320. ....	70
<b>Figura 33.</b> Formación de precipitados de idaita ( $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ) en la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ )..	72
<b>Figura 34.</b> Nuevas formaciones de idaita [ $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ] en el nivel 30-40 m que se extienden por cerca de 400 $\mu\text{m}$ en la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ).....	73
<b>Figura 35.</b> Partículas de sulfuros de cobre (bornita-idaita-covelita) sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 30-40m del terrero 1320.....	74
<b>Figura 36.</b> Partícula de calcopirita en el nivel 30-40m del terrero 1320 .....	75
<b>Figura 37.</b> Partícula de esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y precipitados de Fe-Cr encontrados de forma aislada en la matriz de silicatos. ....	76
<b>Figura 38.</b> Desarrollo de capas de oxidación sobre grandes extensiones de la superficie de pirita en diferentes puntos del nivel 40-50m del terrero 1320.....	77
<b>Figura 39.</b> Diagrama de la formación del recubrimiento de oxihidróxidos de Fe(III) sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ).....	78

<b>Figura 40.</b> A) Morfología de la capa de oxihidróxidos de Fe sobre pirita en el nivel 30-40m del terrero 1320. B y C) Desprendimiento y fractura de la capa de oxihidróxidos de Fe en diferentes puntos de pirita, se aprecian diferencias en el espesor de esta en las dos fotomicrografías. D) Superficie de la capa de alteración, se observan partículas coloidales de oxihidróxidos de Fe. ....	80
<b>Figura 41.</b> Desarrollo de capas de oxihidróxidos de Fe sobre pirita y precipitados de cobre. ....	81
<b>Figura 42.</b> Desprendimiento de la capa de oxihidróxidos de hierro (III) desarrollada sobre la pirita en el nivel 40-50m del terrero 1320. ....	83
<b>Figura 43.</b> Aspecto de la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) donde se ubican canales de oxidación y la formación de oxihidróxidos de hierro que recubren las paredes de los canales y otras extensiones de la superficie de pirita. ....	84
<b>Figura 44.</b> Diferencias en composición en tres capas de alteración de posible jarosita, desarrolladas sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ). ....	85
<b>Figura 45.</b> Formaciones de precipitados de sulfuros de cobre en el nivel 40-50m del terrero 1320. ....	86
<b>Figura 46.</b> Formación de capa de oxihidróxidos de hierro o hidroxisulfatos y precipitados de covelita ( $\text{CuS}$ ) en la superficie de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ). ....	88
<b>Figura 47.</b> Formación de distintas partículas de azufre sobre la superficie de silicatos y pirita en el nivel 30-40m de profundidad del terrero 1320. ....	89
<b>Figura 48.</b> Partículas de covelita ( $\text{CuS}$ ) en el nivel 50-60m del terrero 1320 ....	91
<b>Figura 49.</b> Características morfológicas y texturales de partículas de covelita en el nivel 50-60m del terrero 1320. ....	92
<b>Figura 50.</b> Precipitados de azufre elemental en la superficie de pirita y en la matriz de silicatos en el nivel 60-70m del terrero 1320 ....	93
<b>Figura 51.</b> Precipitados de azufre elemental en la superficie de pirita y en la matriz de silicatos en el nivel 60-70m del terrero 1320 (continuación) ....	94
<b>Figura 52.</b> Precipitados de azufre elemental en los límites de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) ....	96
<b>Figura 53.</b> Precipitados laminares de azufre sobre cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ). ....	97
<b>Figura 54.</b> Desarrollo de clivaje en pirita en el nivel 60-70m de profundidad en el terrero 1320. ....	98
<b>Figura 55.</b> Precipitados esféricos de schwertmannita [ $\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{6-4.5}(\text{SO}_4)_{1-1.75}$ ] en el nivel 70-80m del terrero 1320. ....	102

<b>Figura 56.</b> Precipitados de óxido de hierro sobre la matriz de silicatos en el nivel 70-80m del terrero 1320 .....	103
<b>Figura 57.</b> Formación de precipitados laminares de óxido de hierro sobre la superficie de silicatos en el nivel 70-80m del terrero 1320 .....	104
<b>Figura 58.</b> Calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) alterada incrustada en la matriz de silicatos en el nivel 70-80m del terrero 1320 .....	105
<b>Figura 59.</b> Precipitados de Jarosita y partícula de Scheelita ( $\text{CaWO}_4$ ) en el nivel 70-80m del terrero 1320 .....	106
<b>Figura 60.</b> Agrupaciones de cristales de yeso [ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] (selenita) en el nivel 70-80m del terrero 1320. ....	107
<b>Figura 61.</b> Superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 0-10m del terrero 1440.....	108
<b>Figura 62.</b> Precipitados de sulfuros de Cu y sulfuros de Cu- Zn en el nivel 10-20m del terrero 1440 .....	110
<b>Figura 63.</b> Distintas formaciones y desarrollo de clivaje en partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 10-20 del terrero 1440. ....	111
<b>Figura 64.</b> Superficie de pirita en el nivel 10-20 del terrero 1440 en la que se acumulan cristales de óxido de Pb.....	112
<b>Figura 65.</b> Desarrollo de clivaje y cambios químico mineralógicos en la superficie de pirita asociados con la formación de fases secundarias de sulfuro de cobre en su superficie en el nivel 20-30m del terrero 1440. ....	113
<b>Figura 66.</b> Acumulación y recubrimiento de la superficie de pirita por esferas de sulfuro de Cu en el nivel 20-30m del Terrero 1440.....	115
<b>Figura 67.</b> Partículas de pirita recubiertas por precipitados esféricos de cobre en el nivel 30-40m del terrero 1320.....	116
<b>Figura 68.</b> Precipitados de óxido de plomo sobre la superficie de pirita del nivel 40 – 50 m del terrero 1440 .....	118
<b>Figura 69.</b> Precipitados de óxido de Pb-Cu sobre la superficie de pirita y la formación de inclusiones en su superficie. ....	119
<b>Figura 70.</b> Inclusiones de enargita [ $\text{Cu}_3\text{AsS}_4$ ] en pirita. ....	120
<b>Figura 71.</b> Aspecto de partícula de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y precipitados de óxido de Pb sobre su superficie en el nivel 0-10m del terrero 1545. ....	121
<b>Figura 72.</b> Partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) sin alterar en el nivel 10-20m del terrero 1545. ....	121
<b>Figura 73.</b> Partículas y precipitados de Pb en el nivel 10-20 del terrero 1520.. ....	123



<b>Figura 74.</b> Precipitados de sulfuro de Cu en formación dendrítica sobre la superficie silicatos. .....	124
<b>Figura 75.</b> Asociación de partículas de pirita y calcopirita en el nivel 20-30m del terrero 1545. .....	125
<b>Figura 76.</b> Comparativa de los diferentes rasgos morfológicos y texturales de la superficie de pirita en el nivel en el nivel 30-40 m del terrero 1545. ....	126
<b>Figura 77.</b> A) Precipitado de óxido de Pb en forma dendrítica. B) Incrustación de esfalerita con hierro en solución sólida en oquedad de pirita en el nivel 30-40 m del terrero 1545. .....	127
<b>Figura 78.</b> Aspecto de la superficie de pirita (FeS <sub>2</sub> ) en el nivel 40-50m del terrero 1545. ....	128
<b>Figura 79.</b> Partículas de óxido de Pb-Cu sobre la superficie de pirita y la formación de incrustaciones en su superficie. ....	129
<b>Figura 80.</b> Formación de pits hexagonales en la superficie de pirita (FeS <sub>2</sub> ) debido al proceso de oxidación microbiana en la sección final de la columna de biolixiviación 4. ....	131
<b>Figura 81.</b> Formación de <i>pits</i> hexagonales en la superficie de pirita perteneciente a la columna 4 sección final. ....	133
<b>Figura 82.</b> Desarrollo de clivaje en pirita correspondiente a la sección superior de la columna de biolixiviación 4. ....	134
<b>Figura 83.</b> Partícula de pirita alterada en la sección final de la columna de biolixiviación 1. .....	136
<b>Figura 84.</b> Alteración morfológica de la superficie de calcopirita (CuFeS <sub>2</sub> ) en la sección final de la columna de biolixiviación 1. ....	137
<b>Figura 85.</b> Formación de sulfuros de cobre sobre la superficie de pirita (FeS <sub>2</sub> ) alterada en la sección final de la columna de biolixiviación 1. ....	138
<b>Figura 87.</b> Difractograma correspondiente a la muestra 10-20 m del terrero 1320. ....	141
<b>Figura 88.</b> Difractograma correspondiente a la sección final de la columna 4. ....	141
<b>Figura 89.</b> Difractograma correspondiente al nivel 70-80 m del terrero 1320. ....	142
<b>Figura 90.</b> Difractograma correspondiente al nivel 70-80 m del terrero 1320. ....	142
<b>Figura 91.</b> Difractograma correspondiente al nivel 30-40 m del terrero 1545. ....	143
<b>Figura 93.</b> Colonia de microorganismos dentro de una oquedad de la superficie de pirita a 10 metros de profundidad del Terrero 1320. ....	148
<b>Figura 94.</b> Partícula de Pirita (FeS <sub>2</sub> ) a 30 metros de profundidad en el Terrero T -1320 ....	152
<b>Figura 95.</b> Polímeros extracelulares posicionados sobre la superficie de pirita en el terrero T-1320 a 30 m de profundidad. ....	153

<b>Figura 96.</b> Microorganismos posicionados sobre una capa de oxidación desarrollada sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el terrero 1320 en el nivel 40-50m de profundidad. ....	154
<b>Figura 97.</b> Desarrollo de biopelícula sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 0 – 10 metros del Terrero 1440. ....	155
<b>Figura 98.</b> Biopelícula desarrollada sobre Pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 0-10 m en el terrero T – 1440 .....	156
<b>Figura 99.</b> Microorganismos embebidos en una matriz de exopolisacáridos dentro de biopelícula desplegada sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ). ....	158
<b>Figura 100.</b> Biopelícula desarrollada sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el terrero 1440 en el nivel 0 – 10 m de profundidad. ....	159
<b>Figura 101.</b> Desarrollo de Biopelícula sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el terrero 1440 en el nivel 0 -10 m de profundidad. ....	162
<b>Figura 102.</b> Espectro EDS de la superficie de biopelículas ubicados sobre la superficie de pirita en el nivel 0-10 m de profundidad del terrero 1440. ....	163
<b>Figura 103.</b> Biopelícula y polímeros de diferente configuración posicionados sobre partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) a distintas profundidades en el Terrero 1440. ....	164
<b>Figura 104.</b> Biopelícula desarrollada en diferentes puntos de la superficie de partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el Terrero 1545 a 50 m de profundidad. ....	166
<b>Figura 105.</b> Espectro EDS de la superficie de pirita que se observa en las fotomicrografías de la Figura 106. ....	169
<b>Figura 106.</b> Biopelícula y polímeros excretados sobre la superficie de pirita en el nivel final de la Columna 1. ....	170
<b>Figura 107.</b> Diferentes formaciones de biopelícula sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel final de la columna 1. ....	172
<b>Figura 108.</b> Ubicación de microorganismos sobre partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20m del terrero 1320. ....	175
<b>Figura 109.</b> Ubicación de microorganismos sobre partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20m del terrero 1320 (Continuación). ....	176
<b>Figura 110.</b> Aspecto y composición de partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) con diferente grado de alteración en el nivel 10 – 20 m del terrero 1320. ....	179
<b>Figura 111.</b> Capas de oxidación colonizadas por microorganismos en cuatro partículas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20 m del terrero 1320 .....	180
<b>Figura 112.</b> Distribución y adhesión de diferentes bacilos sobre una capa de oxidación desarrolla sobre calcopirita .....	183

<b>Figura 113.</b> Características de los microorganismos adheridos en diferentes fragmentos de la capa de oxidación desarrollada sobre calcopirita (CuFeS <sub>2</sub> ).....	185
<b>Figura 114.</b> Distinta clase de microorganismos en contacto con las capas de oxidación en la calcopirita (CuFeS <sub>2</sub> ).....	187
<b>Figura 115.</b> Contacto reversible e irreversible de células microbianas al encontrarse en contacto con la superficie mineral de sulfuros.....	188
<b>Figura 116.</b> Ubicación de microorganismos sobre distintos puntos de alteración en la superficie de calcopirita (CuFeS <sub>2</sub> ).....	191
<b>Figura 116.</b> Ubicación de microorganismos sobre distintos puntos de alteración en la superficie de calcopirita (CuFeS <sub>2</sub> ) (Continuación) .....	192
<b>Figura 117.</b> Partículas de CuS esféricas depositadas sobre calcopirita y cuarzo potencialmente generadas por un proceso de biomineralización en el nivel 10-20 m del terrero 1320.....	193
<b>Figura 118.</b> Presencia de microorganismos con morfología cocoide sobre una partícula de estromeyerita (Cu,Ag) <sub>2</sub> S) en el nivel 20 – 30 m del terrero 1320.....	194
<b>Figura 119.</b> Presencia de microorganismos acidófilos sobre líneas de clivaje de una partícula de Calcopirita (CuFeS <sub>2</sub> ) a 50 m de profundidad en el Terrero T-1320.....	196
<b>Figura 120.</b> Microorganismos sobre la superficie de silicatos en el nivel 10-20m del terrero 1320. ....	199
<b>Figura 121.</b> Colonización de silicatos por microorganismos bacilares en el nivel 10-20m del terrero 1320 .....	201
<b>Figura 122.</b> Presencia de microorganismos sobre silicatos en la columna de biolixiviación No. 1.....	203

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Proyectos empleando biolixiviación para la extracción de cobre al año 2010 reportado en la literatura de acuerdo a (Schippers et al., 2013.).....	10
<b>Tabla 2.</b> Factores y parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y mineralógicos de importancia en un proceso de biolixiviación (Pradhan et al., 2008).....	30
<b>Tabla 3.</b> Microorganismos nativos de La Caridad, óptimos rangos de temperatura y pH para su crecimiento y capacidades metabólicas.....	38
<b>Tabla 4.</b> Terreros donde ocurre biolixiviación, clave de identificación y división de niveles de profundidad evaluados desde su superficie. ....	43
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de operación base utilizadas para microscopia electrónica de barrido.....	53
<b>Tabla 6.</b> Fases minerales mayoritarias encontradas en terreros y columnas de biolixiviación.....	139
<b>Tabla 7.</b> Análisis químico puntual por EDS de dos superficies con diferentes grados de alteración morfológica señaladas en las figuras 108 y 109.....	174
<b>Tabla 8.</b> Elementos detectados en capas de oxidación o alteración sobre la superficie de diferentes partículas de pirita.....	178
<b>Tabla 9.</b> Análisis químico puntual realizado en la superficie de calcopirita señalada en la figura 7B, se presenta una comparación de la composición de la superficie con distintos grados de alteración. ....	190



## Introducción

En la actualidad para la industria minero-metalúrgica es importante considerar alternativas que permitan el procesamiento de cuerpos minerales con un bajo contenido de metales valorables, ya que una baja ley puede representar un impedimento a nivel económico para la aplicación de determinadas técnicas convencionales de concentración y procesamiento. El uso de tecnologías que involucren el uso y aprovechamiento de microorganismos representa una opción viable para su procesamiento debido a menores costos de operación y un menor consumo de energía, además de ser una opción más amigable con el ambiente.

La extracción de metales mediada por microorganismos se basa en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de un determinado grupo de organismos procariontes (bacterias y archeas) estratégicamente adaptadas a variables condiciones de acidez, temperatura y fuentes de nutrientes específicas, que obtienen energía para su desarrollo a partir de la oxidación de compuestos reducidos de azufre y hierro. El hábitat natural de estos organismos se encuentra en los propios sitios mineros, así como en regiones volcánicas y cuerpos de agua termales, donde sus requerimientos para su metabolismo y funcionamiento se ven satisfechos. Así, los organismos utilizados en la industria minera y otros organismos microbianos intervienen de manera natural en diversos procesos de transformación de metales a través de los diferentes compartimientos de la biosfera, encontrando incluso su acción al catalizar la oxidación de sulfuros minerales de forma natural dando paso a la formación de soluciones ácidas conocidas como Drenaje Acido de Roca (DAR) a partir de ciertos residuos mineros.

A nivel industrial, este proceso es denominado como biolixiviación, el cual consiste en la oxidación y disolución de partículas minerales debido a la acción microbiana, liberando en solución los metales de interés para su posterior recuperación. La biolixiviación es aplicada para la obtención de Cobre, Zinc, Níquel, Uranio y Cobalto (Schippers et al., 2014); presenta una mayor usanza en el procesamiento de minerales de cobre a nivel internacional; obteniendo aproximadamente 15% del total de la producción mundial por este medio (Johnson, 2014).

En nuestro país la técnica de biolixiviación comienza a ser estudiada y aplicada en la mina “La Caridad”, Sonora; donde se pretende utilizar como alternativa en el procesamiento de minerales de cobre, llevándose a cabo la lixiviación de depósitos de residuos mineros provenientes de un yacimiento tipo pórfido cuprífero.

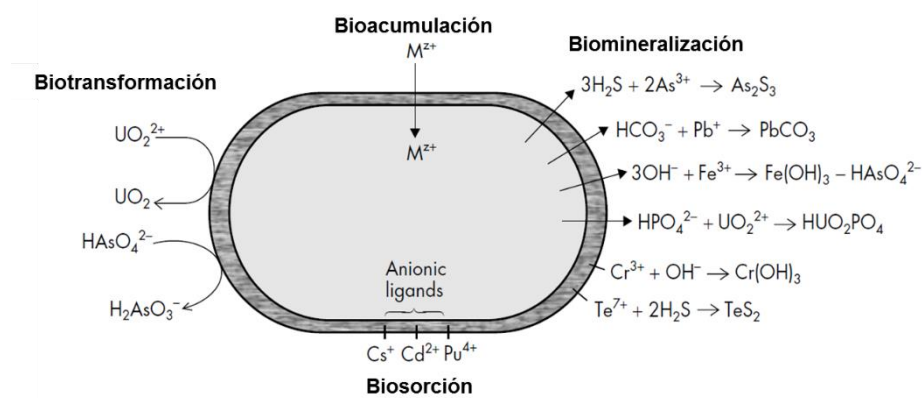
A pesar de los beneficios ambientales y económicos generados por la aplicación de la biolixiviación, esta se compara desfavorablemente en cuestión de tiempo y porcentajes de recuperación a procesos pirometalúrgicos para la extracción de cobre, ya que esta requiere un mayor periodo de tiempo para la extracción de valores requeridos o deseados. Lo anterior, hace necesario seguir estudiando y mejorando este tipo de procesos para permitir una mejora en el rendimiento de las operaciones de biolixiviación, así como ampliar el entendimiento de la acción que los microorganismos llevan a cabo. De esta forma, el presente trabajo busca emplear técnicas de caracterización mineralógica para realizar la caracterización del material sometido al proceso de biolixiviación en “La Caridad” y determinar los cambios químico-mineralógicos y morfológicos asociados a las condiciones de la operación y acción microbiana en diferentes depósitos de terreros y en pruebas a nivel laboratorio.

Además, debido a la importancia señalada en comprender con mayor detalle como ocurre la interacción y colonización de los microorganismos con las partículas minerales de interés a procesar, el presente trabajo busca aportar información acerca de este fenómeno al aplicar un proceso de preparación especial para especímenes biológicos que permita preservar la estructura de los microorganismos potencialmente encontrados en las partículas minerales y así observar mediante técnicas de microscopía con amplia resolución su interacción de forma *in situ* o cercana a la natural con aquellas partículas de sulfuros a través de los terreros. Así, se podría extrapolar el cómo ocurre la colonización en una operación a **nivel industrial**, medio en el que no se interviene directamente para propiciar su interacción con las fases minerales de interés para el proceso debido a la heterogeneidad del material.

# 1. Justificación en explicar los cambios físicos y químicos en minerales por acción de microorganismos.

En el planeta la forma de vida microbiana ha estado presente desde hace miles de millones de años, evolucionando y adaptándose a los cambios registrados en los ambientes terrestres (Ehrlich y Newman, 2009). Debido a las capacidades metabólicas exhibidas por los microorganismos, sus características morfológicas y adaptabilidad a un amplio rango de condiciones, son partícipes en determinados procesos de formación, transformación y disolución de minerales, convirtiéndolos en un componente importante en el desarrollo de determinados ciclos biogeoquímicos, así como distintos procesos geológicos y de meteorización de minerales.

La interacción de microorganismos con diferentes metales y minerales en el medio ambiente altera su estado físico y químico, ya que, en base a su capacidad de obtener energía para su mantenimiento y reproducción, los microorganismos propician la oxidación o reducción de compuestos inorgánicos, induciendo como resultado la disolución y precipitación de elementos, incluso dando paso a la formación de nuevas fases sólidas. Además, debido a la composición de su membrana celular y sustancias excretadas conocidas como sustancias extracelulares poliméricas (EPS), permiten la asociación de metales o partículas minerales en su exterior, donde el microorganismo puede funcionar como un sitio que permita la nucleación y el desarrollo de nuevas fases minerales (biomineralización) (Figura 1) (Ehrlich, 1996; Konhauser, 1998).



**Figura 1.** Procesos de transformación de metales y minerales en los que microorganismos se ven involucrados (Modificado de Konhauser, 2007).

Diferentes grupos de microorganismos se encuentran relacionados con los procesos mencionados, los cuales se llevan a cabo con base en las capacidades metabólicas y características de una familia de microorganismos. Dentro de los microorganismos relacionados con la transformación química de metales y minerales se encuentran bacterias y archeas ferrooxidantes, así como reductoras de compuestos de hierro; bacterias sulfato reductoras, y sulfuro oxidantes; bacterias oxidantes de compuestos reducidos y oxidados de manganeso, entre otras. Son estas capacidades, las que también han señalado su contribución e intervención en procesos geológicos de formación de diferentes yacimientos minerales, en especial en depósitos de hierro bandeado y nódulos de manganeso en lechos marinos (Posth et al., 2014).

En la industria minera, su aprovechamiento y uso radica en las capacidades metabólicas mencionadas, así como su adaptabilidad y tolerancia a un amplio rango de factores ambientales; como condiciones de temperatura, acidez, altas concentraciones de metales y iones en el medio que se encuentren y de carencia o presencia de oxígeno (ambientes aerobios o anaerobios).

En una operación de biolixiviación factores fisicoquímicos, mineralógicos y microbiológicos, influyen en el desarrollo y la eficiencia del proceso. Uno de estos factores es el tipo de microorganismos que llevan a cabo la lixiviación y su interacción con las distintas partículas de sulfuros metálicos. Con base en los mecanismos de biolixiviación microbiana propuestos, organismos procariontes promueven y efectúan la oxidación de dichas fases minerales; señalando la importancia de su presencia en el medio lixivante y de su contacto con la superficie mineral. La asociación entre los microorganismos y su adhesión a distintas superficies es también observada en distintos ambientes naturales, donde los microorganismos se encuentran predominantemente adheridos a una superficie sólida. Este tipo de interacción con el mineral de taludes de terrero, especialmente con aquellas partículas de sulfuros de cobre, influye en la biolixiviación debido al proceso de oxidación que generan o propician. Por lo anterior, es necesario aportar información acerca del proceso de transformación física y químico-mineralógica de las fases minerales de cobre presentes en los terreros de la mina "La Caridad", con



lo cual se conozca con mayor detalle la manera en que sucede el proceso de transformación mineral y la biolixiviación bajo las condiciones específicas de esta operación; y de esta forma aportar información que contribuya a realizar mejoras en el proceso y así aumentar los porcentajes de recuperación de cobre en terreros.

### **1.1 Pregunta de investigación**

¿Cuáles son los cambios físicos y químico-mineralógicos de los sulfuros en una operación de biolixiviación de minerales de cobre en terreros de baja ley?

### **1.2 Hipótesis**

Normalmente los minerales por naturaleza presentan ciertas características morfológicas y de composición química acorde a las condiciones de su formación geológica, lo cual permite en numerosos casos su identificación a través de sus características texturales o desarrollo de clivaje, sobre todo en sulfuros. Sin embargo, comparativamente con lo anterior, es posible encontrar que a partir de los minerales originalmente formados, podrían encontrarse cambios texturales superficiales o volumétricos con el consecuente e inusual desarrollo de clivaje y cambios en la composición química; y que estos cambios, podrían ser inducidos o acelerados por la influencia de actividad antropogénica, alterando las condiciones del entorno como el incremento en el nivel de acidez y temperatura, lo cual podría propiciar el desarrollo de un proceso de biolixiviación que tal vez ya ocurría con especies adaptadas y nativas de un sitio en particular. El determinar dichos cambios *in situ*, en muestras extraídas de los taludes de biolixiviación a diferentes profundidades, permitirá conocer con mayor detalle el proceso de transformación de las partículas minerales, y por consiguiente relacionarlo con el proceso de biolixiviación que ocurre en el sitio; y bajo la consideración de que el estudio debe realizarse mediante condiciones especiales y específicas de preparación de muestras, así como de operación de las técnicas de caracterización propuestas; se conseguiría un desarrollo óptimo del estudio propuesto, y que de otra manera no se tendría el éxito esperado si se emplearan los procedimientos convencionales.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

Determinar los cambios físicos y químico-mineralógicos de sulfuros en una operación de biolixiviación de minerales de cobre en terreros.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la composición mineralógica de distintas muestras de terreros de biolixiviación.
- Caracterizar la alteración morfológica de partículas de sulfuros de cobre y otros sulfuros presentes en distintas muestras de terreros.
- Caracterizar los cambios químico-mineralógicos de partículas de sulfuros de cobre y otros sulfuros presentes en distintas muestras de terreros.
- Observar e identificar la interacción física que mantienen los microorganismos sobre la superficie de sulfuros de cobre y otros sulfuros mediante microscopia electrónica de barrido.

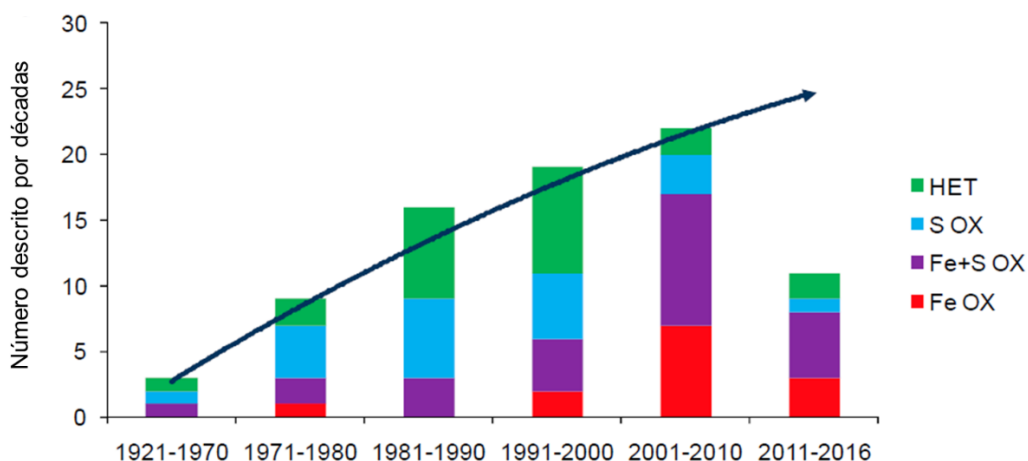
## **2. Antecedentes sobre el proceso de oxidación biológica de sulfuros y aplicación en la industria minera.**

### **2.1 Producción y procesamiento del Cobre.**

Las actividades de extracción, procesamiento y beneficio de minerales han representado desde hace siglos una importante fuente de materias primas para la creación de herramientas, diversos tipos de productos o incluso como un medio para el sostén de la economía de diferentes naciones por el valor que poseen algunos metales y su comercialización (UNEP, 2000). La creciente demanda e incremento en las operaciones de extracción de metales base y preciosos, al mismo tiempo que ocurre la disminución de cuerpos minerales con altas leyes representa un reto para la industria minera, por lo que técnicas de procesamiento costeables y aptas para el tratamiento de depósitos minerales con bajas leyes deben ser aplicadas (Watling, 2006). El empleo de una técnica de procesamiento depende de las características mineralógicas del mineral a procesar. En el caso de metales como el cobre, este puede encontrarse en forma de óxidos y sulfuros, siendo las fases sulfuradas las más abundantes en la naturaleza (Schippers et al., 2013). Los sulfuros minerales de cobre han sido objeto de procesos pirometalúrgicos (roasting/fundición) para su obtención, las cuales han sido desarrolladas ampliamente, sin embargo, debido a los bajos contenidos de cobre en determinados cuerpos minerales, su procesamiento puede no ser económicamente viable por estos métodos de extracción, por lo que los procesos hidrometalúrgicos representan una alternativa adecuada para su beneficio.

En el caso de procesos hidrometalúrgicos, su aplicación puede remontarse hacia la época en que los alquimistas y distintas civilizaciones en los años 100 y 200 D.C. utilizaban soluciones acuosas para la extracción de metales (Habashi, 2005). Sería hasta finales del siglo XIX, cuando se presenta el nacimiento de los procesos hidrometalúrgicos modernos al ser patentado el proceso de cianuración de oro en 1887 por John Stewart MacArthur (Habashi, 2005). Posterior a este hecho, las técnicas de lixiviación han evolucionado y han sido aplicadas para el procesamiento de diferentes cuerpos minerales en la extracción de uranio, zinc,

cobre, entre otros. Un suceso importante dentro del desarrollo de la hidrometalurgia fue el descubrimiento de la acción microbiana involucrada en el proceso, siendo primeramente identificada en la extracción de cobre. El rol de los microorganismos en los procesos de lixiviación era desconocido hasta mediados del siglo XX, cuando *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, los primeros microorganismos actores en el proceso de lixiviación de sulfuros fueron descubiertos en 1922 y 1947, respectivamente (Waksman y Joffe, 1922; Hinkle y Koehler, 1947; Schippers et al., 2013). A partir de esta época, se comenzó el estudio de los distintos microorganismos con capacidades para transformar partículas minerales, identificando un gran número en las siguientes décadas, exhibiendo distintas capacidades metabólicas (Figura 2). Dentro de estos microorganismos, *Acidithiobacillus ferrooxidans* ha sido uno de los microorganismos más estudiados desde su descubrimiento debido a sus capacidades de oxidar compuestos tanto de hierro como de azufre, la facilidad para su aislamiento, cultivo y su rápido crecimiento en condiciones ácidas (Watling, 2016).



**Figura 2.** Número de microorganismos acidófilos (Bacteria y Archea) aislados en ambientes relevantes para los procesos de biolixiviación desde el descubrimiento de *Acidithiobacillus thiooxidans* hasta febrero 2016. Son agrupados de acuerdo a si son quimiolitautótrofos o mixotrófos que utilizan hierro (II) (Fe Ox), hierro (II) y azufre (Fe +S Ox) o solamente azufre (S Ox) o son Heterótrofos (HET) (modificado de Watling 2016).

Fue así que dentro de los 20 años posteriores al descubrimiento de los primeros microorganismos lixiviantes, se estableció la primera operación de **biolixiviación** a nivel industrial para el uso y aprovechamiento de sus capacidades, reconociendo la contribución de organismos bacterianos para la extracción de cobre a partir de montículos de residuos mineros (terreros), en la mina Bingham Canyon en Utah, E.U.A. operada por la Kennecott Copper Corporation en los años de 1960 (Johnson, 2014). Posteriormente, Harrison reportó en 1966 el rol de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en una operación de lixiviación en montones de uranio en la mina Elliot Lake, Ontario, Canadá (Hamidian et al., 2009) . En el caso de la extracción de oro, los microorganismos han sido empleados como un pretratamiento para los minerales refractarios de este, siendo empleados por primera vez a nivel industrial en 1986 en la mina Fairview, Sudáfrica. Con el paso del tiempo, se han desarrollado variantes en las operaciones asistidas por microorganismos, cobrando relevancia y convirtiéndose en una opción viable en la extracción de distintos metales, pero particularmente para la extracción de cobre a partir de cuerpos minerales de baja ley (Watling, 2016). De esta forma, el uso de microorganismos ha representado una alternativa a los procesos pirometalúrgicos y de flotación para el tratamiento de sulfuros de cobre.

En la actualidad, el 15% del cobre producido a nivel mundial es obtenido por vía de la biolixiviación (Johnson, 2014; Panda et al., 2015). En este contexto, Chile, siendo uno de los principales productores de cobre a nivel mundial ha utilizado en gran medida el proceso de biolixiviación de sulfuros para la obtención de cobre. Su aplicación a nivel industrial y operación diseñada para facilitar la actividad microbiana inicio en 1980 en la mina “Lo Aguirre”, mediante un sistema de lixiviación en montones (Olson et al., 2003). Posteriormente fue aplicada en otros puntos del país desde la década de 1990, y que han continuado operando en algunos casos. Chile actualmente provee una tercera parte del cobre producido a nivel mundial, siendo un 10% de su producción generado mediante alguna de las variantes del proceso de biolixiviación (COCHILCO, 2009). Las operaciones vigentes de biolixiviación en este país al año 2010 se señalan en la tabla 1, donde además se indican operaciones establecidas en otros países para la extracción de cobre; como

Australia, Perú, Estados Unidos, Myanmar y China, indicando un importante desarrollo y aplicación de este proceso (Hoque y Philip, 2011; Schippers et al., 2013; Panda et al., 2015).

**Tabla 1.** Proyectos empleando biolixiviación para la extracción de cobre al año 2010 reportado en la literatura de acuerdo a Schippers et al., 2013.

País	Operación	Operador	Cu en toneladas
<b>Australia</b>	Whim Creek	Venturex	4,000
<b>Australia</b>	Lady Annie	CST Mining	20,000
<b>Chile</b>	Tres Valles	Vale SA	18,500
<b>Chile</b>	Division Andina	Codelco	25,000
<b>Chile</b>	Escondida	BHP Billiton Group	180,000
<b>Chile</b>	Ivan Zar	Cia Minera Milpo SA	10,000
<b>Chile</b>	Los Bronces	Anglo American Plc	50,000
<b>Chile</b>	Quebrada Blanca	Teck Resources Ltd	85,000
<b>Chile</b>	Spence	BHP Billiton Group	120,000
<b>Chile</b>	Radomiro Tomic	Codelco	100,000
<b>Chile</b>	Collahuasi	Xstrata Plc	60,000
<b>Chile</b>	Cerro Colorado	BHP Billiton Group	100,000
<b>Chile</b>	Andacollo	Teck Resources Ltd	10,000
<b>Chile</b>	Zaldivar	Barrick Gold Corp	140,000
<b>Chile</b>	Chuquicamata	Codelco	20,000
<b>China</b>	Zijinshan Copper	Zijin Mining Group Co Ltd	12,840
<b>China</b>	Huogequi	Gobierno local	20,000
<b>Myanmar</b>	Monywa	Río Tinto, State of Myanmar	9,000
<b>Perú</b>	Cerro Verde	Freeport-McMoran	66,000
<b>USA</b>	Morenci	Freeport-McMoran	230,000
Total			1,280,340

A pesar del relativo reciente descubrimiento y estudio de los microorganismos, su intervención en la obtención del cobre puede ser trazado a poco más de 2000 años, mucho antes que se tuviera conocimiento de la contribución de distintas formas de vida microbianas. El escritor romano Gaius Plinius Secundus (23 – 73 D.C.) reportó sobre la obtención de cobre tras el paso de agua en material de mina durante el invierno hasta el verano, cuando el agua era subsecuentemente evaporada recuperando el cobre contenido en la solución (Hamidian et al., 2009). En China, textos de esa misma época señalan la formación de sulfato de cobre en arroyos tras estar en contacto con cuerpos rocosos; En el

año 166 D.C., el científico Romano Galeno describió lo que hoy sería considerada como la lixiviación in situ de cobre en la mina Cyprus (Watling, 2016).

El siglo II también marco la época en que la civilización romana realizaba operaciones de extracción de cobre en la zona del Río Tinto, España, uno de los sitios más representativos de la actividad microbiana en la actualidad (Olías y Nieto, 2015). Durante el siglo XVI la recuperación de cobre en algunas minas de España, Hungría y Alemania consistía en el tratamiento de agua de mina, la cual contenía al cobre en solución y que posteriormente era recuperado al entrar en contacto con hierro metálico, en un proceso que fue descrito por Paracelsus (1493 -1541) denominado cementación. En ese mismo periodo, el físico alemán Georgius Agricola (1494 – 1555) describió en su trabajo *De re metallica* la recolección manual de lixiviados de minerales de cobre que eran depositadas en pequeños estanques de madera, para que la solución fuera evaporada por la luz solar y ser concentrada. A finales del siglo XIX, años antes al descubrimiento de los primeros microorganismos lixiviantes, se registran operaciones para la obtención de cobre a partir de la lixiviación de sulfuros dispuestos en montículos, que se llevaría a cabo en el Río Tinto, España (Olson et al., 2003; Olías y Nieto, 2015; Watling, 2016). Tras ser descubiertos y reconocer su contribución en la oxidación de distintas fases minerales, las características y el rol de los microorganismos dentro de otros procesos de transformación de metales y minerales comenzó a ser estudiado.

## 2.2 Biominería

El termino Biominería se emplea para describir aquellos procesos que se basan en la aplicación de diferentes microorganismos para facilitar la extracción y recuperación de metales de interés económico a partir de minerales y residuos de los procesos minero metalúrgicos convencionales (Rawlings, 2004). Su aplicación consiste en utilizar las capacidades metabólicas de diferentes organismos bacterianos para mediar la oxidación y disolución de sulfuros minerales, teniendo como resultado la obtención de un metal en solución o liberarlo de una matriz contenedora. Dentro de los procesos industriales que este término engloba, se encuentran la **biooxidación** y la **biolixiviación**, técnicas diferenciadas en su

aplicación debido a la finalidad del proceso que se realiza y el mineral procesado (Rawlings, 2004; Schippers et al., 2014). El término **biooxidación** se refiere al procesamiento preliminar de minerales refractarios de oro, como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) para facilitar así su liberación; mientras que la **biolixiviación** de minerales, hace referencia a la oxidación y disolución de sulfuros metálicos de un elemento de interés, el cual se obtendrá en solución (Schippers et al., 2014).

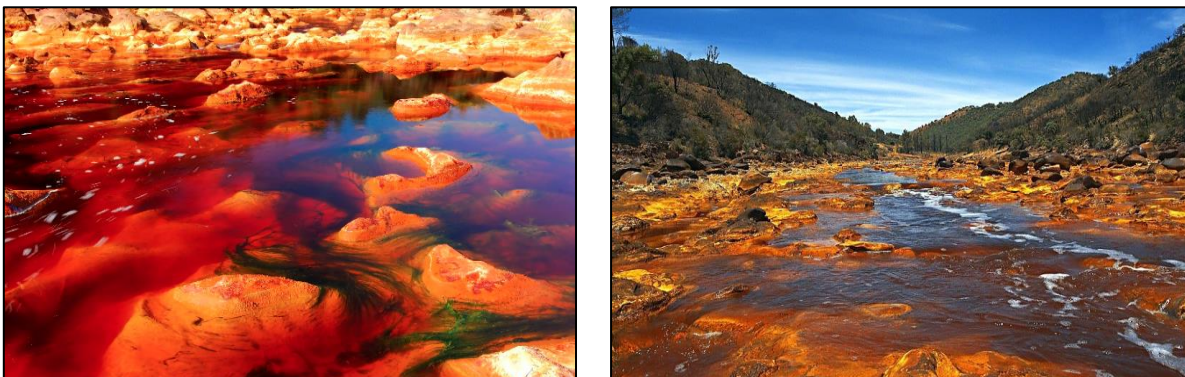
Los microorganismos participantes en los procesos de biolixiviación y biooxidación son organismos procariontes pertenecientes a los dominios Bacteria y Archea (Ehrlich y Newman, 2009; Rohwerder y Sand, 2007a), denominados organismos quimiolitioautótrofos, debido a su capacidad de obtener energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos. En particular, oxidan compuestos reducidos de azufre y hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), asimilando carbono inorgánico a partir de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) atmosférico y utilizando oxígeno como aceptor de electrones (Ehrlich y Newman, 2009; Vera et al., 2013); así mismo, se desarrollan apropiadamente en ambientes ácidos ( $\text{pH} < 4$ ) y bajo la presencia de oxígeno. De acuerdo a su óptima temperatura de crecimiento, pueden ser subdivididos y clasificados en tres categorías: mesófilos, con temperaturas apropiadas de desarrollo de 20 a 40°C; termófilos moderados, de 40 a 55°C; y termófilos extremos, entre 55 a 80°C (Schippers et al., 2013).

El procesamiento de minerales a nivel industrial por este tipo de microorganismos, implica que en algunos casos sean cultivados previamente para ser añadidos al recurso mineral, sin embargo, también se encuentran de forma natural en los cuerpos minerales de diferentes regiones mineras (Schippers et al., 2010; Tao y Dongwei, 2014). Un amplio grupo ha sido identificado en base al estudio microbiológico de material proveniente de cuerpos mineralizados, residuos minero-metalúrgicos como terreros y jales, soluciones ácidas generadas a partir de este tipo de material, así como muestras minerales pertenecientes a operaciones de biolixiviación ya existentes. Dentro de este grupo se encuentran organismos pertenecientes a los géneros *Acidithiobacillus*, *Ferroplasma*, *Acidimicrobium*, *Sulfobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Acidianus*, *Metallosphaera*, *Sulfolobus*,



*Sulfurococcus* y *Thermoplasma* (Schippers et al., 2010). En operaciones a nivel industrial entre los organismos más importantes se encuentran los mesófilos ferro y sulfuro oxidantes, pertenecientes al género *Acidithiobacillus*. Algunas de las bacterias señaladas como importantes agentes en el proceso de biolixiviación son *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que posee la capacidad de oxidar compuestos de hierro y azufre; *Acidithiobacillus thiooxidans*, bacteria que cuenta con la capacidad de oxidar compuestos reducidos del azufre; y *Leptospirillum ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum*, que son organismos ferro oxidantes (Schippers y Sand, 1999).

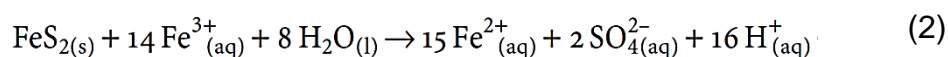
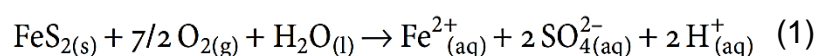
Además de su importancia y aplicación a nivel industrial, se debe señalar que el proceso de oxidación y disolución de minerales es un fenómeno que ocurre de manera natural. Es así que la presencia de los distintos microorganismos acidófilos se registra en ambientes volcánicos, aguas termales, depósitos minerales, residuos minero-metalúrgicos, entre otros. En este contexto, un sitio representativo de la presencia natural de microorganismos ferro y sulfuro oxidantes es el Río Tinto; ubicado en la provincia de Huelva, Andalucía, España. El río tinto se encuentra en el Cinturón Pirítico Ibérico, donde debido a la presencia e interacción de una gran diversidad de microorganismos con sulfuros polimetálicos, se genera un ecosistema único en su tipo. El río cuenta con una extensión de 92 km, a través de la cual se presentan condiciones de acidez (pH promedio de 2.3), altas concentraciones de metales pesados, ion férrico, y sulfatos; productos de la oxidación y disolución de sulfuros metálicos por acción microbiana (Figura 3) (Johnson, 2014).



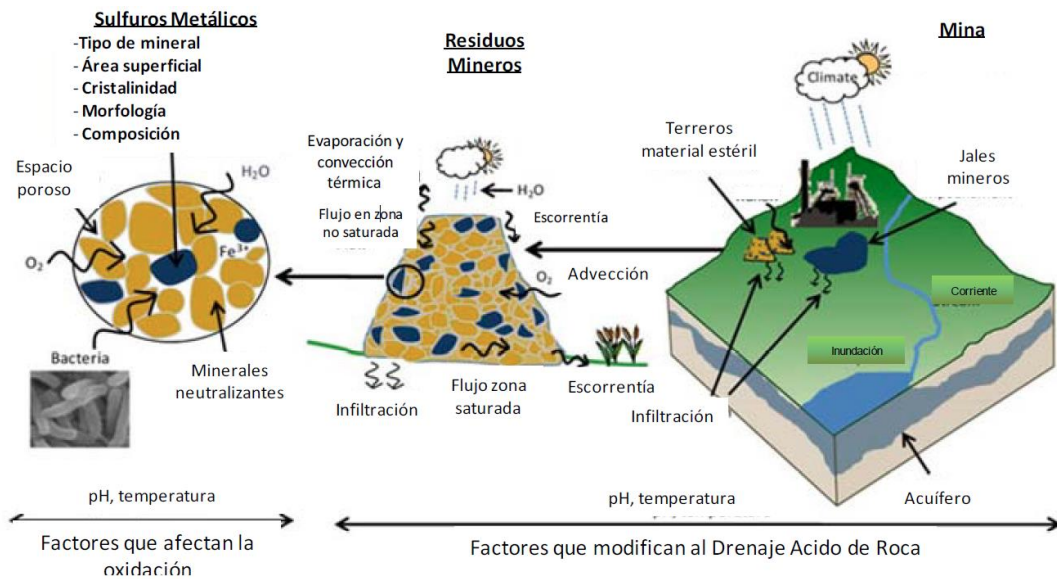
**Figura 3.** Aspecto del Río Tinto, Andalucía, España. Las características observadas son debido a las altas concentraciones de hierro disuelto en el agua del río.

En contraste al aspecto benéfico que representa las prácticas de biolixiviación en la industria minera, su desarrollo bajo condiciones no controladas puede constituir un suceso negativo hacia el medio ambiente. Durante la extracción y el procesamiento de depósitos minerales se generan grandes cantidades de residuos en forma de terreros o jales que son acumulados en sitios mineros; y debido a que los sulfuros minerales representan un hábitat natural para microorganismos acidófilos, la presencia de bacterias y archeas ferro y sulfo oxidantes en dichos residuos minero-metalúrgicos representa uno de los factores que promueven la generación de Drenaje Ácido de Roca (DAR).

Al ser dispuestos bajo condiciones atmosféricas, algunos sulfuros se vuelven termodinámicamente inestables, ocurriendo su oxidación y disolución, generando soluciones ácidas con alto contenido de metales, sulfatos, hierro y elementos potencialmente tóxicos (EPT); representando una fuente de contaminación para suelos o cuerpos de agua de zonas limítrofes (Blowes et al., 2003). La importancia de los microorganismos en la generación de DAR radica en sus capacidades metabólicas, ya que dentro de las acciones que llevan a cabo, catalizan la oxidación de sulfuros metálicos como Pirita ( $\text{FeS}_2$ ) (ecuación 1 y 2) y pirrotita ( $\text{FeS}$ ), al promover la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ , uno de los principales agentes oxidantes de sulfuros bajo condiciones ácidas. De esta forma, al incrementar la velocidad de oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y compuestos de azufre, pueden catalizar la oxidación de sulfuros en un orden de 100 a 1000 veces mayor en comparación a condiciones de oxidación abióticas (Lottermoser, 2007).



La generación de DAR y su composición, depende de distintos factores aunados a la presencia de los organismos microbianos. Las características mineralógicas y geoquímicas de los residuos, su localización, las condiciones hidrogeológicas y climáticas del sitio son algunos de ellos (Figura 4) (INAP, 2009).



**Figura 4.** Representación esquemática de los factores que intervienen en el proceso de generación de Drenaje Ácido de Roca (DAR) (Modificado de INAP, 2009).

### 2.3 Mecanismos de lixiviación microbiana

La lixiviación de los sulfuros minerales es mediada por diferentes clases de microorganismos y comunidades microbianas que se encuentran en contacto con el mineral o suspendidas en la solución lixivante (estado planctónico) (Tributsch, 2001). La oxidación y disolución de las fases minerales puede ser realizada vía tres mecanismos, donde los organismos bacterianos actúan sobre la superficie mineral promoviendo la oxidación y/o proporcionando el agente químico oxidante y las condiciones de acidez necesarias en el medio; estos mecanismos son: de biolixiviación indirecta o de no-contacto, de contacto y un mecanismo cooperativo de biolixiviación (Rohwerder y Sand, 2007; Schippers et al., 2014).

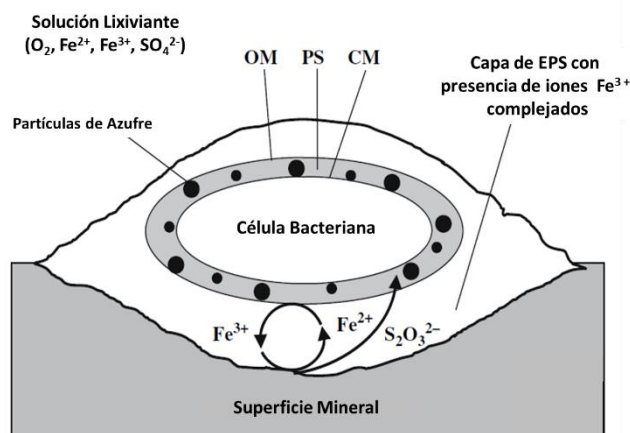
### **2.3.1 Mecanismo de biolixiviación indirecta o de no-contacto**

El mecanismo de biolixiviación indirecta o de no contacto comprende la oxidación de la superficie mineral por la acción de un agente químico, producto del metabolismo de microorganismos ferrooxidantes que se encuentran en el medio (Vera et al., 2013). En este escenario los diferentes tipos de bacterias se encuentran en estado planctónico (suspendidas en solución), utilizando iones de  $\text{Fe}^{2+}$  liberados de la matriz mineral o suministrados directamente al medio, como donadores de electrones, oxidándolos y produciendo iones férricos que posteriormente entrarán en contacto con la superficie mineral, oxidándola. La función que desempeñan los microorganismos es el de (re)generar y suministrar el agente oxidante al proceso (Rohwerder y Sand, 2007).

### **2.3.2 Mecanismo de biolixiviación de contacto**

El mecanismo de contacto consiste en la adhesión de las bacterias a la superficie mineral para que el proceso de oxidación sea realizado. La adhesión es mediada por la producción de una capa de polímeros (EPS) que rodea a la bacteria y que actúa como una interface entre el microorganismo y la superficie mineral, interface que representa el espacio donde ocurre la reacción de oxidación y disolución mineral (Rodríguez et al., 2003; Rohwerder y Sand, 2007). La composición de esta capa de polímeros es variable de acuerdo al tipo de microorganismo y de su sustrato de crecimiento, sin embargo, a pesar de las diferencias en composición, para el caso de aquellos microorganismos ferrooxidantes como *Leptospirillum ferriphilum* y *Acidithiobacillus ferrooxidans* se ha identificado y comprobado la presencia de iones férricos formando complejos con ácido glucurónico en esta capa de EPS, siendo el  $\text{Fe}^{3+}$  el que representa el agente oxidante, y que llevará a cabo el proceso de oxidación (Figura 5) (Rohwerder y Sand, 2007). El ion ferroso resultante que se encontrará dentro de la capa de exopolisacáridos (EPS) será oxidado por acción enzimática si este se difunde hacia la membrana celular de la bacteria, generándose nuevamente el agente oxidante ( $\text{Fe}^{3+}$ ), involucrándose de nuevo en el proceso. Los iones ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) también

pueden ser liberados de la EPS hacia el bulk de la solución lixiviante, donde actuarán como sustrato para las bacterias suspendidas en la solución.



**Figura 5.** Mecanismo de contacto por el cual se lleva a cabo la biolixiviación de sulfuros minerales (Rohwerder y Sand, 2007).

Anteriormente se había propuesto un mecanismo de contacto directo, en el cual no se contemplaba la presencia de intermediarios (iones férricos) y un espacio de polímeros (EPS) para que ocurriera la oxidación de la superficie mineral (Rawlings, 2004). Sin embargo, en recientes publicaciones se menciona la falta de información que conlleve a afirmar una interacción directa de la membrana celular de este tipo de microorganismos con la superficie de los minerales, lo cual permita por acción enzimática realizar la oxidación y/o la transferencia de electrones directamente desde el mineral hacia la bacteria (Watling, 2006; Rohwerder y Sand, 2007; Vera et al., 2013; Tao y Dongwei, 2014).

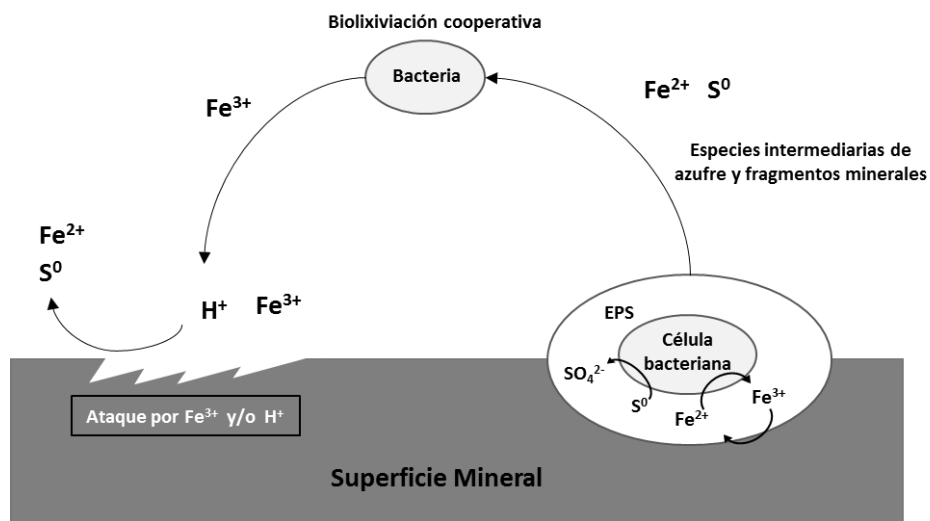
### 2.3.3 Mecanismo cooperativo de biolixiviación

Además de los mecanismos de **no-contacto** y **contacto**, se ha señalado un tercero por el que los microorganismos ejecutan acciones que promueven la oxidación y transformación de partículas minerales. El mecanismo **cooperativo de biolixiviación** representa una asociación e interacción entre las bacterias adheridas a la superficie mineral y las que se encuentran libres en solución.

Debido a la oxidación realizada por las bacterias que se encuentran sobre la superficie mineral, iones de  $Fe^{2+}$ , partículas coloidales de azufre, sustancias

intermediarias del azufre como tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) y otros fragmentos minerales, son liberados de la matriz mineral hacia la solución lixiviante, en donde otros microorganismos se encuentran suspendidos (Schippers et al. 2013; Vera et al. 2013; Tao y Dongwei 2014).

En este escenario, los microorganismos utilizan las sustancias y partículas mencionadas como sustrato; en el caso del ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ), los organismos ferro oxidantes en estado planctónico lo transforman en ion férrico ( $Fe^{3+}$ ), regenerando el agente oxidante de la superficie mineral (Figura 6) (Tributsch, 2001; Rohwerder y Sand, 2007). En el caso de aquellas partículas y especies de azufre liberadas, estas servirán como fuente de energía para organismos sulfo oxidantes como *Acidithiobacillus thiooxidans* suspendidos en solución, transformando azufre elemental y especies como tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) a ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) (Shiers, 2012; Vera et al., 2013).



**Figura 6.** Mecanismo cooperativo de biolixiviación de sulfuros metálicos (Adaptado de Tao y Dongwei, 2014).

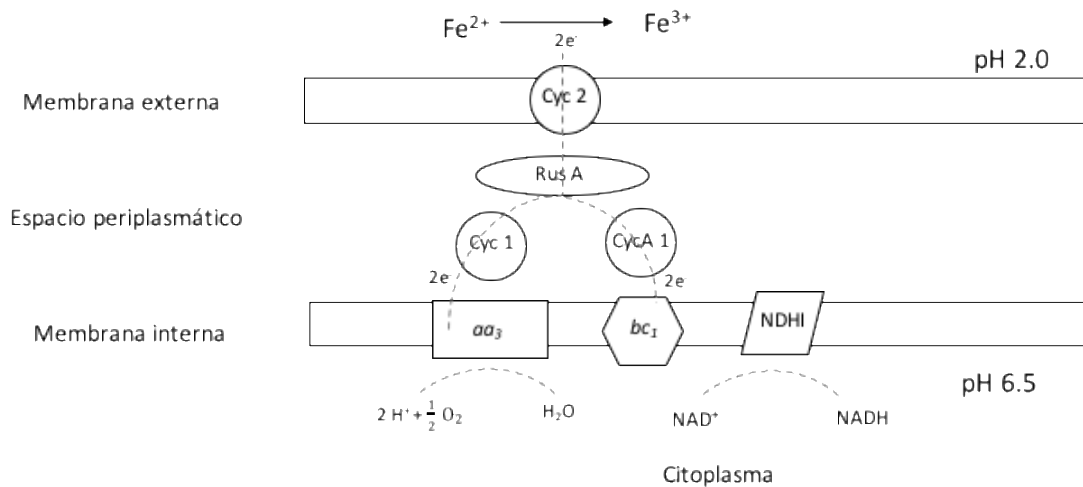
Como es conocido los microorganismos poseen múltiples rutas metabólicas para asegurar su supervivencia, entre las cuales se presentan la oxidación de compuestos minerales y elementos en solución como hierro y azufre. Esto se logra gracias a distintos mecanismos de transformación enzimática dentro de las células bacterianas, donde tras la producción de agentes oxidantes y la inducción de acidez en el medio, la bacteria obtiene la energía requerida para su desarrollo.

## **2.4 Rutas metabólicas de oxidación de metales en bacterias**

En el proceso de biolixiviación se presentan reacciones químicas y biológicas ya que los microorganismos llevan a cabo la transformación de especies minerales gracias a las distintas capacidades metabólicas que exhiben; usando energía y electrones derivados de la oxidación de hierro (II) y de compuestos reducidos del azufre para la fijación de dióxido de carbono y otros procesos anabólicos (Quatrini et al., 2009). Dentro de la gran diversidad de organismos acidófilos, existen algunos capaces de oxidar ambos tipos de compuestos, como el caso de *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

### **2.4.1 Mecanismos de oxidación biológica del hierro**

En ambos casos, la oxidación de hierro y azufre ocurre en el espacio periplasmático de los microorganismos, donde en base al transporte de electrones a través de distintas proteínas el microorganismo obtiene la energía requerida para su subsistencia. La mayoría de los estudios en rutas de oxidación de hierro en organismos ferrooxidantes se han enfocado en investigar el modelo de la oxidación en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En este, los electrones resultantes a partir de la oxidación de Fe(II) a Fe(III) son transportados desde la membrana externa por un citocromo de alto peso molecular (Cyc2) a través del periplasma por una serie de proteínas (Rus A) y citocromos (Cyc 1, CycA 1) hasta la membrana interna de la célula, en donde aa3 oxidasa reduce oxígeno molecular a agua dentro del citoplasma. Durante esta reacción, protones entrando a la célula son consumidos, lo que permite mantener un pH óptimo en el microorganismo.

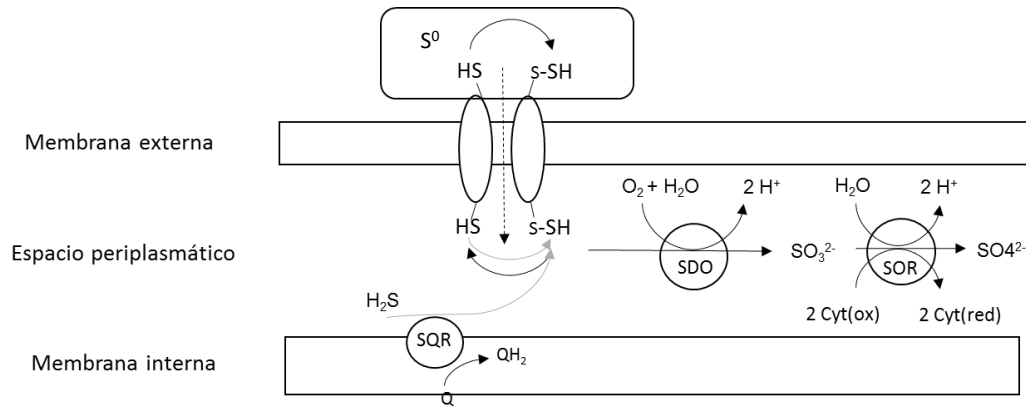


**Figura 7.** Modelo de la oxidación de Fe (II) por *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En la imagen se representa los componentes involucrados en la cadena de transporte de electrones en esta bacteria propuestos por Quatrini et al. 2009.

#### 2.4.2 Mecanismos de oxidación biológica del azufre

Durante la biolixiviación es importante destacar la generación de distintos compuestos de azufre. A diferencia del hierro, el azufre existe en nueve estados de oxidación, desde -2 (sulfuro de hidrógeno) a +6 (sulfato), donde su completa oxidación desencadena en la formación de ácido sulfúrico y por consecuencia en la acidificación del medio. En el caso de azufre elemental, este se forma como subproducto de la oxidación de minerales como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), depositándose sobre la superficie mineral. Tomando esto en consideración, la oxidación biológica de azufre elemental puede requerir la adhesión de microorganismos a la partícula de azufre, donde el transporte de las especies de azufre a través de la membrana externa involucra proteínas de transporte con grupos funcionales tipo tiol ( $\text{R-SH}$ ) que al entrar en contacto con  $\text{S}^0$  formaran complejos  $\text{R-SS}_n\text{H}$ . Posteriormente, al atravesar la membrana externa su oxidación ocurrirá por vía de la enzima sulfuro dioxigenasa (SDO), sulfito reductasa (SOR) en el espacio periplasmático y por sulfuro quinona dehidrogenasa (SQR) en la membrana interna, donde los posibles aceptores de electrones son citocromos y quinonas como se señala en la figura 8.





**Figura 8.** Modelo de la oxidación de partículas de azufre elemental. En la imagen se representa los componentes involucrados en la cadena de transporte de los distintos compuestos formados dentro la célula bacteriana y arqueas sulfuro oxidantes (propuestos por Rohwerder y Sand, 2003).

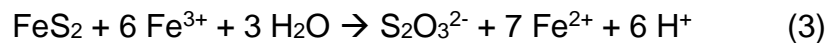
## 2.5 Mecanismo vía Tiosulfato y vía Polisulfuro.

En la información mencionada sobre los mecanismos de biolixiviación como en las rutas metabólicas involucradas en estos mismos procesos, se ha identificado la formación de diferentes especies químicas intermediarias debido a la generación de un agente oxidante (iones férricos, protones) y una consecuente oxidación de los compuestos de azufre liberados (Vera et al., 2013). Por lo que dos mecanismos de reacción para la disolución de los sulfuros minerales han sido propuestos; el mecanismo vía **Tiosulfato** y el mecanismo vía **Polisulfuro**.

La configuración electrónica de las fases minerales y por lo tanto su solubilidad en medio ácido son los criterios relevantes que determinarán los mecanismos de reacción por los cuales se desarrolla la biolixiviación y los compuestos intermediarios que pueden presentarse (Schippers y Sand, 1999; Rohwerder y Sand, 2007). De acuerdo a estos criterios, los sulfuros minerales con orbitales formados únicamente por átomos metálicos, como FeS<sub>2</sub> (pirita), MoS<sub>2</sub> (molibdenita) y WS<sub>2</sub> (tugstenita) se engloban dentro del grupo de minerales insolubles en ácido, mientras que dentro del grupo de los sulfuros solubles bajo condiciones ácidas se encontrarían aquellos con bandas de valencia formadas a partir de un átomo metálico y uno de azufre. Algunas fases minerales que pertenecen a este grupo son; As<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (oropimente), As<sub>4</sub>S<sub>4</sub> (rejalgar), CuFeS<sub>2</sub> (calcopirita), FeS (pirrotita), Fe<sub>7</sub>S<sub>8</sub> (troilita), MnS<sub>2</sub> (hauerita), PbS (galena), y ZnS

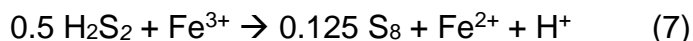
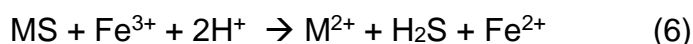
(esfalerita) (Schippers y Sand, 1999; Vera et al., 2013). El primer grupo tomará la vía Tiosulfato, mientras que los otros sulfuros la vía Polisulfuro.

La disolución de las fases minerales no solubles en ácido, por el **mecanismo vía Tiosulfato** se desarrolla únicamente por la acción del agente oxidante, siendo iones férricos el agente oxidante más importante en el ambiente ácido, característico de una operación de biolixiviación. Como primer compuesto intermediario en la disolución se genera tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), además de ser liberado el metal ( $M^{2+}$ ) que acompaña al azufre. Posteriormente el tiosulfato es oxidado por acción microbiana o por un agente químico ( $Fe^{3+}$  y/o  $O_2$ ) a tetrionato, el cual será transformado a otro politionato hasta generarse sulfato. Debido a que el principal oxidante es el ion férrico, la presencia de microorganismos ferrooxidantes es de gran importancia para la lixiviación de este tipo de fases. Ejemplificando la oxidación de la piritita, el mecanismo vía Tiosulfato puede ser descrito mediante las reacciones (3) y (4) (Schippers y Sand, 1999):

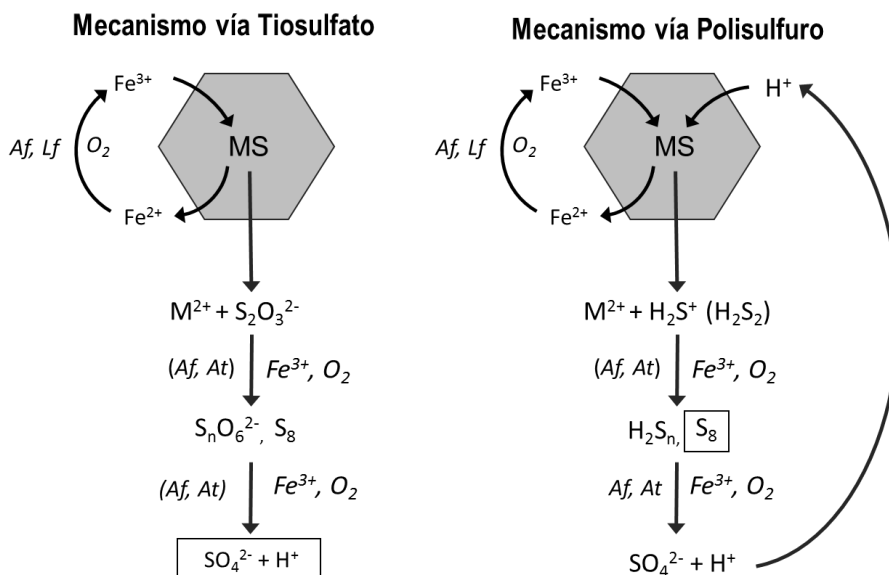


En contraste, sulfuros metálicos con una configuración electrónica distinta a  $FeS_2$ ,  $MoS_2$  y  $WS_2$ , son susceptibles a la oxidación por acción de iones férricos y/o iones hidronio ( $H_3O^+$ ). Debido a esta condición, se forman diferentes intermediarios que son explicados mediante el **mecanismo de disolución vía Polisulfuro**. Este mecanismo es descrito en forma general por las reacciones (5), (6), (7) y (8), donde se observa que en el transcurso de la oxidación se presenta la formación de  $H_2S$  que da paso a la formación de bisulfuro, siendo oxidado a otros polisulfuros hasta azufre elemental ( $S_8$  o  $S^0$ ), y finalmente, se genera sulfato además de iones hidronio que le confieren un carácter ácido al medio. En este tipo de fases minerales un 90% del azufre presente puede ser transformado a azufre elemental en ausencia de bacterias oxidantes del azufre como *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus caldus*, por lo que es posible la formación de una capa pasivante sobre la superficie mineral. Debido a que de forma abiótica y bajo las condiciones en las que se desarrolla típicamente las operaciones de biolixiviación, el  $S^0$  no es oxidado

completamente, por lo que la presencia de bacterias sulfo oxidantes durante la biolixiviación es importante para el proceso y así evitar la formación de una capa pasivante sobre las partículas minerales de interés (Schippers y Sand, 1999; Schippers et al., 2014).

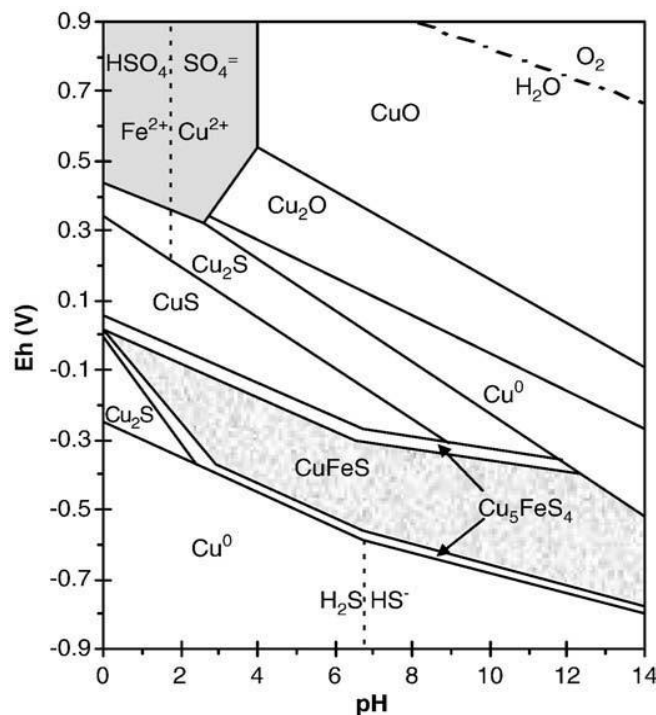


Una representación esquemática de los mecanismos de reacción mencionados y las etapas de cada una de las vías se señalan en la Figura 9, en donde se indica la contribución de diferentes organismos ferro y sulfo oxidantes durante ambos procesos. La oxidación de cada uno de los sulfuros minerales ocurre por uno de los mecanismos de reacción mencionados, donde la acción de los microorganismos sobre las partículas minerales se ve involucrada. En el caso de una operación de biolixiviación de sulfuros de cobre, entre las fases de mayor interés se encuentran la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) y covelita ( $\text{CuS}$ ).



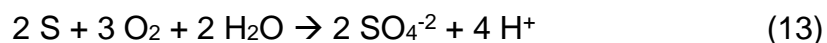
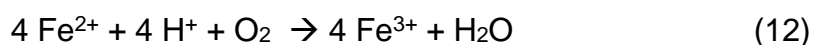
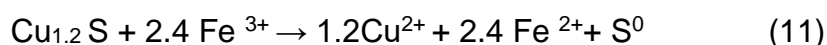
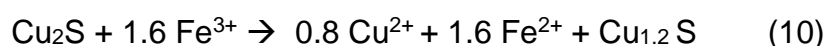
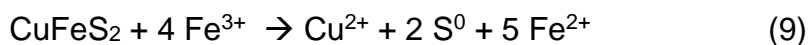
**Figura 9.** Esquema comparativo de los mecanismos de biolixiviación vía Tiosulfato y Polisulfuro. Se señalan especies intermediarias y productos finales. MS: Sulfuro, M: Cation metálico, Af: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Lf: *Leptospirillum ferrooxidans*, At: *Acidithiobacillus thiooxidans* (Schippers y Sand, 1999).

La calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), comprende el mineral de cobre más abundante en la naturaleza al representar el 70% de las reservas mundiales de cobre en el mundo (Watling, 2016). Su oxidación y consecuente disolución puede ocurrir bajo condiciones ácidas a temperatura ambiente ( $20 - 30\text{ }^\circ\text{C}$ ) en presencia de ion férrico, sin embargo, se reporta como un proceso lento debido a distintos factores de temperatura y procesos de pasivación que evitan su completa oxidación bajo estas condiciones (Panda et al., 2015). La oxidación de la calcopirita en medio ácido se muestra en el diagrama de Pourbaix para el sistema  $\text{CuFeS}_2 - \text{H}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$ , donde se observa su transformación a diferentes sulfuros intermediarios ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ,  $\text{CuS}$ ,  $\text{Cu}_2\text{S}$ ), en las que el contenido de cobre se ve incrementado consecuentemente hasta su liberación en solución ( $\text{Cu}^{2+}$ ). En el diagrama se observa las condiciones de pH ( $< 4$ ) y potencial de óxido reducción (superior a  $+0.4\text{ V}$ ) necesarias para la liberación de Cu en solución, tomando en consideración su transformación desde  $\text{CuFeS}_2$ .



**Figura 10.** Diagrama de Pourbaix para el sistema  $\text{CuFeS}_2 - \text{H}_2\text{O}$  a  $25^\circ\text{C}$  (Schlesinger y King, 2011).

Asimismo, la oxidación de calcocita y su consecuente transformación a covelita por la acción oxidante de  $\text{Fe}^{3+}$  se señalan en las reacciones (10) y (11), observando la liberación parcial de  $\text{Cu}^{2+}$  para finalmente también generar como productos de oxidación  $\text{S}^0$  y  $\text{Fe}^{2+}$  que pueden ser subsecuentemente oxidados por distintas bacterias presentes en el medio, generando  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  (reacciones (12) y (13))(Petersen y Dixon 2007; Pradhan et al. 2008; Panda et al. 2015).



Durante la oxidación de los diferentes sulfuros minerales pueden ser generados azufre elemental y otras fases minerales secundarias, interfiriendo en el proceso de biolixiviación al acumularse sobre la superficie mineral y prevenir la consecuente oxidación al evitar la interacción de la superficie con los agentes oxidantes ( $\text{Fe}^{3+}$  y/o  $\text{O}_2$ ) y los microorganismos. En el caso de azufre elemental, este es termodinámicamente estable bajo las condiciones de acidez y temperatura a las que se desarrolla el proceso, por lo que su oxidación bajo condiciones abióticas es muy lenta. Debido a este aspecto puede ocurrir la formación de una capa pasivante sobre las partículas minerales, señalando la importancia de la interacción de microorganismos sulfo oxidantes con la superficie mineral, al acelerar la disolución oxidativa de azufre y evitar la formación de una capa pasivante de este y otros productos de alteración, como poli sulfuros situados sobre la partícula mineral (Córdoba et al., 2008; Vera et al., 2013).

## 2.6 Biolixiviación

La lixiviación asistida por microorganismos se ha establecido como una alternativa para el procesamiento de diferentes fases minerales, aplicada actualmente para la extracción de níquel, zinc, cobalto, uranio y cobre (Vera et al., 2013). En particular, la lixiviación de cobre exhibe una mayor aplicación y desarrollo a nivel industrial, ya que ha representado una adecuada alternativa para la extracción de cobre a partir de depósitos minerales con bajas leyes que contienen tanto sulfuros primarios como secundarios, cuya extracción no es económicamente viable por otras técnicas de procesamiento y concentración de minerales (Pradhan et al., 2008). Lo anterior puede atribuirse a la naturaleza del proceso de biolixiviación, ya que es posible procesar grandes volúmenes de material, se exigen menores capitales de inversión y operación, así como un menor uso de reactivos y sustancias químicas en comparación a otras operaciones. De esta forma, representa una ventaja a nivel económico así como en el ámbito ambiental debido a un menor consumo de energía (Pradhan et al., 2008; Rawlings, 2004).

La biolixiviación de minerales de cobre es desarrollada mediante tres tipos de variantes en base a las características del mineral y su grado de preparación previo a la ejecución del proceso: **Biolixiviación en montones**, **Biolixiviación de residuos minero-metalúrgicos** y **Tanques agitados** (Pradhan et al., 2008; Watling, 2006). A nivel industrial, la lixiviación de sulfuros de cobre se realiza principalmente mediante **Biolixiviación en montones**, mientras que la **biolixiviación de residuos minero-metalúrgicos** representa la extracción de cobre a partir de terreros y jales. Adicionalmente, concentrados minerales de cobre o cuerpos minerales con una alta ley podrían ser procesados mediante tanques agitados. No obstante, este tipo de operación no se presenta a escala industrial actualmente, aplicándose sólo en plantas piloto y diseños para su investigación (Panda et al., 2015).

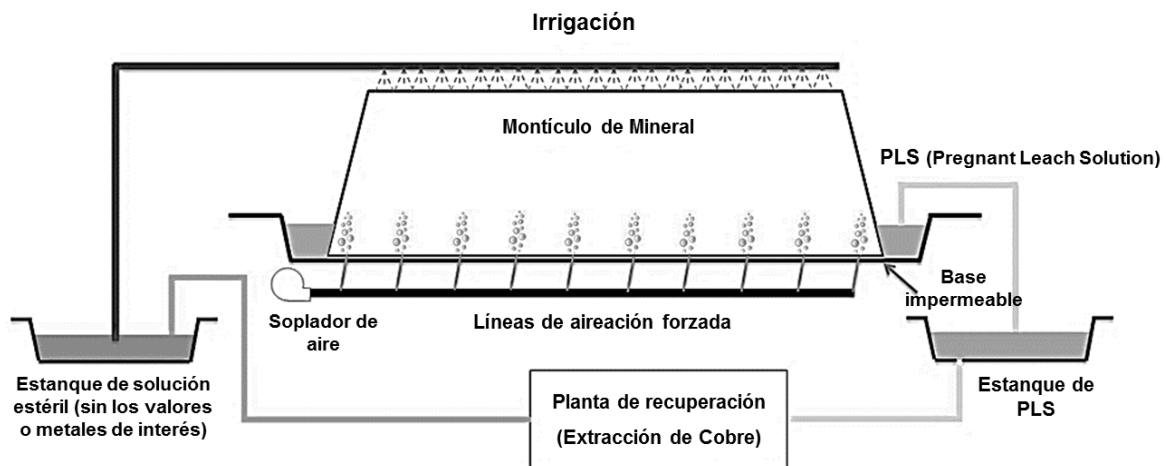
El procesamiento de minerales por biolixiviación en montones y residuos mineros como terreros presenta grandes similitudes. Ambos se realizan bajo condiciones de intemperie mediante la irrigación inicial de una solución ácida de  $H_2SO_4$  diluido, en el cual pueden encontrarse microorganismos previamente cultivados. Posteriormente, la irrigación discontinua del material es mediante la recirculación de refinado. En un primer escenario, mediante la irrigación de  $H_2SO_4$  diluido en el mineral, se busca promover el crecimiento y actividad de microorganismos que se puedan encontrar de forma natural en el mineral. En un segundo escenario, la lixiviación se realiza en base a la manipulación y adición de un consorcio de microorganismos que son irrigados sobre el material mediante una solución ácida similar con un medio nutritivo, la cual los transporta a través del material. El inóculo puede estar integrado por organismos nativos del sitio o por otro tipo de cultivos bacterianos, como cepas de microorganismos previamente incubadas en laboratorio (Watling, 2006).

**La biolixiviación de terreros** o jales, se realiza en el mismo sitio de disposición del material, donde se encuentra conjuntado en forma de taludes, presentando alturas de decenas de metros. Éstos son lixiviados mediante la irrigación de refinado desde la superficie de los taludes, a través de un sistema de tuberías emplazadas sobre estos. La solución se filtra a través del material, transportando los diferentes microorganismos en el talud, propiciando su interacción con las partículas de sulfuros metálicos de interés para el proceso (Petersen y Dixon, 2007). El efluente resultante del talud enriquecido en cobre (en forma de sulfato de cobre), denominada solución preñada, es recolectado para su posterior procesamiento y extracción (Figura 11). Hoy en día, los métodos de extracción por solventes y electrowinning (EW) son empleados para esta fase de la operación (Pradhan et al., 2008; Johnson, 2014).

En comparación, el proceso de **biolixiviación en montones** exhibe una mayor planeación y diseño en busca de la optimización del proceso (Petersen y Dixon, 2007; Panda et al., 2015). El diseño de la operación consiste en el apilamiento y formación de taludes del mineral extraído de la mina sobre una

superficie impermeable que impida la infiltración de solución lixiviante al subsuelo. El mineral a procesar puede ser sometido a una reducción de tamaño de partícula, en busca de mejorar la eficiencia de la lixiviación al maximizar la interacción de la solución lixiviante y los microorganismos con la superficie mineral; presentando tamaños de partícula menores a 1 pulgada (25 mm). La irrigación de los taludes es de la misma forma que el caso de los terreros, contando con un sistema colector de la solución resultante en la base de los taludes. En contraste con la anterior operación, se puede utilizar un sistema de aireación mediante tuberías colocadas en la parte inferior de los taludes, con la finalidad de propiciar la oxigenación del medio y proveer  $\text{CO}_2$  a los microorganismos, en busca de asistir a un mejor desarrollo de estos (Figura 11) (Chiume et al., 2012).

De igual forma, la solución resultante del proceso, enriquecida en cobre, es recolectada y transportada a una estación de recuperación, atravesando por el proceso de extracción señalado en el caso de los terreros (Chiume et al., 2012).

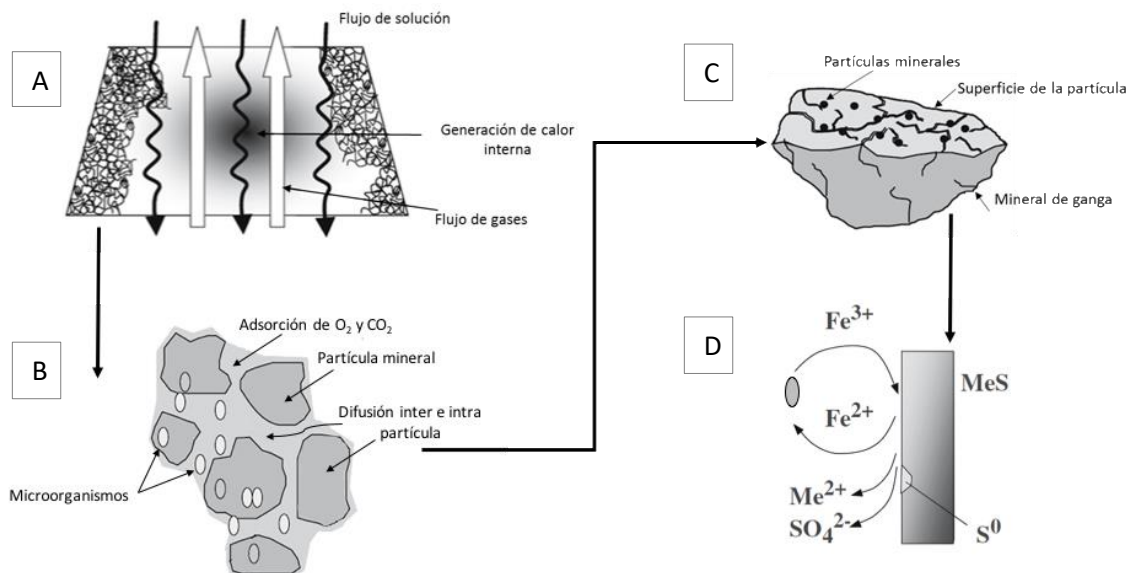


**Figura 11.** Diagrama de una operación de biolixiviación en montones. El mismo esquema ilustra una operación de biolixiviación en terreros, solo sin incluir el sistema de aireación en la base del montículo (Modificado de Petersen, 2016).



## 2.7 Factores que afectan el proceso de biolixiviación

Aunado a los factores de diseño de la operación, el desarrollo y la eficiencia del proceso de biolixiviación se ven influenciados por factores fisicoquímicos, microbiológicos y mineralógicos que guardan una relación entre sí (Petersen y Dixon 2007; Africa et al., 2013; Vera et al., 2013). Petersen y Dixon (2007) señalan distintas escalas en que estos factores y distintos subprocesos se ven involucrados dentro de los taludes de biolixiviación, distinguiendo desde una meso a la micro escala. Se pueden señalar cuatro escalas, donde se identifican varios fenómenos, A) a nivel global de la operación: Flujo de solución lixiviante y gas e incremento de temperatura por reacciones de oxidación de sulfuros; B) a nivel de agregados de partículas: Permeabilidad, difusión inter partícula de la solución lixiviante, adsorción de  $O_2$  y  $CO_2$  en la fase líquida, transporte de microorganismos presentes en estado planctónico y su adhesión a las partículas minerales; C) a nivel de partícula mineral: Tamaño de partícula, difusión intra partícula; y por último, D) a nivel de la superficie mineral: Procesos de oxidación química así como influenciada por microorganismos y formación de fases minerales secundarias (Figura 12).



**Figura 12.** Representación esquemática de los diferentes factores y sub procesos que ocurren y determinan la eficiencia en una operación de biolixiviación de montones o terreros a diferentes escalas: A) terrero de biolixiviación; B) Aglomerado de partículas; C) Partículas individuales; D) Superficie mineral (Modificado de Petersen y Dixon, 2007).

El estudio de la biolixiviación exige el investigar los distintos procesos mencionados para un mayor entendimiento de la operación, lo que permita mejorar el proceso al hacerlo más eficiente e incluso aumentar su viabilidad económica. Aunado a los distintos subprocesos mencionados por Petersen y Dixon, en la tabla 2 se señalan algunos otros parámetros de gran relevancia para la operación.

**Tabla 2.** Factores y parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y mineralógicos de importancia en un proceso de biolixiviación (Pradhan et al., 2008).

<b>Factores</b>	<b>Parámetros afectando la biolixiviación</b>	
<b>Fisicoquímicos</b>	Temperatura	Disponibilidad de nutrientes
	pH	Concentración de Fe(III) y otros componentes en solución lixiviante
	Potencial Redox	Concentración de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>
<b>Microbiológicos</b>	Diversidad microbiana	Distribución espacial de los microorganismos
	Densidad de población	Adhesión a la superficie mineral
	Capacidades metabólicas	Adaptabilidad al medio
<b>Mineralógicos</b>	Composición mineralógica	Porosidad del material
	Procesos de acidificación y neutralización	Formación de minerales secundarios
	Tamaño de partícula y grado de liberación	Conductividad hidráulica

Dentro de estos factores, la composición mineralógica del material a lixiviar es de gran importancia, al determinar las fases de sulfuros metálicos en las cuales se encuentra el metal de interés, conocer su abundancia y que otros sulfuros se presentan. Además, en conjunto con las fases sulfuradas, la presencia de otros minerales carbonatados o silicatos considerados como ganga, determinarán que procesos de generación de acidez o neutralización podrían presentarse, interfiriendo con la lixiviación al afectar la composición química del medio, y por consiguiente las condiciones apropiadas para el desarrollo de los microorganismos. Es de esta forma que los microorganismos presentes en los taludes, así como su distribución en este, encuentran una relación con las características fisicoquímicas

del medio, la clase de minerales presentes, y la heterogeneidad de las partículas minerales a través del talud, tanto en su composición como en dimensiones (Panda et al., 2015). Finalmente, una operación de biolixiviación también se ve afectada por la aireación recibida, la periodicidad de irrigación y las condiciones del sitio donde se ejecuta; siendo importante considerar el régimen de lluvia, tasas de evaporación y precipitación (Pradhan et al., 2008).

## **2.8 Adhesión de microorganismos a la superficie mineral**

Los procesos de oxidación y transformación de la superficie mineral se ven influenciados por la composición química de la solución lixivante, debido a la acción de los diferentes tipos de microorganismos que actúan en el proceso y las propias características mineralógicas. Con base en el mecanismo de biolixiviación por contacto, la adhesión microbiana a la superficie mineral es considerada de gran importancia para el proceso de lixiviación. Esta interacción en un principio física, en la cual las células bacterianas entran en contacto con la superficie mineral, conlleva a la creación de un espacio reactivo compuesto de EPS, donde la oxidación mineral ocurre. Este tipo de interacción es considerada de gran importancia, ya que es asociada a un aumento en las velocidades de oxidación de sulfuros y liberación de metales durante la biolixiviación, lo cual es observado al presentarse un mayor porcentaje de adhesión de los microorganismos presentes en el medio a la superficie mineral (Rodríguez et al., 2003; Tao y Dongwei, 2014). El proceso de adhesión de los microorganismos a las partículas minerales es influenciado por distintos factores, la carga superficial que presentan, la generación de sustancias extracelulares poliméricas (EPS), así como características mineralógicas y morfológicas de las fases minerales en cuestión (Africa et al., 2013). En un principio, la interacción entre bacterias y partículas de sulfuros metálicos puede ser atribuida a interacciones electrostáticas, así como condiciones de hidrofobicidad de sus superficies. Una vez sobre la superficie mineral, la producción de EPS por los microorganismos propiciará una adhesión más fuerte sobre esta (Vera et al., 2013).

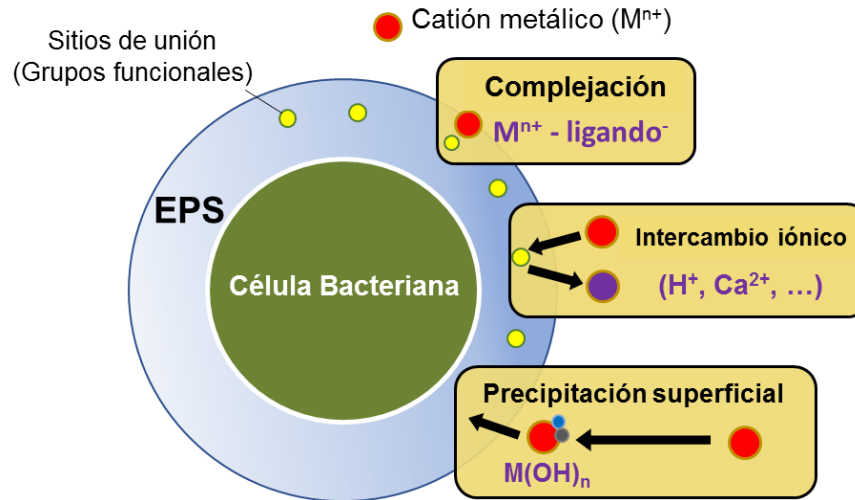
La adhesión de los microorganismos sobre la superficie de sulfuros metálicos y su distribución sobre ella han sido asociadas a la presencia de imperfecciones topográficas y a la estructura cristalina de la fase mineral. En el caso de pirita, diferentes estudios a nivel laboratorio, han demostrado una adhesión preferente de *A. ferrooxidans* en bordes, fisuras o grietas de las partículas (Edwards et al. 1998; Edwards et al. 2000). De la misma manera, se reporta una adhesión preferente a aquellas zonas con un menor grado de cristalinidad o amorfas (Sanhueza et al., 1999); así como registrando una orientación sobre la partícula acorde a los diferentes ejes cristalográficos (Rojas-Chapana y Tributsch, 2004). En estos mismos estudios se ha señalado la alteración física de las partículas minerales, en la que debido a los procesos de oxidación se presenta desarrollo de clivaje por la ruptura de planos cristalinos de las partículas minerales.

En los siguientes apartados se complementa la información acerca de la interacción bacteriana con la superficie mineral con respecto a la generación de EPS y la consecuente formación de colonias microbianas y el desarrollo de biopelícula.

### **2.8.1 Sustancias Extracelulares Poliméricas (EPS)**

Las sustancias extracelulares poliméricas (EPS, por sus siglas en inglés) son sustancias excretadas por los microorganismos que recubren su estructura y que intervienen en el proceso de biolixiviación al mediar la adhesión de la bacteria a la superficie de los minerales (Schippers et al., 2013). La composición química de la capa de EPS se encuentra en función del espécimen que la genera, el sustrato de crecimiento y de las condiciones de temperatura, acidez y composición del medio de crecimiento en el que se encuentren los microorganismos (Gehrke et al., 1998; Tourney y Ngwenya, 2014). De forma general, los EPS se componen de diferentes biomoléculas como proteínas, sustancias húmicas, ácido uránico, ácidos nucleicos, lípidos y glicoproteínas, presentando grupos funcionales carboxílicos, amino, grupos hidroxilo, entre otros (Li y Yu, 2014); la presencia de estos u otros grupos funcionales permite la formación de complejos órgano metálicos con cationes multivalentes en este espacio al incorporarlos en su estructura. Adicionalmente, en la capa de EPS o sobre la célula bacteriana puede ocurrir la precipitación superficial

de diferentes compuestos, lo que representa la potencial formación de nuevas fases minerales en un proceso denominado biomineralización (Figura 13) ( Skinner y Jahren, 2003; Li y Yu, 2014).

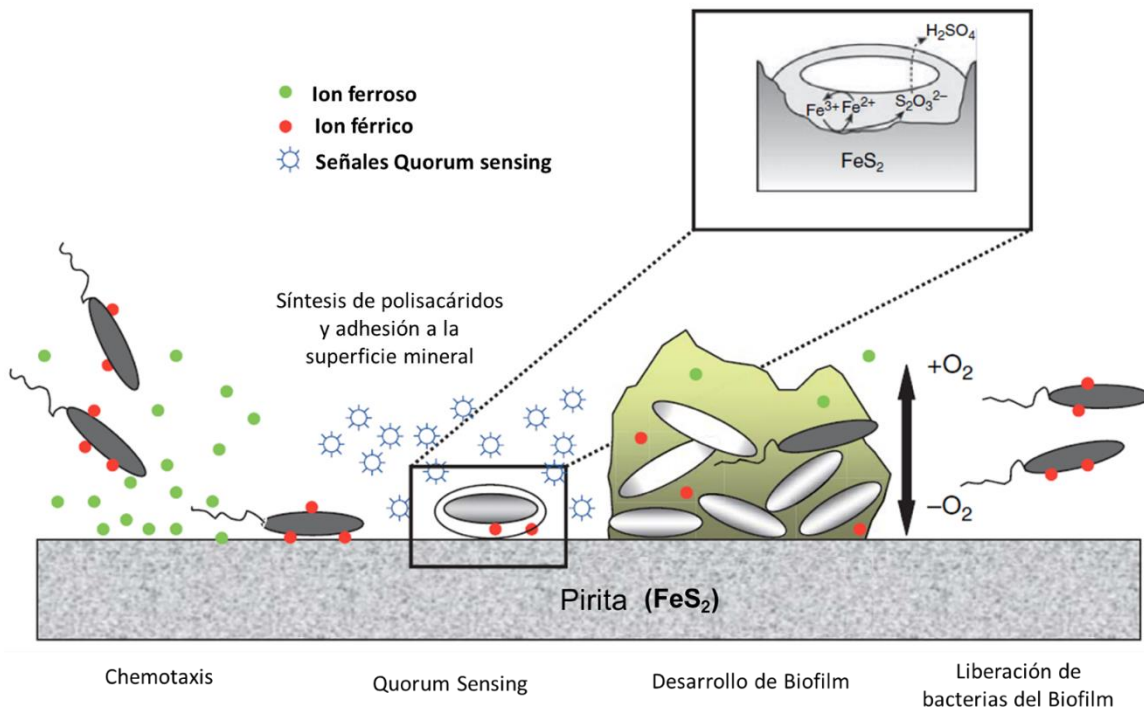


**Figura 13.** Diagrama de la interacción de la capa de EPS producida por los microorganismos con metales presentes en el medio (Modificado de Li y Yu. 2014).

Debido a su composición y características, la capa de EPS representa un espacio reactivo, donde el proceso de oxidación de la superficie mineral ocurre. Al incorporar iones hierro (III) en su estructura, se propicia la formación de complejos con ácido glucorónico, y que al entrar en contacto con el mineral, son los encargados de oxidar su superficie (Sand y Gehrke, 2006). Esta situación es particular para aquellas bacterias ferro oxidantes, donde se ha reportado que la presencia de iones férricos en la capa de exopolímeros, exhibe una mejora en la lixiviación (Kinzler et al., 2003).

## 2.8.2 Desarrollo de Biopelícula

El proceso de adhesión a la superficie mineral, supone una de las primeras etapas en la colonización de la partícula por un mayor número de microorganismos. Tras su acumulación en la superficie, estos llegan a formar comunidades microbianas estructuradas en forma de biofilm o biopelícula, término utilizado para describir a un conjunto de microorganismos que se encuentran incluidos dentro de una matriz compuesta de sustancias extracelulares poliméricas (EPS) producidas por los propios organismos (Flemming y Wingender, 2010; Florian, 2012). El proceso de formación de biopelícula comprende varias etapas; comienza con el transporte de los microorganismos hacia la superficie mineral, generado por la propia movilidad de las bacterias, efecto gravitacional, convección, difusión, o movimiento browniano (Bos et al., 1999). Posteriormente, la adhesión inicial de las células bacterianas ocurre por atracción electrostática e interacciones hidrofóbicas con la superficie mineral. Una vez sobre la superficie, la producción de EPS ayuda a que el microorganismo se adhiera de forma irreversible a esta.



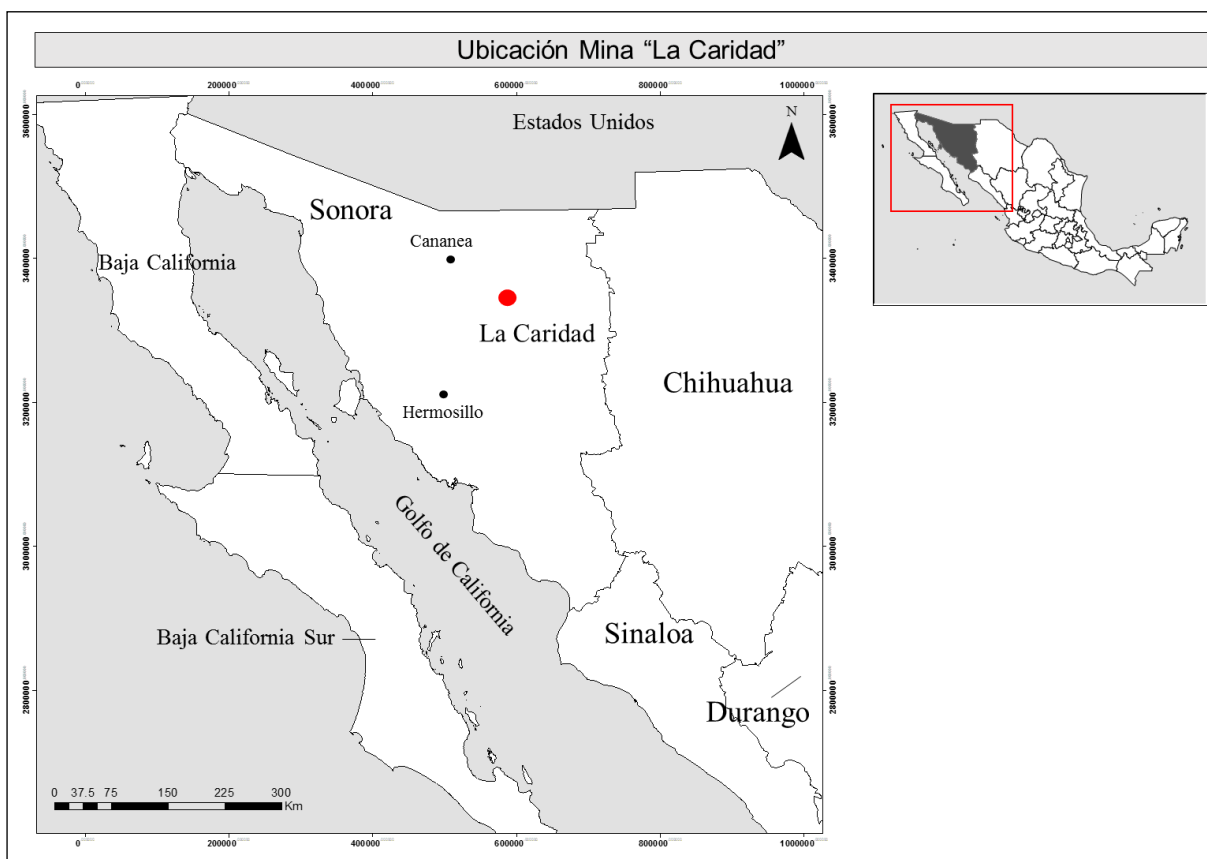
**Figura 14.** Interacción de bacterias con la superficie mineral y el consecuente desarrollo de biopelícula. En este caso se ejemplifican las principales etapas de la interacción de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con Pirita ( $\text{FeS}_2$ ). La amplificación representa la interacción de la bacteria y el proceso de oxidación que se desarrolla al estar envuelta en una capa de polisacáridos (Modificado de Jerez, 2009).

Consecuentemente, un mayor número de bacterias colonizan la superficie, estableciendo micro colonias rodeadas por EPS, formando biopelícula (Figura 14) (Florian, 2012). La composición de la biopelícula consiste principalmente de EPS, representando desde un 50 a un 90% del total de la materia orgánica que la integra (Vu et al., 2009). Debido a su composición, la biopelícula exhibe distintas morfologías, presentándose en forma de filamentos, cuerpos rugosos o porosos, así como en forma de planos con superficies lisas sin rugosidades (Flemming y Wingender, 2010).

En el caso del proceso de biolixiviación, el desarrollo de biopelícula representa un espacio para el crecimiento de los microorganismos, así como un medio por el cual pueden realizar la oxidación mineral debido a su composición y un medio protector de agentes externos y cambios en las condiciones fisicoquímicas del medio, además de permitir su cercanía a los sustratos de crecimiento ( Jerez, 2009; Florian, 2012).

## **2.9 Descripción del sitio y caso de estudio**

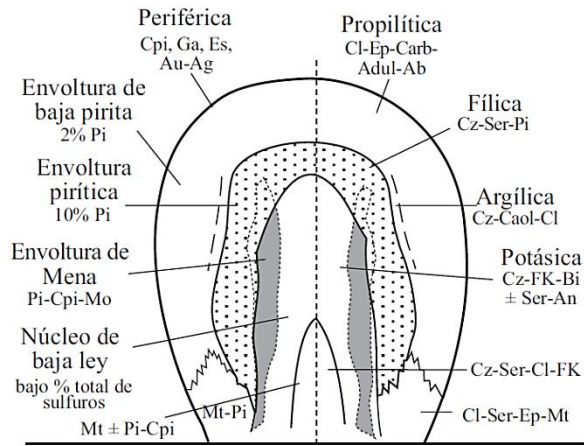
El sitio minero metalúrgico de “La Caridad” se encuentra ubicado al noroeste del estado de Sonora, en el municipio de Nacozari a aproximadamente 100 km de la ciudad de Hermosillo (Figura 15). En “La Caridad”, se encuentra un yacimiento tipo pórfido cuprífero, que presenta una mineralización de Cu-Mo, con leyes de Cu de 0.35 % y 0.03 % de Mo (Grupo México, 2015), además de encontrarse la presencia de otros metales como Zn, Pb, Fe, Au, Ag, W y Sn (Ochoa Landín et al., 2011) La mineralización está asociada a un intrusivo cuarzo-monzonítico de edad comprendida entre 54 y 55 millones de años (Ma). El yacimiento se presenta en rocas ígneas intrusivas félsicas a intermedias, mientras que rocas de diorita y granodiorita alojan el mineral (Valencia et al., 2006). Los pórfidos cupríferos están asociados con regiones distinguidas por la presencia de abundante magmatismo calco-alcalino asociado a márgenes de subducción de tipo andino (Valencia et al., 2006).



**Figura 15.** Ubicación de la mina “La Caridad”, Naco, Sonora.

Este tipo de yacimientos son depósitos de sulfuros de cobre y molibdeno cuya mineralización se presenta en forma diseminada y en vetillas tipo stockwork que se encuentran emplazadas en varios tipos de roca encajonante alteradas por soluciones hidrotermales en patrones regularmente concéntricos (Lowell y Guilbert, 1970). La morfología de este tipo de yacimientos está caracterizada por un zoneamiento vertical y lateral de la alteración y mineralización del depósito, el cual está centrado en un intrusivo de textura porfídica. Las zonas de alteración son de tipo hidrotermales, entre las que se distinguen zonas de alteración potásica, fílica, propilítica y por último una zona de alteración argílica, caracterizadas por las diferentes asociaciones minerales que presentan. En la figura 16 se muestra un modelo morfológico de un yacimiento pórfido cuprífero de acuerdo a lo señalado por Lowell y Guilbert (1970).





**Figura 16.** Modelo de Lowell y Guilbert (1970) para un depósito tipo pórfido de cobre, se señalan las zonas de alteración y mineralización del yacimiento. Adicionalmente se señalan algunas asociaciones minerales presentes. El modelo está basado en el depósito de San Manuel-Kalamazoo, Arizona.

Los pórfidos cupríferos representan la principal fuente de cobre y molibdeno conocida, donde se presentan mayoritariamente fases de sulfuros, así como en menores proporciones sulfosales e incluso elementos nativos como el oro (Ochoa Landín et al., 2011). La principal fase de cobre es la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), se registra una importante presencia de bornita ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ), enargita ( $\text{Cu}_3\text{AsS}_4$ ) y calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ); otros sulfuros como la molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), galena ( $\text{PbS}$ ), esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y pirita ( $\text{FeS}_2$ ), también se encuentran presentes (Berger et al., 2008).

En “La Caridad” el mineral extraído de la mina con ley de cobre por debajo del 0.23% es dispuesto en terreros, que posteriormente son sometidos a un proceso de lixiviación para la extracción del cobre que contienen. La ley de cobre promedio reportada para el mineral lixiviable que se deposita como terreros es de 0.19% (GRUPO MÉXICO, 2015). Este material se somete a un procesamiento de lixiviación por ácido sulfúrico para posteriormente someterse a un proceso de extracción por solventes (EX) y deposición electrolítica (ESDE). Debido a los bajos contenidos de cobre que exhibe el mineral, el procesamiento de los terreros por fundición no es económicamente viable, por lo que se busca la posibilidad de extraer y recuperar el cobre contenido en este material, y es por el método de biolixiviación, el que representa una opción viable por sus características.

En la actualidad el proceso ha comenzado a desarrollarse, el cual consta del manejo, cultivo y la adición de microorganismos a los taludes de terreros mediante una solución ácida que contiene a un consorcio de organismos nativos del sitio y que han sido identificados previamente. La irrigación del material se realiza desde la superficie del talud mediante un sistema de tuberías que transportan y distribuyen la solución, que, tras atravesar el depósito, ésta es recuperada y procesada mediante extracción por solventes (EX) y deposición electrolítica (ESDE).

### 2.9.1 Microorganismos nativos de “La Caridad”

A partir de muestras de terreros de “La Caridad”, como fueron mineral proveniente de la mina, soluciones de cola y agua de mina; previamente a este trabajo de investigación, se realizó la preparación de cultivos bacterianos empleando medio nutritivo para el aislamiento y la subsiguiente tipificación de los microorganismos nativos del sitio. De acuerdo a las pruebas realizadas en el Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología (IPICYT) mediante biología molecular de los diferentes cultivos microbianos, se identificaron los microorganismos señalados en la Tabla 3:

**Tabla 3.** Microorganismos nativos de La Caridad, óptimos rangos de temperatura y pH para su crecimiento y capacidades metabólicas.

<i>Microorganismos</i>	<i>Temperatura óptima de crecimiento</i>	<i>pH óptimo de crecimiento</i>	<i>Capacidades metabólicas</i>	
			Ferro oxidante	Sulfo oxidante
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	45	2 – 2.5		+
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	28 – 30	2 - 3		+
<i>Ferroplasma acidiphilum</i> *	35	1.3 – 2.2	+	
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	30 - 37	1.3 – 1.8	+	
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	30 - 35	<2	+	+
<i>Sulfobacillus sp.</i> *	45 - 50	-	+	+

\*Microorganismos pertenecientes al dominio archaea. Información adquirida de Schippers et al., 2014

Dentro de este consorcio se encuentran organismos sulfo y ferro oxidantes pertenecientes a los dominios Bacteria y Archea. Se identificó a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum*, algunos de los microorganismos más relevantes o representativos del proceso de biolixiviación, de acuerdo a lo reportado por diferentes autores, debido a su importante presencia en este tipo de operaciones (Schippers et al., 2010; Schippers y Sand, 1999). A excepción de *Ferroplasma acidiphilum* y *Sulfobacillus sp.*, que son organismos termófilos moderados, los organismos restantes son considerados mesófilos. Además de las diferencias en óptimas temperaturas de crecimiento, es importante señalar las diferentes capacidades metabólicas que exhiben, que son aspectos a considerar durante el proceso de lixiviación, y que su presencia dentro de los terreros es debida a las fases minerales presentes en el talud y las condiciones del medio en función a la profundidad. La capacidad que exhiben en cuanto a la oxidación de fases de azufre y hierro, pH y temperatura óptimos de crecimiento se señalan en la Tabla 3.

La presencia de un consorcio microbiano supone la interacción entre los organismos que lo conforman, donde las diferentes capacidades de oxidación de compuestos de hierro y azufre incrementarían la eficiencia del proceso. En base a estudios de biolixiviación realizados con cultivos microbianos mixtos, se ha observado una mejora en la extracción y recuperación de cobre a comparación del rendimiento de la lixiviación con un solo tipo de cultivo bacteriano (Akcil et al., 2007). Lo anterior se asocia a la complementación de las distintas capacidades metabólicas de los microorganismos, ya que exhiben un efecto sinérgico en el proceso de biolixiviación al mejorar el grado de disolución de diferentes fases minerales (Rodríguez et al., 2003; Hoque y Philip, 2011); efecto atribuido a la capacidad de oxidación mediante la producción de iones férricos y el remover o evitar la generación de fases minerales secundarias que se formarían sobre la superficie de partículas minerales de interés, lo cual evitaría su interacción con la solución lixivante y los propios microorganismos (Schippers y Sand 1999). Por lo anterior, el estudio de las características mineralógicas de los diferentes depósitos de terreros de la mina “La Caridad” es considerado importante, ya que se pretende

conocer aspectos relevantes para el proceso de biolixiviación, en donde se busca determinar los efectos ejercidos en las fases minerales de sulfuros de cobre debidos a la presencia de los distintos microorganismos y las condiciones de operación de este proceso en particular. De esta forma se pretende aportar información acerca de uno de los aspectos más relevantes en un proceso de biolixiviación, como lo son las características mineralógicas del material a procesar y como es que el proceso de oxidación y disolución de sulfuros se ha desempeñado hasta el momento. Lo anterior afectando directamente al porcentaje de recuperación de cobre en la operación, por lo que la caracterización mineralógica permitirá conocer que fenómenos se están presentando durante el proceso, siendo de utilidad para su mejora.

Aunado a lo anterior, la obtención de muestras minerales de los taludes de terrero, brindara la oportunidad de estudiar de forma *in situ* la interacción física de los microorganismos con las distintas fases de sulfuros metálicos, uno de los factores de importancia en la biolixiviación. Al ser observados bajo condiciones cercanas a las naturales en una operación de grandes dimensiones, en donde su transporte y asociación con la superficie mineral no será influenciada directamente, si no por los propios mecanismos de interacción microbiana (quorum sensing) y su transporte a través de la solución lixivante, que entre otros factores serán los encargados de hacerlos entrar en contacto con las fases minerales de interés dentro de matrices minerales complejas de distintas dimensiones y morfologías.

### **3. Metodología para la caracterización mineralógica de terreros en donde ocurre biolixiviación e interacción de microorganismos.**

#### **3.1 Lugar de realización**

- Mina “La Caridad”, Sonora
- Laboratorio de microscopia electrónica de barrido, Instituto de Metalurgia, Facultad de ingeniería, UASLP.
- Laboratorio de Microbiología, Posgrado en Endodoncia, Facultad de Estomatología, UASLP.

#### **3.2 Muestreo y obtención de muestras minerales**

Con el objetivo de realizar la caracterización mineralógica de los depósitos de terreros, así como observar e identificar la presencia de los microorganismos que han sido inoculados en estos, se realizó un muestreo de tres depósitos de terreros que han sido irrigados durante un año con solución ácida que contiene microorganismos nativos del sitio en un orden de  $3 \times 10^8$  células bacterianas/mL.

La toma de muestra consistió en la obtención de partículas minerales a distintas profundidades de los taludes mediante la barrenación desde su superficie (Figura 17A). La barrenación se llevó a cabo en el centro del talud, en donde se perforó hasta su base y se extrajeron las porciones correspondientes de barreno con fragmentos minerales en intervalos de diez metros de profundidad. De esta forma se obtuvieron aproximadamente 45-50 kg para cada porción por cada nivel o segmento de diez metros; inmediatamente después de ser extraídos se realizó una primera selección de fragmentos minerales que presentaran de forma visible partículas de sulfuros metálicos como pirita o calcopirita. Así, en un principio se seleccionaron de 50 a 60 piezas de distintas dimensiones en cada nivel, de las que posteriormente se efectuó una segunda selección en base a la presencia y abundancia de sulfuros en la superficie de los fragmentos minerales y sus dimensiones (Figura 17B).



**Figura 17.** Muestreo de material que compone terreros de biolixiviación en la mina “La Caridad”, Sonora. A) Barrenación y extracción de las muestras a diferente profundidad; B) Selección de piezas minerales; C) Algunas de las muestras minerales extraídas de los terreros, se observan las diferentes dimensiones que presentan (Fotografías obtenidas por Antonio Aragón y Daniel Pacheco).

Se obtuvieron partículas minerales que presentaran un tamaño adecuado para ser manipuladas en las posteriores etapas de preparación y análisis. De esta forma por cada nivel de profundidad se eligieron de 2 a 4 partículas entre 0.5 a 3 centímetros de tamaño para su posible procesamiento (Figura 17C). El objetivo de estudiar las muestras minerales directamente extraídas de los terreros fue caracterizarlas en su estado original, sin provocar alteraciones morfológicas de las partículas minerales, y de esta manera observar las características y alteraciones mineralógicas que ocurren in situ, y relacionarlo con las posibles interacciones que los microorganismos mantienen sobre la superficie de los diferentes minerales que las integran.

Siguiendo este procedimiento se obtuvieron muestras de tres taludes de terrero, identificados como los terreros T-1320, T-1440 y T-1545, en donde cada uno presenta distintas dimensiones. El depósito T-1320 presenta una altura de 80 m, mientras que el terrero T-1440 una altura de 50 m y el T-1545 una altura de 60 m. Se analizaron un total de 19 niveles de profundidad, examinando dos muestras minerales de cada nivel para un total de 38 muestras, las cuales corresponden a

diferentes profundidades en los terreros. Los terreros en donde se realizaron los barrenos y los niveles a examinar en cada uno de ellos se indican en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Terreros donde ocurre biolixiviación, clave de identificación y división de niveles de profundidad evaluados desde su superficie.

<b>Terreros de Biolixiviación</b>			
	<b>T – 1320</b>	<b>T – 1440</b>	<b>T – 1545</b>
<b>Nivel de profundidad</b>	0 – 10 m	0 – 10 m	0 – 10 m
	10 – 20 m	10 – 20 m	10 – 20 m
	20 – 30 m	20 – 30 m	20 – 30 m
	30 – 40 m	30 – 40 m	30 – 40 m
	40 – 50 m	40 – 50 m	40 – 50 m
	50 – 60 m		50 – 60 m
	60 – 70 m		
	70 – 80 m		

Aunado a la toma de muestras de los terreros se obtuvieron muestras minerales de pruebas a nivel laboratorio, en donde mediante experimentación en columnas se realizaron pruebas de biolixiviación con material proveniente del terrero T – 1440. Lo anterior tuvo como finalidad realizar una comparación entre los posibles cambios mineralógicos e interacción de los microorganismos con las fases minerales bajo un medio controlado, en donde se inoculan los mismos microorganismos presentes en los terreros.

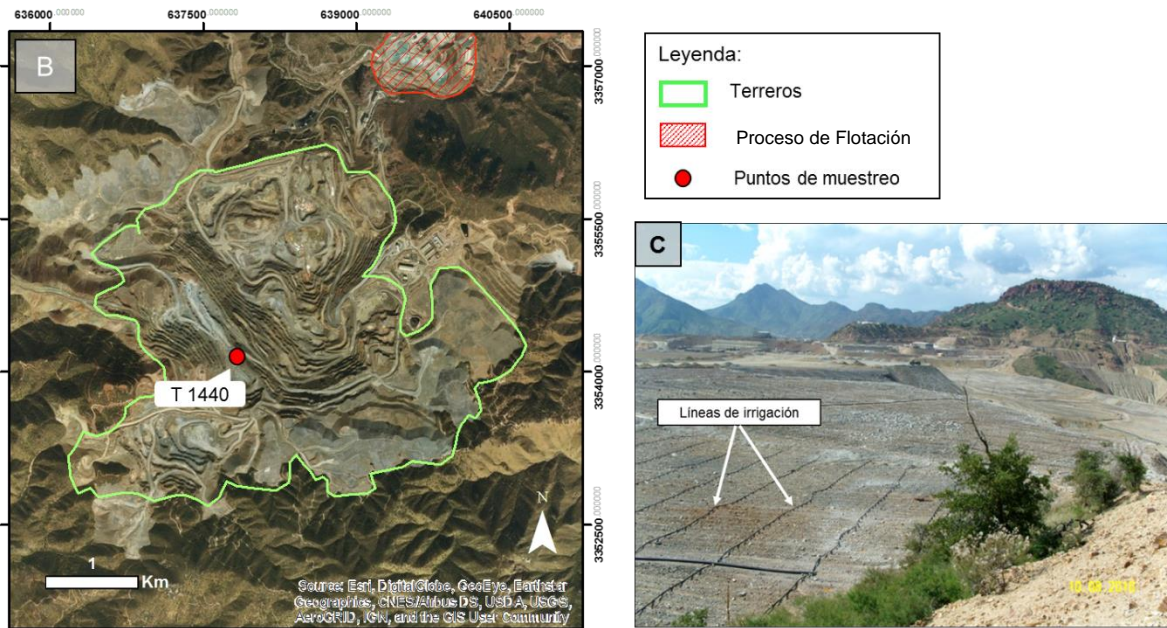
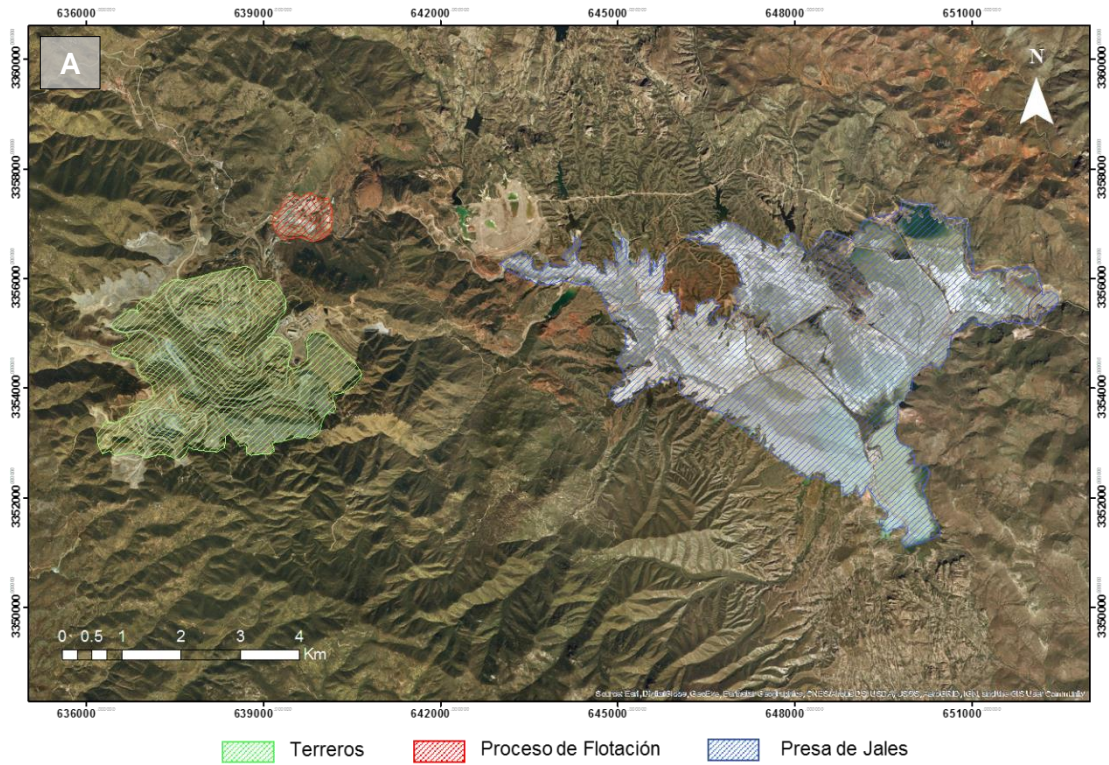
La experimentación se realizó en las instalaciones del laboratorio químico de La Caridad, en donde fueron montadas tres columnas de biolixiviación de 3 m de altura por 6” de diámetro; conformadas por fragmentos minerales menores a 1.5” obtenidos en el centro del talud del terrero antes mencionado (T-1440). La lixiviación del material se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 90 días mediante la irrigación de distintas soluciones (flujo 5.5 ml/min) en la cual se encuentran microorganismos sulfo y ferros oxidantes previamente identificados.

Las columnas 1 y 2 fueron irrigadas mediante la solución generada tras la etapa de cultivo de los microorganismos nativos de la caridad en un biorreactor de

200 L de capacidad, en el que cual los microorganismos se encontraron en contacto con 10 Kg de mineral (< 1/8") del terrero 1410 durante 61 días; por otra parte, la columna 4 fue irrigada mediante solución de colas, la misma solución de riego utilizada para los terreros. En base a la información proporcionada por la empresa para la etapa previa de biolixiviación en columna, los parámetros fisicoquímicos de la solución resultante del biorreactor, así como el número de organismos se señalan a continuación: encontrando una concentración del orden  $3 \times 10^8$  microorganismos/ml, mientras que esta solución presento en promedio un Ph de 1.8, potencial redox de 590 mV y una concentración de ion férrico de 0.633 g/L. Los mismos parámetros para la solución de colas no pudieron ser adquiridos, siendo la concentración de células bacterianas en un orden de  $10^6 - 10^8$  microorganismos/ml, la información obtenida para este caso. No obstante, debido a que la solución se encontraría interactuando con el mismo tipo de mineral podrían señalarse parámetros similares a aquellos determinados para el biorreactor.

Tras su lixiviación, el mineral contenido en la columna fue removido siendo recolectado en intervalos de un metro. Tras su separación en tres secciones, se prosiguió a obtener muestras para la sección media y final, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de los terreros; obteniendo para este trabajo dos muestras minerales para cada nivel mencionado de las columnas de biolixiviación, examinando un total de 12 muestras.





**Figura 18.** Terreros de biolixiviación de La Caridad. A) Ubicación de las operaciones. B) Terreros de biolixiviación y ubicación de puntos de muestreo. C) Lineas de irrigación sobre terreros.

### **3.3 Preparación física de muestras minerales y biológicas**

Tras la obtención y selección de las diferentes muestras minerales de terreros y columnas de biolixiviación, se realizó en campo su lavado con solución buffer (fosfato 0.1 M) para estabilizar el pH de las muestras. Posteriormente se transportaron al laboratorio de Análisis Químico de la planta “La Caridad” donde se realizó parte de su preparación al efectuar la fijación y deshidratación de los microorganismos potencialmente presentes en cada muestra; los detalles de estas etapas del proceso de preparación se indicarán paso a paso en las siguientes secciones. Como parte de este trabajo de investigación se empleó la Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) para realizar la caracterización mineralógica de las muestras, así como observar e identificar la presencia de microorganismos en contacto con la superficie mineral de los terreros. El estudio de muestras de origen biológico por esta técnica requiere una preparación que contemple la preservación de la estructura del espécimen lo más cercano a las condiciones *in vivo*/naturales.

#### **3.3.1 Fijación de microorganismos sobre muestras minerales**

El objetivo del proceso de fijación de los microorganismos consistió en detener su proceso de degeneración una vez que estos y las muestras minerales habían sido extraídas del terrero. Tras obtener las muestras correspondientes a cada nivel de profundidad, se trasladaron inmediatamente después al laboratorio químico de “La Caridad” para realizar el procedimiento de fijación. Se buscó preservar sus características estructurales y bioquímicas mediante el uso de agentes químicos, en este caso glutaraldehído y azul de alcian ( $C_{56}H_{68}Cl_4CuN_{16}S$ ). La función del glutaraldehído es la formación de enlaces covalentes entre las proteínas de las células de los microorganismos, evitando así que pierdan su estructura original. En el caso del azul de alcian, fue utilizado para asegurar una mejor preservación de la estructura de sustancias extracelulares poliméricas. Cada uno de los fragmentos minerales previamente elegidos fue colocado en 2 ml de una solución de glutaraldehído al 2% (SIGMA- ALDRICH grado I al 25 %) preparado para microscopía electrónica y colorante azul de alcian al 1% (SIGMA – ALDRICH)

a un pH 2.5. Una vez en contacto con dicha solución, las muestras permanecieron en un recipiente sellado durante un periodo de 24 horas a 4°C, permitiendo que la solución se difunda a través de la estructura de los microorganismos y el proceso de enlace entre proteínas de las células se lleve a cabo.

### **3.3.2 Deshidratación**

El análisis por microscopia electrónica de barrido requiere que las muestras de estudio no presenten contenido de humedad, por lo que el contenido de agua y fluidos orgánicos fue removido de los fragmentos minerales y de los microorganismos potencialmente adheridos a estos. Esta etapa del proceso de preparación consiste en remplazar el contenido de agua y fluidos orgánicos de los especímenes microbianos mediante la infiltración de un solvente, procedimiento que se conoce como deshidratación. Para llevar a cabo la deshidratación de los organismos bacterianos que se encuentren sobre la superficie de las muestras minerales, estas fueron sumergidas en un baño de alcoholes de concentración ascendente. En este caso, cada muestra fue sumergida durante un periodo de 10 a 20 minutos en seis soluciones de etanol de diferentes concentraciones, comenzando con una concentración de 20%, aumentando gradualmente hasta alcanzar un 100% de etanol. La concentración de las soluciones de etanol ascendentes utilizadas, así como el tiempo que las muestras permanecieron sumergidas en cada una se señalan a continuación:

1. 20% Etanol por 10 min.
2. 40% Etanol por 20 min.
3. 60% Etanol por 20 min.
4. 80% Etanol por 20 min.
5. 90% Etanol por 20 min.
6. 100% Etanol, 3 × 20 min.

Tras terminar el proceso de deshidratación cada muestra fue extraída de la solución de etanol y fue colocada en envase de polietileno, siendo trasladadas al laboratorio de microbiología, bioquímica y patología de la Facultad de Estomatología de la UASLP, donde continuó su preparación para aplicar el punto crítico de secado; y finalmente al Instituto de Metalurgia donde se llevó a cabo su posterior análisis y observación mediante diferentes técnicas.

### 3.3.3 Punto crítico de secado

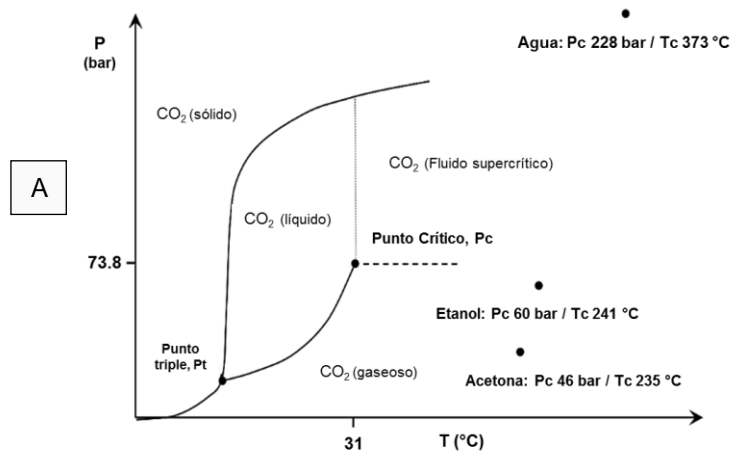
Posterior a su deshidratación, las muestras de los diferentes niveles de terreros fueron sometidas a un secado final aplicando el procedimiento de punto crítico de secado, que permitió preservar la estructura tridimensional de los organismos bacterianos y evitar que colapsara o se deformara. El **punto crítico de secado** consiste en la remoción de agua y fluidos orgánicos contenidos en la estructura bacteriana mediante un solvente que permita su desplazamiento fuera del espécimen y así reducir la tensión superficial que de otra forma se generaría en las paredes celulares del microorganismo por el abandono de los fluidos al evaporarse, generando el colapso de su estructura (Kashi et al., 2014).

Esta técnica está basada en el uso de dióxido de carbono líquido ( $\text{CO}_2$ ) para el desplazamiento de los fluidos contenidos en los organismos, lo cual es posible debido a la temperatura y presión crítica que exhibe ( $31^\circ\text{C}$  y  $73.8$  bar), menores a aquellas condiciones presentadas por el agua ( $375^\circ\text{C}$  y  $228$  bar) u otro tipo de solventes como el etanol ( $241^\circ\text{C}$  y  $60$  bar) (Figura 18); lo anterior convierte al  $\text{CO}_2$  en una muy adecuada opción para no causar daños en los microorganismos debido a la temperatura y presión crítica que son relativamente fáciles de alcanzar para que el espécimen se despoje de este sin problemas (Echlin, 2009).

El procedimiento de punto crítico de secado consistió en colocar las muestras ya deshidratadas en las correspondientes cápsulas de la cámara de un equipo Leica EM CPD030 (Figura 19) que es llenada con  $\text{CO}_2$  líquido, el cual reemplazará gradualmente al etanol dentro de las bacterias al ser sometidas a un baño por varios “recambios”, que consisten en el llenado de la cámara en varias ocasiones con  $\text{CO}_2$

líquido, mientras son sometidas a agitación; posteriormente la cámara es drenada, liberando CO<sub>2</sub> y etanol desplazado del interior de los microorganismos. Este proceso es repetido en varias ocasiones en diferentes intervalos de tiempo, cumpliendo cuatro ciclos de agitación por diez minutos y tres más de cinco minutos de duración.

Posteriormente, la cámara es calentada hasta que se alcance la temperatura crítica del dióxido de carbono, que ahora se encuentra dentro de los microorganismos. Tras alcanzar el punto crítico la temperatura es mantenida arriba de 31 °C hasta que la presión se reduzca a una atmósfera tras escapar el CO<sub>2</sub> gaseoso de la cámara. La presión y temperatura dentro de la cámara fueron monitoreadas durante todo el proceso mediante los indicadores incluidos en el equipo. Tras finalizar el proceso, las muestras se encuentran listas para su posterior montaje, preparación y observación por MEB.

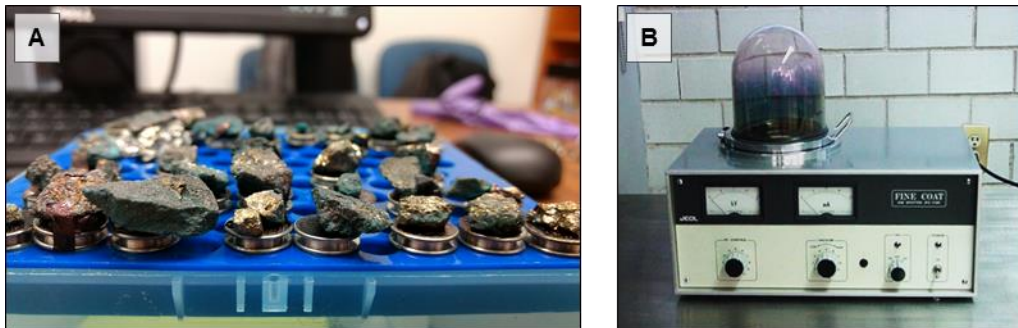


**Figura 19.** A) Diagrama de fase de CO<sub>2</sub> B) Equipo Leica EM CPD030 para realizar punto crítico de secado.



### 3.3.4 Recubrimiento y montaje de muestras

Con el propósito de no alterar la morfología y las condiciones originales de la muestra mineral y microorganismos que pueden encontrarse sobre esta, su preparación para observación y análisis por MEB se realizó mediante montaje directo. Cada muestra fue colocada sobre un porta muestras de aluminio que cuenta con un disco de carbón adhesivo de doble cara en su superficie, el cual es conductor. La observación de especímenes biológicos por MEB requiere que presenten condiciones de conductividad, al igual que las muestras minerales, por lo que se aplicó un recubrimiento de oro a cada muestra mediante un equipo JEOL JFC-1100 (Figura 20). De esta forma las muestras pueden ser observadas en el microscopio electrónico para obtener imágenes de alta calidad y realizar análisis químicos puntuales de las muestras mediante EDS.



**Figura20.** A) Montaje directo de muestras minerales sobre pines de aluminio y B) Recubridora de oro JEOL JFC-1100.

### 3.4 Caracterización por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

La caracterización de cada una de las muestras minerales de “La Caridad” se llevó a cabo mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB), permitiendo identificar la presencia de microorganismos en muestras de taludes de terreros e identificar las fases minerales de interés, en este caso siendo sulfuros de cobre; además, se identificaron otros sulfuros metálicos, fases minerales secundarias y mineral de ganga. El estudiar las muestras con un tratamiento previo, como el de fijación, deshidratación y punto crítico de secado de los microorganismos permite visualizarlos al estar en contacto con la superficie mineral en las muestras, observando su interacción original, es decir, de forma *in situ*, con la superficie de diferentes sulfuros de cobre y otros sulfuros metálicos, así como determinar la morfología de los microorganismos, tipo de convivencia entre ellos y desarrollo biopelícula. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca Phillips modelo XL30 y otra marca Jeol modelo JSM-6610LV (Figura 21) haciendo uso de electrones secundarios (SE) y retro dispersados (BSE).



**Figura 21.** Microscopio electrónico de barrido Jeol modelo JSM-6610LV y Phillips modelo XL30 (no mostrado este último).

Cada una de las muestras fue examinada mediante electrones secundarios (SE) y retro dispersados (BSE). En un principio se realizó una caracterización general de cada muestra, para identificar las diferentes fases minerales que las componen mediante electrones retro dispersados (BSE) y el uso de un sistema de

microanálisis acoplado de Espectrometría de fluorescencia de rayos X (EDS) de energía dispersiva marca EDAX modelo DX460, con el cual se obtuvieron los análisis químicos puntuales para determinar su composición mineralógica.

De esta manera se examinaron cada una de las muestras minerales de los distintos niveles de profundidad, identificando partículas de sulfuros de cobre, así como pirita y otros sulfuros, además de los potenciales cambios morfológicos y químico-mineralógicos que pueden presentar. En este tipo de fases minerales se examinó su superficie con mayor detalle mediante el modo de electrones secundarios (SE) en busca de microorganismos y biopelícula potencialmente adheridos o en contacto con la superficie mineral. De esta forma, al examinar las diferentes muestras minerales se describen las características y diferencias en cuanto a morfología, composición y cambios mineralógicos que se generan entre aquellas partículas de sulfuros minerales con respecto a la profundidad a la cual fueron obtenidas y la potencial interacción con los microorganismos que se pueden encontrar sobre su superficie.

Debido a que las muestras minerales exhiben bajas leyes de cobre (0.19%), los sulfuros de cobre son relativamente escasos. Esto implica una búsqueda exhaustiva de aquellas fases minerales de interés para el proceso de biolixiviación, en las cuales se pueda observar cambios o alteraciones morfológicas, como desarrollo de clivaje, así como cambios químico-mineralógicos generados por las condiciones del medio lixivante y/o potencialmente generados por los microorganismos.

Las condiciones de operación del microscopio electrónico de barrido para la obtención de imágenes, espectros de rayos X y análisis químico por EDS se encuentran en función del tipo de muestra de estudio, siendo constantemente modificadas para obtener resultados adecuados en cuanto a calidad de imagen y análisis. Ya que se realiza el estudio de especímenes biológicos, se busca no generar un daño a su estructura debido a la agresiva carga de electrones que incide sobre estos, por lo que el uso de un voltaje de aceleración bajo permite visualizar los microorganismos de forma adecuada. Además, debido a sus dimensiones, en busca de observar a gran detalle su morfología y las características de la zona en



donde interactúan con la superficie mineral, el diámetro del haz de electrones que incide sobre la muestra debe ser menor al que comúnmente es utilizado para la caracterización de muestras minerales. Modificar la convergencia del haz de electrones (Spot size) permite realizar lo anterior, consiguiendo visualizar con gran detalle aquellas características morfológicas y topográficas de la superficie mineral. Las condiciones de operación base adecuadas para el estudio de este tipo de muestras se señalan a continuación en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones de operación base utilizadas para microscopia electrónica de barrido

<b>Voltaje de aceleración</b>	<b>Modo</b>	<b>Spot Size</b>	<b>Tipo de Espécimen</b>
<b>5 a 12 kV</b>	SE	1.8 - 3.5 (ó 18 - 35)	Microorganismos y biopelícula
<b>20 kV</b>	BSE	4.6 – 5 (ó 46 - 50)	Partículas minerales

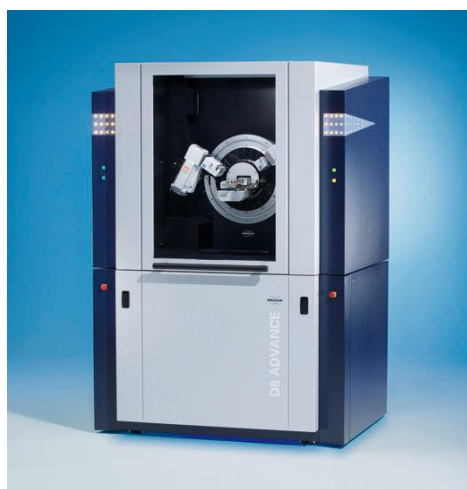
### **3.5 Microanálisis efectuado mediante Espectrometría de energía dispersa (EDS)**

La caracterización mineralógica de cada una de las muestras provenientes de “La Caridad” se realizó mediante Espectrometría de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva de rayos-X marca EDAX modelo DX460 acoplado al microscopio electrónico de barrido (EDS), con el que se obtuvieron los análisis químicos puntuales. Mediante esta técnica se identificaron aquellas fases de sulfuros de cobre de interés para el proceso de biolixiviación, así como otros sulfuros, productos de alteración y material de ganga. De esta manera, también se evaluaron los cambios químico-mineralógicos de sulfuros metálicos, los cuales son generados por interacción con los microorganismos y otro tipo de agentes oxidantes (Fe (III)) presentes en el medio. En cada partícula identificada se realizó un análisis puntual durante 30 segundos de incidencia del haz de electrones. El conteo de rayos X en cada análisis se mantiene entre 1000 y 2000 conteos, obteniendo diferentes

espectros de rayos X e información sobre la composición química de la partícula analizada.

### 3.6 Caracterización mineralógica por Difracción de Rayos X

Con el objetivo de identificar las fases mineralógicas mayoritarias que conforman las muestras minerales de estudio, se llevó a cabo su caracterización por Difracción de Rayos X (DRX) mediante el uso de un Difractómetro marca Bruker modelo D8 ADVANCE (Figura 22). Para el método de difracción de polvos, las muestras minerales fueron molidas a un tamaño de partícula menor a  $44\ \mu\text{m}$  y posteriormente montadas en un porta objeto de vidrio con ranura de aluminio. Usando radiación  $K\alpha$  de Cu, se obtuvieron lecturas entre 2 y 110 grados con una variación de ángulos  $2\theta = 0.02^\circ$ , a un voltaje de 36 kV y corriente 36 mA. La identificación de los patrones de difracción obtenidos se realizó mediante su comparación con las tarjetas de datos cristalográficos de JCPDS de la ICDD (International Centre for Diffraction Data, por sus siglas en inglés) que se encuentran en la base de datos del equipo utilizado. Debido al tipo de preparación que requieren las muestras minerales para el análisis por DRX, esta fue la última etapa de la caracterización, es decir, después de haber examinado cada muestra por MEB en busca de microorganismos y realizar su caracterización por EDS.



**Figura 22.** Difractómetro de Rayos-X marca Bruker modelo D8 ADVANCE.

## **4. Resultados**

### **4.1. Caracterización mineralógica de terreros y columnas de biolixiviación**

Se analizaron diferentes niveles de profundidad de tres terreros donde ocurre biolixiviación, así como el mismo número de columnas de biolixiviación a nivel laboratorio. De esta forma se pretende identificar la composición mineralógica de este material e identificar aquellas fases minerales de mayor interés para el proceso, como la calcopirita; y determinar qué cambios químico-mineralógicos, así como físicos o morfológicos han ocurrido tras la aplicación de la biolixiviación para la extracción de cobre en las diferentes fases minerales encontradas.

Todas las muestras fueron montadas de manera directa en pines de aluminio y posteriormente fueron recubiertas por oro para ser analizadas mediante MEB-EDS. Los resultados de la caracterización mineralógica se presentan con respecto al origen de las muestras analizadas, siendo importante señalar que el estudio por MEB-EDS de las muestras minerales de terreros y columnas de biolixiviación se enfocó principalmente en la caracterización química de las fases de sulfuros metálicos, y aunque debido a la heterogeneidad no se realizaron conteos de partículas para cuantificar la distribución porcentual de las especies de sulfuros u otras fases minerales identificadas, en los siguientes apartados se consideraran las más representativas y/o abundantes debido a que fueron observadas con mayor frecuencia. De forma complementaria, la identificación de las fases minerales mayoritarias que componen los terreros y columnas se llevó a cabo mediante Difracción de Rayos X (DRX), lo que permitiría complementar la información obtenida durante su caracterización por MEB-EDS.

### **4.1.1 Terreros de Biolixiviación**

Las características mineralógicas de un sistema en donde se encuentren microorganismos impactará en su metabolismo; y de igual forma, los microorganismos efectuarán cambios en la mineralogía del sistema (Kemner et al., 2005). De esta forma se pretende caracterizar este tipo de cambios potencialmente atribuidos a la acción microbiana y a las condiciones de la operación, presentado en las siguientes figuras las diferentes fotomicrografías y espectros de los análisis químicos puntuales por EDS obtenidos de las diferentes fases minerales identificadas a través de los niveles de profundidad en los terreros, señalando las características morfológicas y químico mineralógicas exhibidas, para posteriormente describir y complementar la información de esta caracterización con aquellas partículas que durante su análisis fueron encontradas en contacto con los microorganismos del medio. Los resultados se presentan de acuerdo a su origen comenzando por los terreros de biolixiviación, 1320, 1440 y 1545, mientras que los resultados de las columnas de biolixiviación prosiguen a estos.

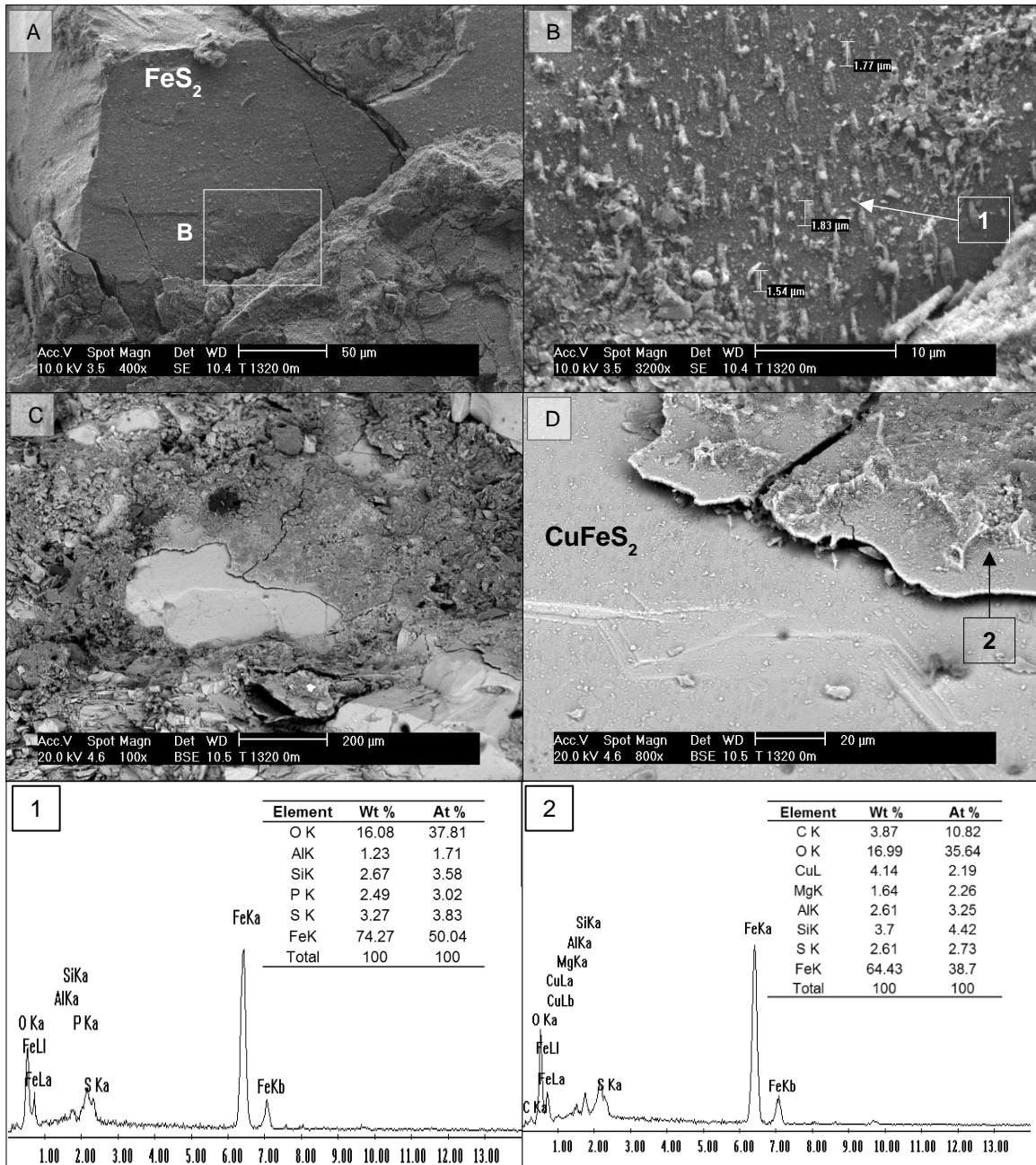
#### **4.1.1.1 Terrero 1320**

El proceso de biolixiviación es aplicado principalmente para la extracción de cobre a partir de cuerpos minerales de baja ley ( $< 1\% \text{ Cu}$ ) que contienen sulfuros primarios ( $\text{CuFeS}_2$ ) y secundarios ( $\text{Cu}_2\text{S}$  y  $\text{CuS}$ ), así como un amplio número de fases minerales que constituyen aquellas sin valor económico (ganga). Una de las principales fases que se identificaron en el terrero fue la pirita ( $\text{FeS}_2$ ), seguida de la calcopirita y otros sulfuros de cobre como la calcocita y la covelita que atravesaron distintos procesos de oxidación química, encontrando diferencias texturales a través del terrero, así como morfológicas y químico mineralógicas. A continuación, se describen los hallazgos más importantes en cuanto a la composición mineralógica del material que compone los terreros.

Uno de los principales indicadores en el proceso de biolixiviación de sulfuros como la pirita es el distintivo desarrollo de clivaje y algunos otros defectos o alteraciones morfológicas en la superficie, los cuales han sido asociados a las condiciones de acidez del medio en las operaciones de biolixiviación o incluso con

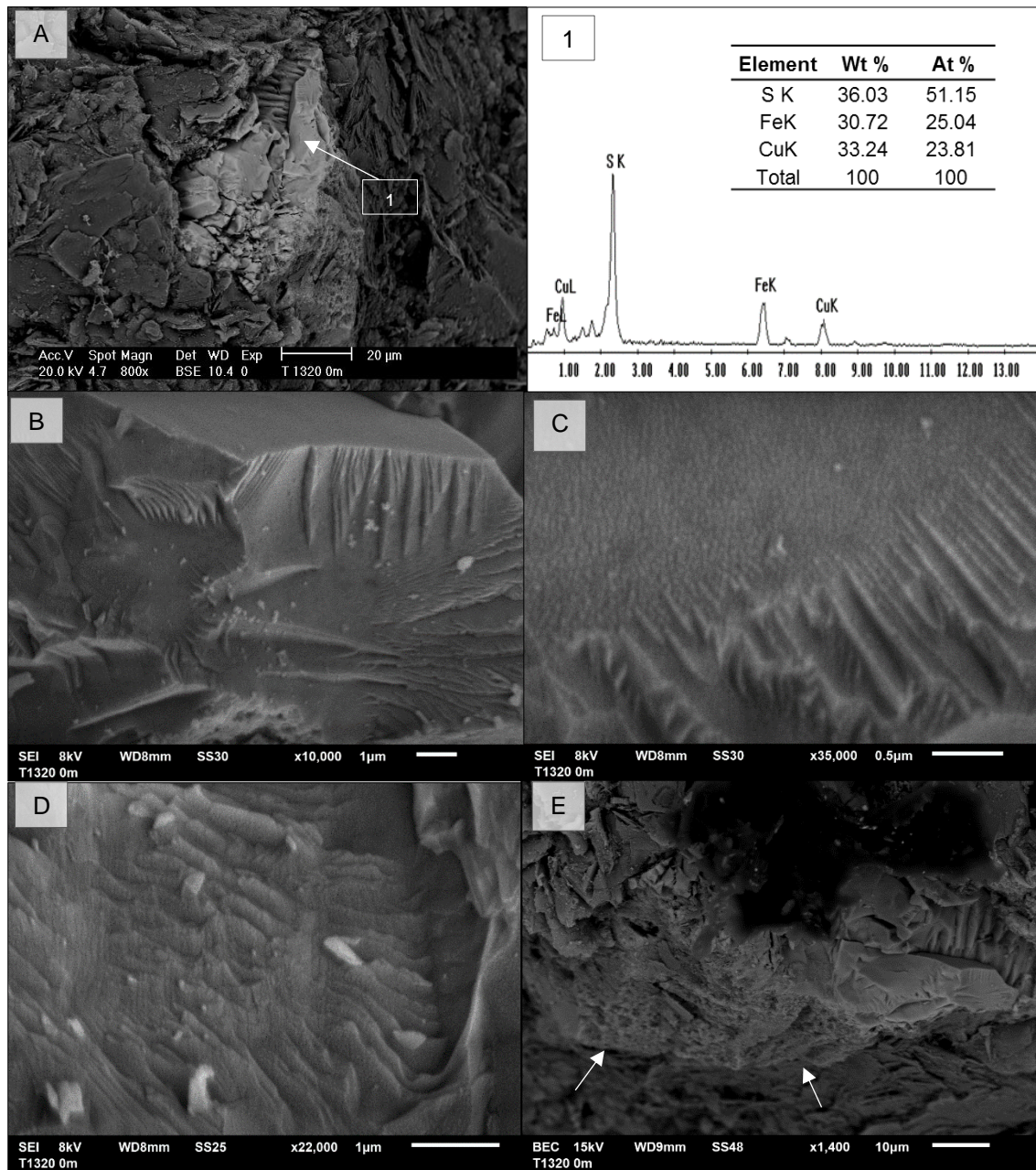
la acción directa de los microorganismos en su superficie, por lo que además de lo ocurrido con los sulfuros de cobre, es de interés para este estudio observar lo ocurrido con la pirita. No en todas las partículas de pirita se presentó un amplio desarrollo de clivaje, encontrando superficies regulares y continuas que al explorar distintas profundidades de los terreros desplegaron diversos cambios.

Un menor grado de alteración morfológica o textural de la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) con respecto a los siguientes niveles, se presentó en el primer nivel de profundidad 0-10m, ya que no se observó un avanzado desarrollo de clivaje y solamente se encontró de forma localizada la alteración química de su superficie. Las figuras 23A y 23B muestran una de las partículas sobre la que se encuentran distribuidos diversas fases secundarias en donde se identificó la presencia de Fe-S-O, así como Al, Si y P en base al análisis EDS, siendo así señalándolos como posibles fases de oxi-hidroxisulfatos de Fe (III) de morfología variable. La superficie de pirita alterada morfológica y químicamente presenta precipitados tubulares compactos de dimensiones similares ( $1.73 \mu\text{m}$  en promedio) alineados unidireccionalmente; así como precipitados laminares que confluyen en ciertos puntos con los anteriores y que tal parece mantienen cierto grado de porosidad en las formaciones de mayor tamaño (Figura 23B). De forma cercana a este punto, sobre calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) también se origina la formación de fases secundarias que recubren con mayor uniformidad una gran extensión de su superficie y cuya composición asemeja a la de la jarosita [ $\text{KFe}_3^{3+}(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ] (Figura 23C, espectro 23.2). En la figura 23D, se distinguen ambas fases minerales, encontrando la calcopirita sin alterar químicamente por debajo de la capa de oxidación, alcanzando a percibir ciertas líneas de clivaje en su superficie solamente; mientras que la capa de jarosita sobrepuesta mantiene una estructura sólida, por la que debajo parece encontrarse diferentes fragmentos minerales diseminados. Además, la fotomicrografía nos permite detectar una línea de fractura en la jarosita y la manera en que incluso sobre esta, parece depositarse otra fase mineral ya que su textura y relieve es distinta cerca a los bordes.



**Figura 23.** Oxidación localizada de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y formación de capa de oxidación sobre calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 0 -10 m del terrero 1320. A) Partícula de pirita donde se presentan productos de alteración en su superficie. B) Localización de precipitados de hidroxisulfatos de Fe (III) de morfología tubular compacta y laminares porosos posicionados sobre una superficie de pirita uniforme. C) Calcopirita recubierta por capa de oxidación cuya composición es similar a la de Jarosita [ $\text{KFe}_3^{3+}(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$ ]. D) Aspecto de la superficie de calcopirita y de jarosita desarrollada sobre esta.

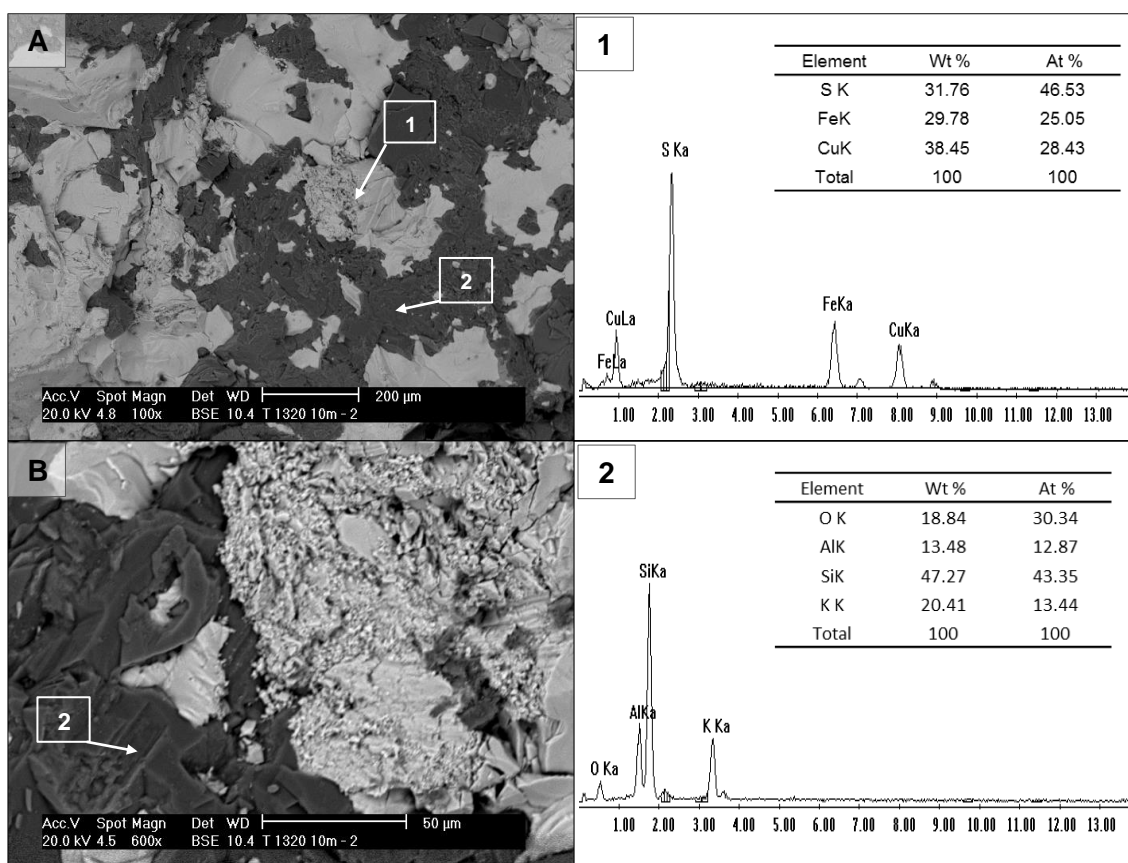
A diferencia de la anterior partícula, en la figura 24 la calcopirita mostró una alteración gradual desarrollando distintos rasgos morfológicos debido a la oxidación de su superficie. Se observan líneas de clivaje características en la parte superior y central de la partícula (Figura 24A), donde la superficie presenta cierto grado de rugosidad debido a la formación de gránulos (Figura 24B, 24C y 24D), mientras que fragmentos laminares diseminados y el desgaste puntual al generarse orificios circulares en la parte inferior de la superficie (Figura E), señalan la potencial acción microbiana debido a que estas características han sido encontradas durante su disolución en medios ácidos con presencia de organismos microbianos (Zhao et al., 2013).



**Figura 24.** Partículas de calcopirita incrustadas en la matriz de silicatos del nivel 0-10m del terrero 1320. A) Calcopirita con un notable desarrollo de clivaje en su superficie, característico de esta fase mineral. B-D) Superficie donde se observan líneas de clivaje y la textura rugosa de la partícula. E) Desgaste puntual en forma de orificios circulares en la parte inferior de la calcopirita (flechas). Ninguna de las partículas presentó cambios químico-mineralógicos asociados a zonas de alteración.



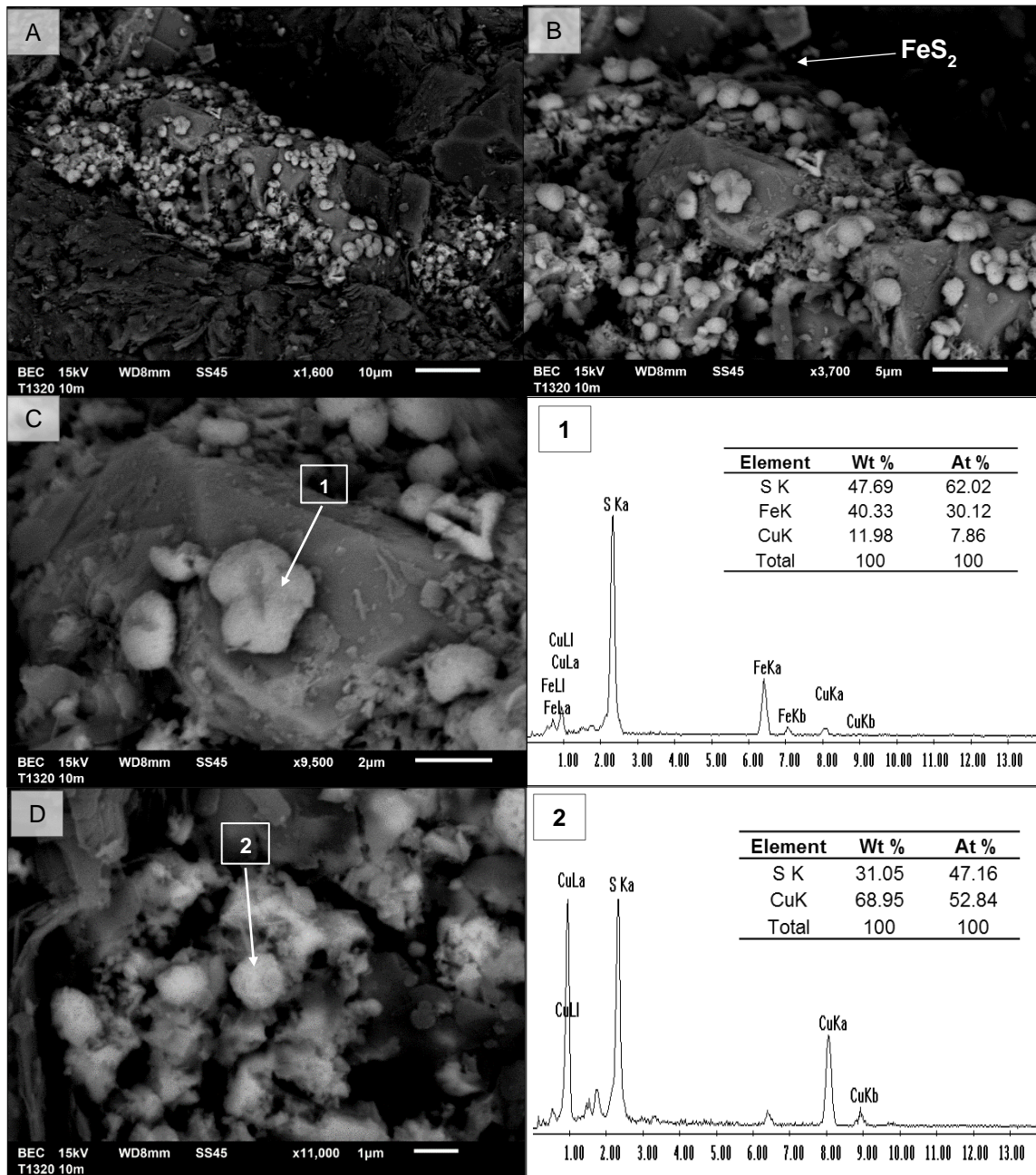
En el nivel 10-20 m del terrero se encontró un mayor número de formaciones de sulfuros de cobre, principalmente calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), en donde los cambios químico-mineralógicos se encontraron asociados a la presencia y colonización de su superficie por diferentes microorganismos bacilares cuyas características se abordarán en la siguiente sección. La distribución característica en este tipo de muestras para calcopirita asociada a la matriz de silicatos se observa en la figura 25A, donde las partículas presentan principalmente superficies regulares con líneas de clivaje características, sin la ocurrencia de microorganismos. En la figura 25B se observa el desgaste o alteración física localizada, donde la calcopirita se encuentra parcialmente diseminada en su superficie sin indicar un cambio en su composición tal y como lo respalda el análisis por EDS.



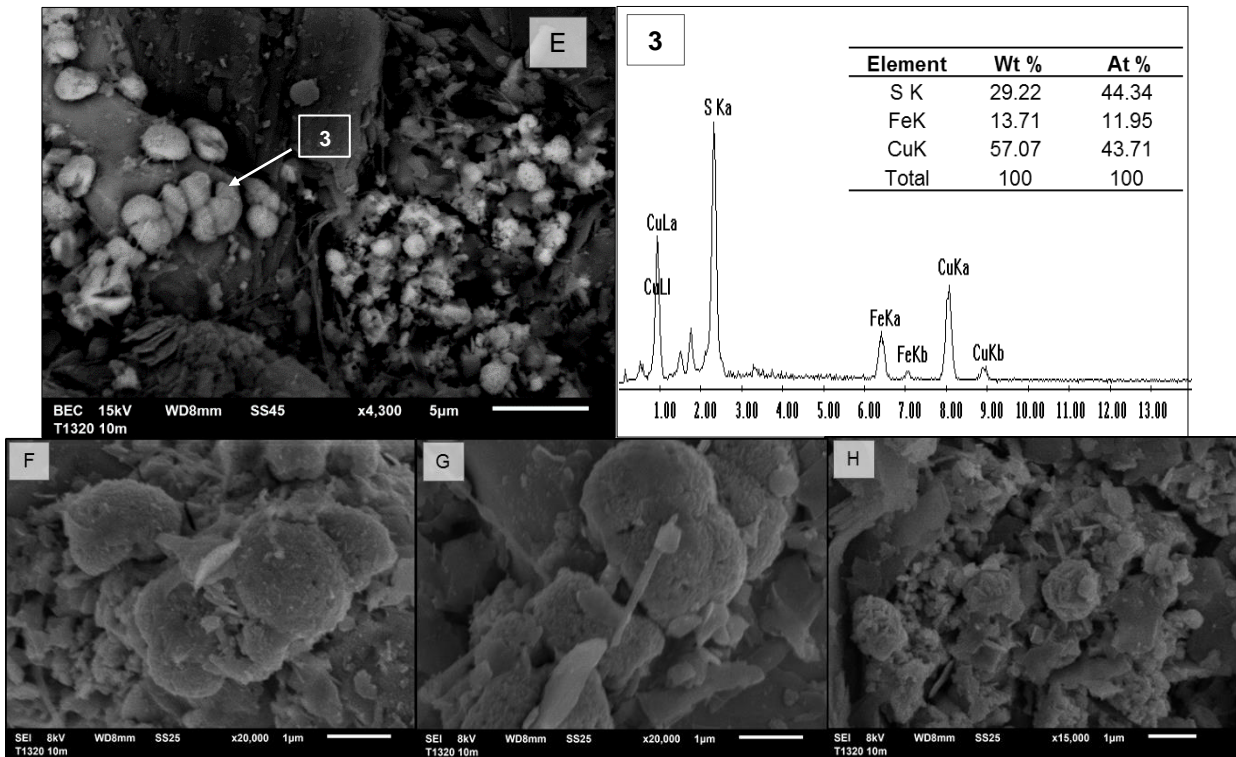
**Figura 25.** Aspecto de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 0-20m del terrero 1320. A) Distribución de partículas de calcopirita en la matriz de silicatos. No se observan alteraciones químico mineralógicas. B) Aspecto de una partícula de la misma calcopirita, alterada morfológicamente. A pesar de encontrar fragmentos minerales diseminados no se observó una alteración químico-mineralógica.

Sobre la superficie de partículas de pirita y silicatos contiguos se encontraron precipitados esferoidales de sulfuros de Cu con composición y tamaño variable. Asociadas en grupos o pares, las formas esferoidales de cobre se observan en la figura 26A, presentando de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, exhibiendo una relación morfológica y textural en base a su composición. De esta forma, las partículas depositadas sobre la pirita corresponden a sulfuros de Cu-Fe que recubren la mayoría de su superficie (Figura 26A y 26B); las partículas centrales (Figura 26C) presentan un menor contenido de cobre (11.98 Wt%) y algunas corresponderían a calcopirita [ $\text{CuFeS}_2$ ], mientras que a los costados se encuentran partículas con una composición cercana a bornita [ $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ] (Figura 27E) las cuales mantienen una superficie rugosa y menos porosa como se observa en la figura 27F y 27G. Los precipitados que se encuentran a la derecha de la pirita (Figura 26D y 27H) corresponden a covelita [ $\text{CuS}$ ] en forma de semiesferas constituidas aparentemente por la conjunción de algunos cristales en forma de filamentos, mientras que con la misma composición otros precipitados en forma laminar conectan estas partículas semiesféricas de covelita.

A la misma profundidad, la pirita se encontró como la fase de sulfuros más abundante, siendo posible identificar ciertos puntos de colonización microbiana y su alteración químico-mineralógica tras registrar la formación sobre su superficie de fases secundarias de óxidos de hierro, tal y como se observa en la figura 28A. En esta partícula es claramente distinguible la distinta composición de pirita, encontrando una zona sin alterar a la izquierda de la fotomicrografía y junto a esta la superficie en la que ocurre la formación de una capa laminar de óxidos de hierro que la recubre parcialmente; esta incorpora en menor proporción Si (2.74 Wt%) e incluso no presentaba una notable distinción morfológica con respecto a la superficie de pirita sin alterar, debido a que aparentemente se encuentra adoptando el relieve de la superficie tal y como se observa en la misma figura 28A y con mayor detalle en la figura 28B. Incluso, sobre esta misma se desarrolla una nueva formación laminar en uno de sus extremos, y que mantiene una distinta composición al integrar Cu-Al-Si como componentes minoritarios y de forma principal al Fe-S-O (Figura 28.2).

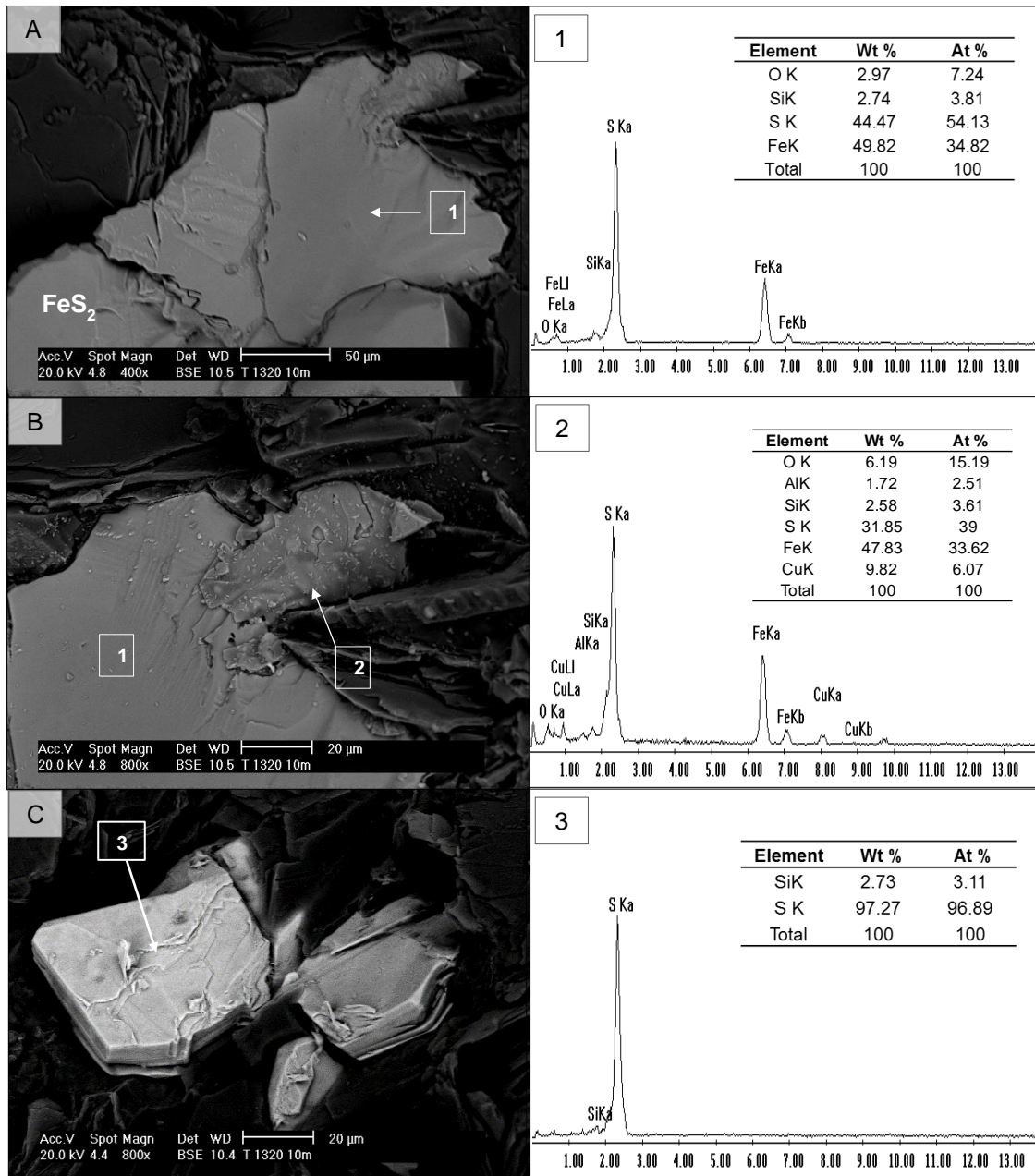


**Figura 26.** Precipitados esferoidales de sulfuro de cobre de variable composición sobre pirita (FeS<sub>2</sub>) y silicatos. A) Distribución de partículas esféricas de cobre depositadas sobre pirita y silicatos. B) Magnificación de las partículas de cobre sobre pirita a 3,700x, se observan diferentes agrupaciones de estas. C) Agrupación de partículas sobre pirita cuya composición es similar a calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>). D) Precipitados de covelita (CuS) sobre silicatos.



**Figura 27.** Precipitados esferoidales de sulfuro de cobre de variable composición sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y silicatos. E) Partículas de bornita [ $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ] en el costado de la partícula de pirita ( $\text{FeS}_2$ ). F y G) Textura rugosa de los diferentes precipitados semiesféricos de bornita a 20,000x. H) Aspecto de las partículas de covelita ( $\text{CuS}$ ) sobre silicatos.

Al continuar examinando las muestras correspondientes a este nivel se identificó la formación de precipitados de azufre elemental sobre la matriz de silicatos, sin haberse presentado sobre la superficie de algunas de las fases de interés como la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) o incluso sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Los precipitados de azufre presentaron dimensiones variables, desde 20 a 60  $\mu\text{m}$ , en donde los de mayor tamaño se encontraron conformados por una serie de placas del mismo espesor, superpuestas una sobre otra; mientras que las partículas de menor tamaño fueron estructuras sólidas irregulares y romboédricas con bordes definidos como se observa en la figura 28C.

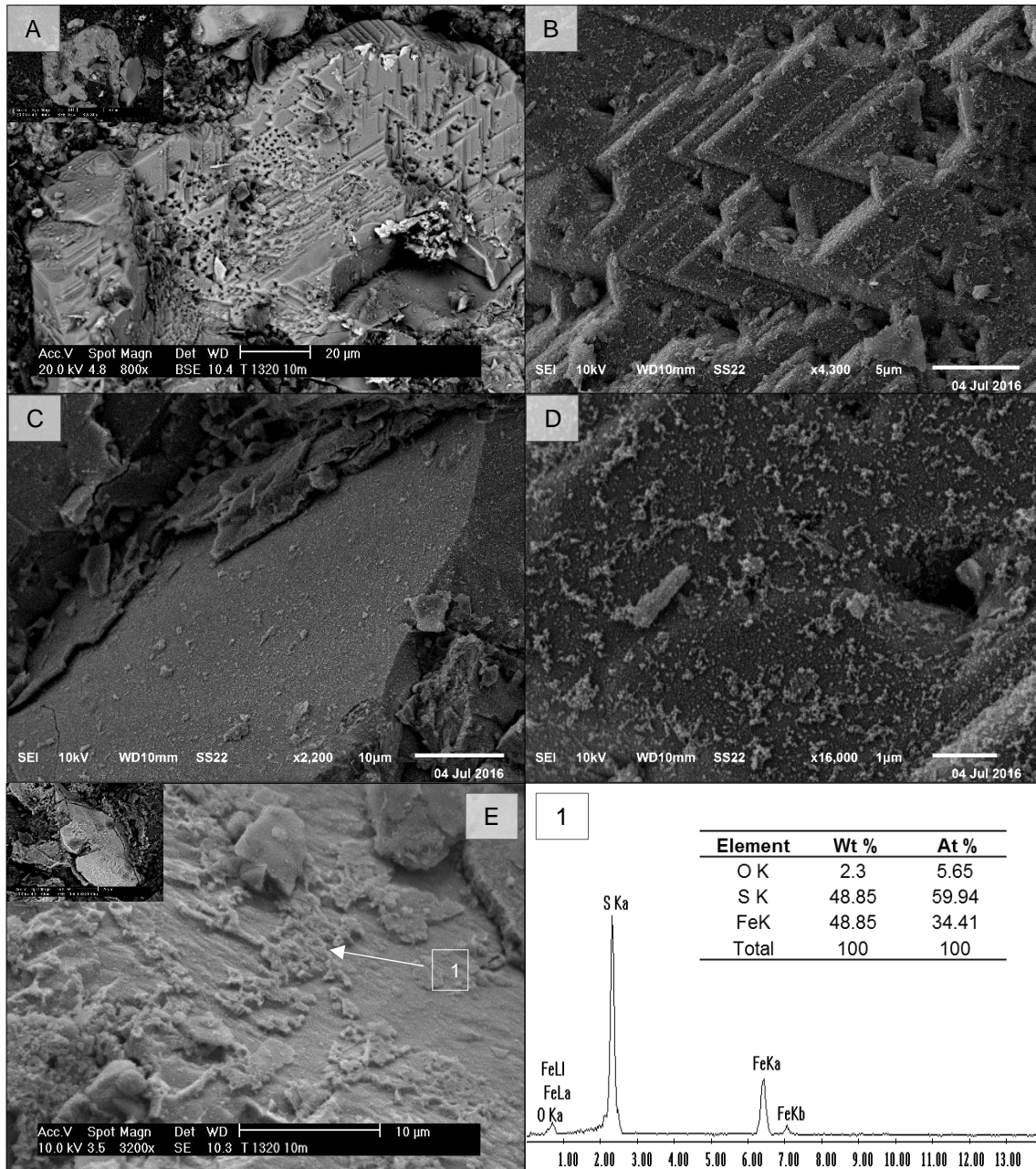


**Figura 28.** Alteración química mineralógica de la pirita (FeS<sub>2</sub>) y formación de partículas de azufre en el terrero 1320 en el nivel 10-20 de profundidad. A) Formación de capa de óxidos de hierro sobre la superficie de pirita, se observa claramente la diferencia en composición. B) Magnificación a la capa de óxido de hierro sobre la cual se encuentra una nueva formación mineral de morfología laminar, incorporando Cu, Al y Si. C) Partículas de azufre elemental posicionada sobre silicatos.

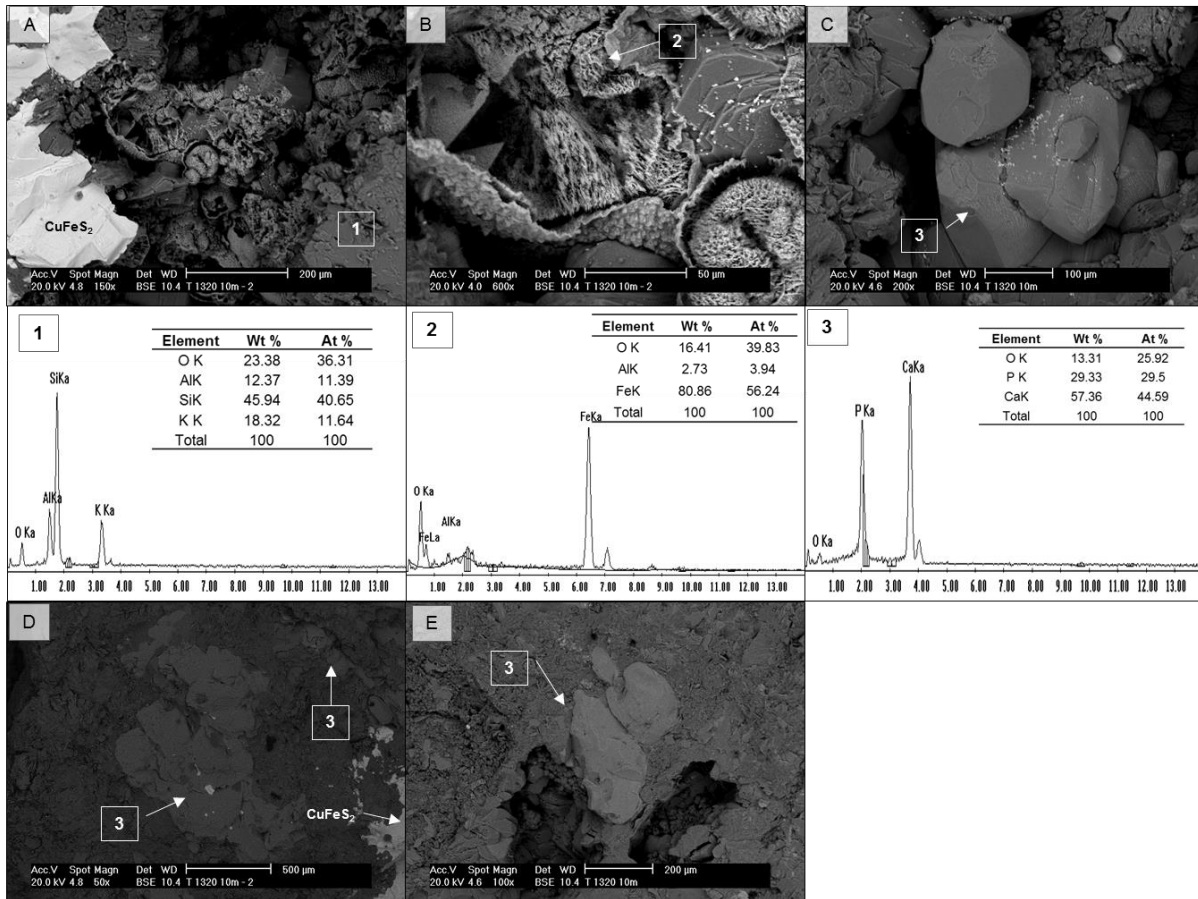


Otras partículas de pirita continuaron atravesando procesos de transformación química y morfológica, encontrando la confluencia de distintas zonas de alteración en una misma partícula en la figura 29. Así, sobre las caras de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) expuestas se presentó la formación de distintos patrones de clivaje (Figura 29A), señalando las diferencias en cuanto a las características de la superficie de pirita, al seguir determinadas líneas cristalográficas, resultando en estructuras rectangulares y triangulares sobrepuestas (Figura 29C). Además, es sobre el clivaje en forma triangular donde también se crean *pits* triangulares cercanos a  $1\ \mu\text{m}$  de extensión a través de la partícula, donde se depositan partículas minerales de dimensiones nanométricas y en las que se identificaron aparentes estructuras de microorganismos.

A una magnificación de 16,000x en estas zonas se observaron aparentes formas bacilares de  $1\ \mu\text{m}$  de longitud, que al parecer se encontraban recubiertas por el mismo material particulado depositado sobre la pirita, tal y como se aprecia en la figura 29D. Continuando con los distintos procesos de alteración, sobre la superficie de pirita en la figura 29E se desarrollaron precipitados laminares de óxidos de hierro que recubrieron heterogéneamente la partícula y que además parecen desprenderse de ésta, cuyas características contrastan ampliamente con la superficie de pirita; esta zona está situada a pocos micrómetros de las zonas antes descritas para la misma partícula, en donde también se presenta una zona uniforme sin alterar (Figura 29C), indicando como es que la oxidación de la superficie sucede de forma parcial o progresiva en ésta y en otras partículas.



**Figura 29.** Alteración superficial de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20 m del terrero 1320. A) Partícula de pirita sobre la que se han desarrollado diferentes zonas de alteración ( $\text{FeS}_2$ ). B) A 4,300x se observa mayor detalle del patrón de clivaje triangular C) Zona de pirita sin alterar D) Apariencia a 16,000x de la superficie en la zona de desarrollo de clivaje. E) Formación de capas de oxidación sobre una nueva partícula de pirita.

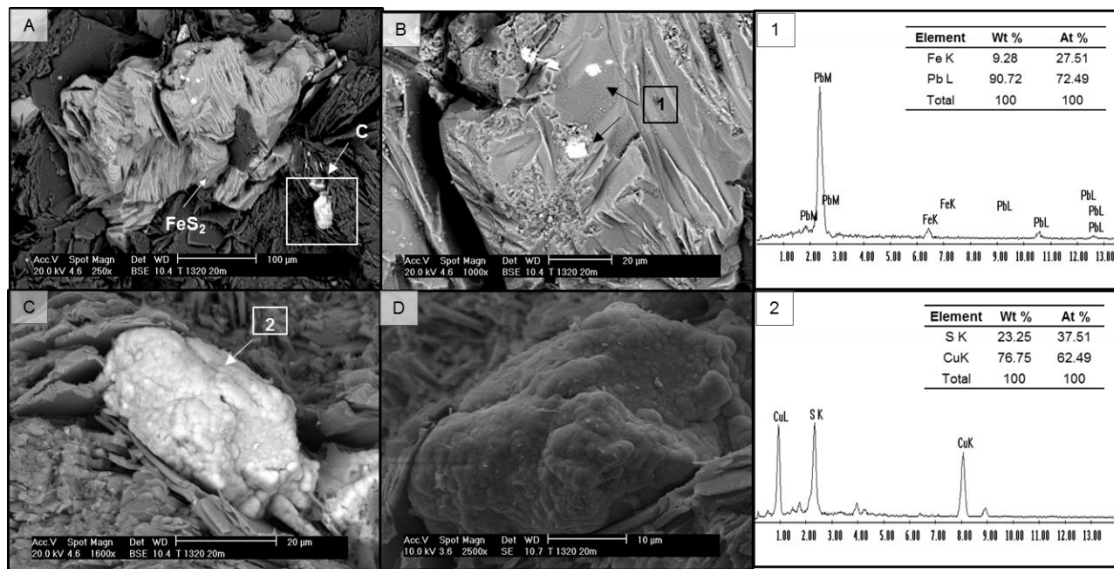


**Figura 30.** Precipitados de óxidos de hierro y aluminio y partículas de fosfato de calcio sobre partículas de silicatos en el nivel 10-20m del terrero 1320.

La formación de productos minerales secundarios siguió ocurriendo sobre la matriz de silicatos, encontrando partículas de óxidos de hierro que ocuparon y recubrieron concavidades o imperfecciones disponibles en la superficie (Figura 30A). Precipitados laminares con una textura rugosa se hallan fracturados parcialmente en la figura 30B, los cuales, recubren un conjunto de partículas conformadas de una red de filamentos de óxidos de hierro, y que al conjuntarse desarrollan estructuras con mayor solidez y variable morfología, ya que se encuentran adoptando el espacio disponible en la matriz de silicatos, recubriendo bordes de las partículas e incluso formando estructuras esféricas por cerca de 400  $\mu\text{m}$ . En base a estas características morfológicas y texturales, pobremente cristalinos, este tipo de filamentos han sido señalados por Williams et al., (2015) como oxihidróxidos de hierro (III) indicativos de actividad microbiana debido a un



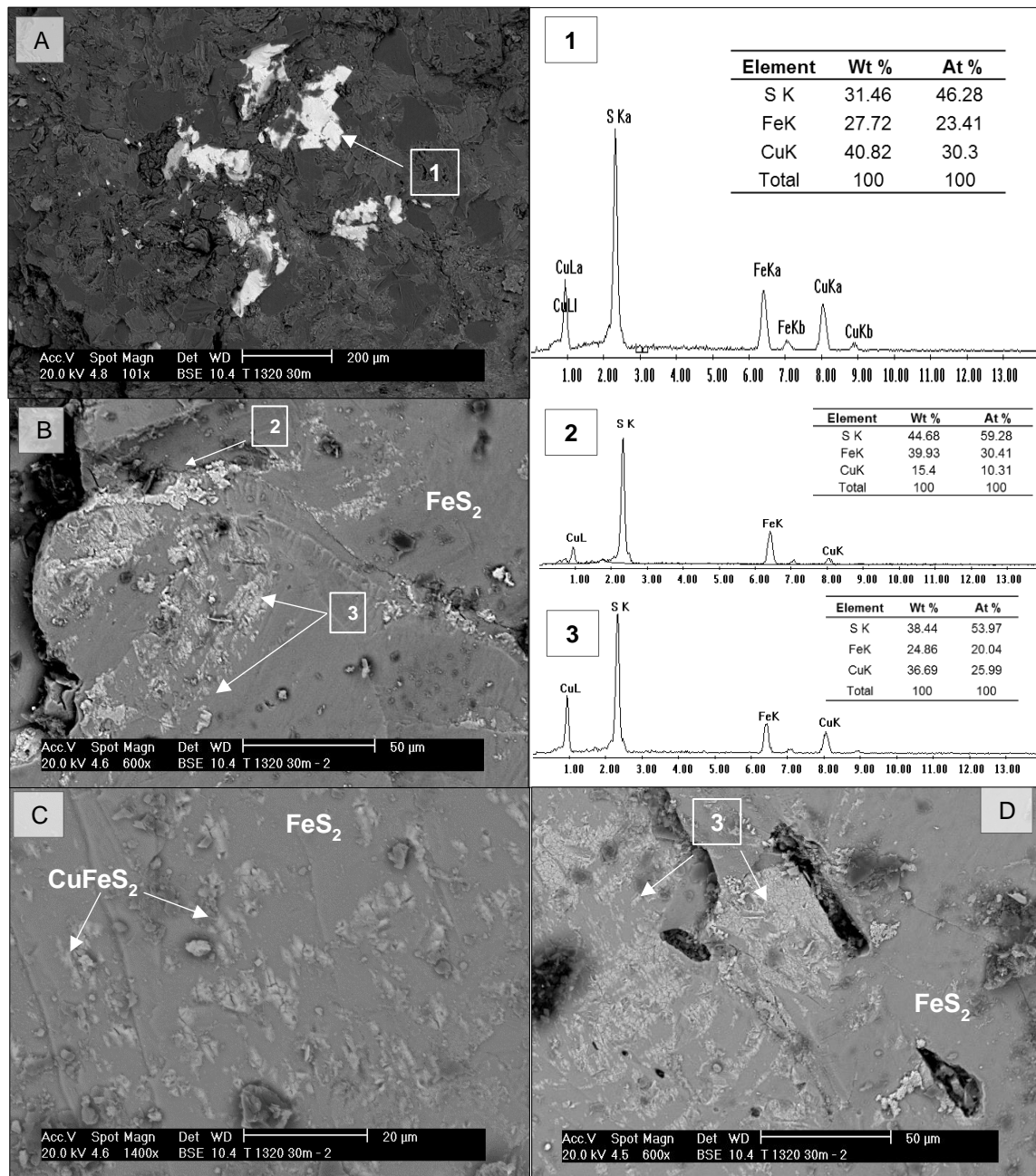
proceso de biomineralización, ya que en ciertos casos estas características se han asociado al recubrimiento de sustancias extracelulares poliméricas que permiten adoptar ciertos rasgos de los filamentos y capas aquí observadas. Otra de las fases minerales identificados en este nivel fue apatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{Cl},\text{OH})$ , observando partículas que se extendieron hasta por  $500\ \mu\text{m}$  y partículas individuales de  $100\ \mu\text{m}$  que se encontraron asociada a la matriz de silicatos y calcopirita (Figura 30D), cerca o sobre bordes de concavidades en esta (Figura 30C y 30E).



**Figura 31.** Pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y calcocita a 20 metros de profundidad en el terrero T 1320. A) Partícula de pirita con amplio desarrollo de líneas de clivaje. B) Inclusiones de Plomo (Pb) metálico presente en la pirita. C) Partícula de calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) que presenta un hábito framboidal. D) Aspecto de la superficie de ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ) a  $2,500\times$ .

En el nivel 20 -30 m las principales fases de sulfuros metálicos detectadas fueron pirita [ $\text{FeS}_2$ ], calcocita [ $\text{Cu}_2\text{S}$ ], y estromeyerita [ $(\text{Cu},\text{Ag})_2\text{S}$ ] con plata en solución sólida, observando una preferente abundancia de partículas de pirita con respecto a aquellas de sulfuros de cobre; siendo así complicado encontrarlas dentro de la matriz de silicatos, debido a su baja abundancia y dimensiones. En la figura 31 se señala una de las partículas de pirita en la muestra, la cual presenta inclusiones de plomo metálico y que además se encuentra cerca de una partícula framboidal de calcocita [ $\text{Cu}_2\text{S}$ ]. A pesar de la peculiar morfología de la calcocita, no

se presentaron formas microbianas en su superficie al observarla mediante SE a 2,500x (Figura 31D).

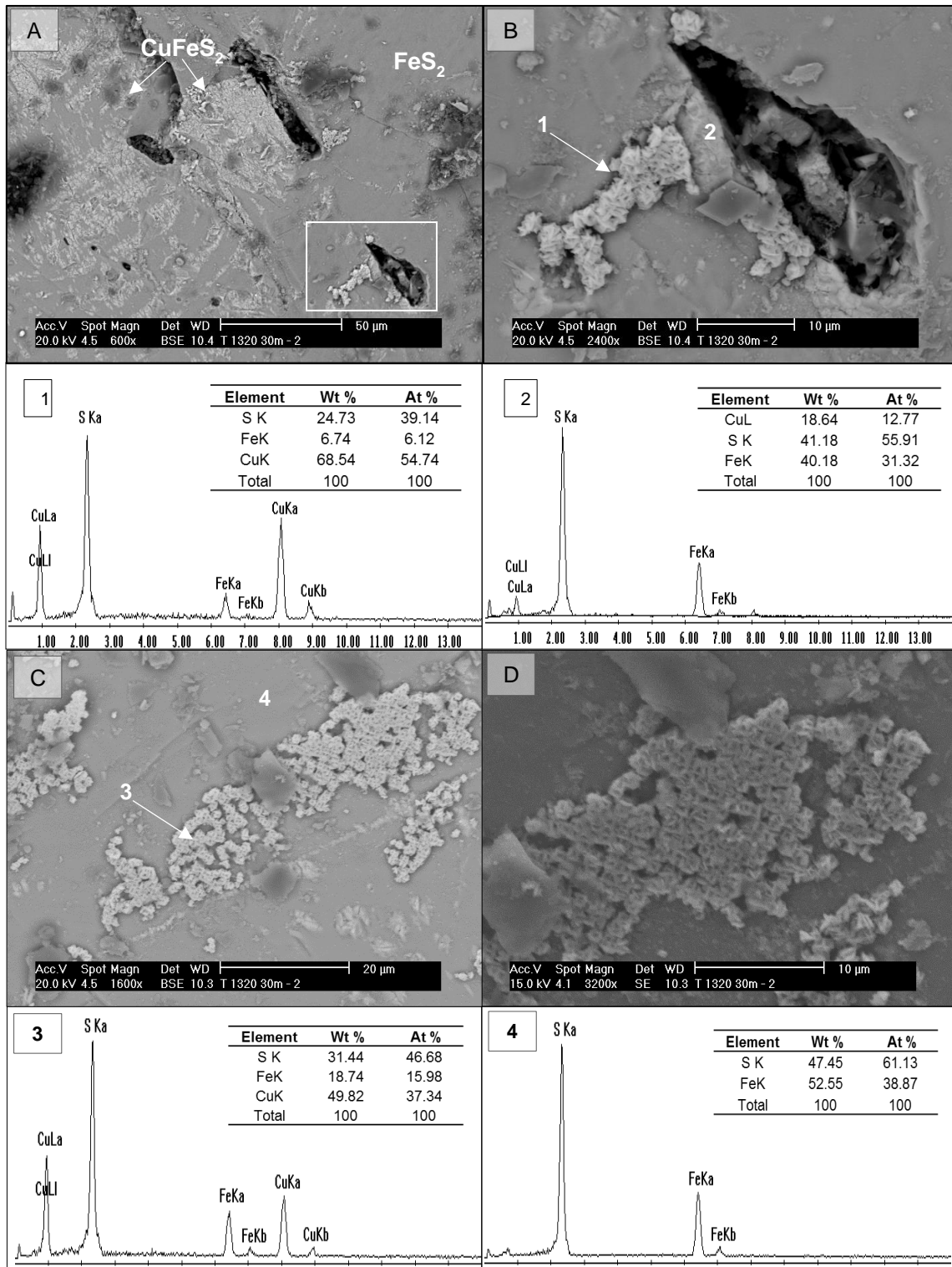


**Figura 32.** Formaciones de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 30-40m del terrero 1320. A) Partículas de calcopirita sin alterar asociadas a la matriz de silicatos. B) Fases secundarias de sulfuros de cobre sobre pirita e inclusión de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en esta. C) Aspecto de la superficie de pirita en las zonas donde se observan intercrecimientos de calcopirita de forma diseminada. D) Formación de orificios en la superficie de pirita e intercrecimientos de calcopirita y la formación de otros precipitados de cobre.

En el siguiente nivel, a 30 – 40m de profundidad, los sulfuros de cobre se presentaron asociados directamente a la matriz de silicatos, así como a las partículas de pirita. La figura 32 incorpora algunas de las fotomicrografías y espectros EDS pertenecientes a estas, encontrando partículas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) asociadas a la matriz de silicatos (Figura 32A), así como en forma de intercrecimientos en la pirita, tal y como se observa en la figura 32B, 32C y 32D al examinar su superficie.

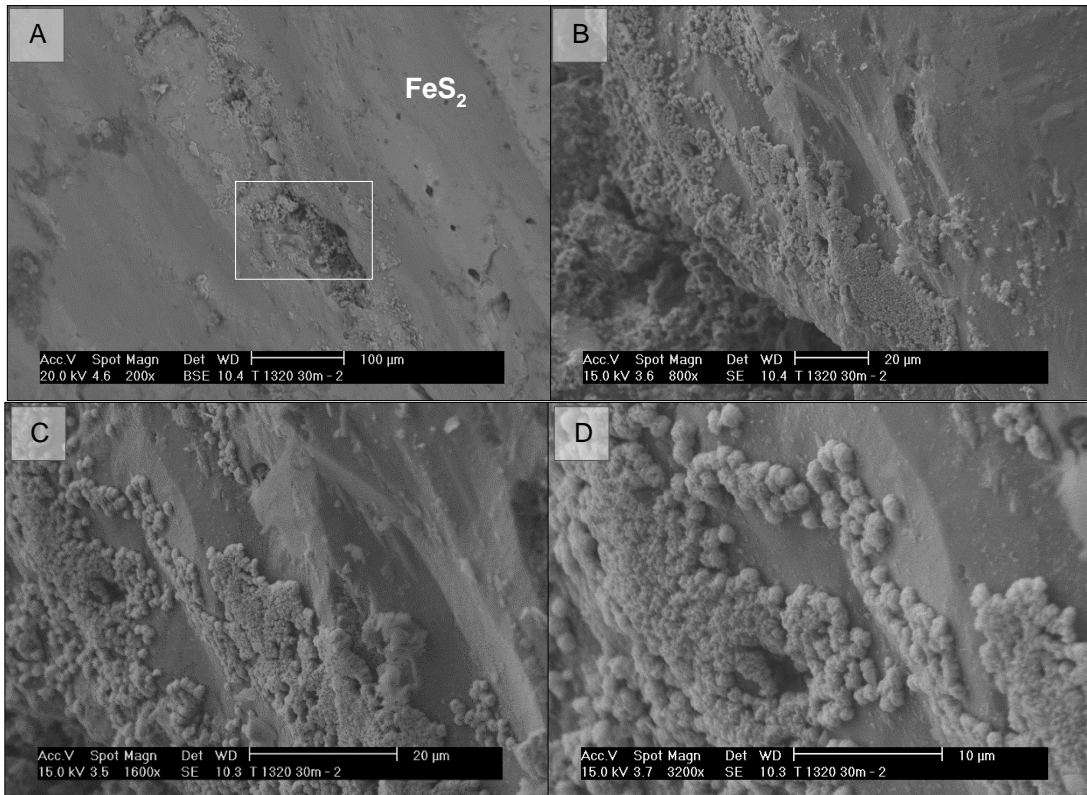
Además de la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) otros sulfuros de cobre de composición y morfología variable se encontraron asociados a la pirita [ $\text{FeS}_2$ ], como las partículas esféricas y formaciones laminares sobre la superficie de pirita que se señalan en la figura 32B y en las siguientes figuras. Cercana a zonas de intercrecimientos de calcopirita (figura 32B), se presenta la formación de precipitados de Cu-Fe-S en forma laminar sobre fracturas en la superficie de pirita, cuya composición indicaría una fase intermedia entre la covelita y la bornita debido a su variable contenido de estos elementos. Exhibiendo una morfología distinta a estos precipitados, nuevas formaciones de sulfuros de cobre se observan en la figura 33. Con un bajo contenido de hierro, los porcentajes atómicos de la formación 1 indicarían que se trata de idaita [ $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ] (Figura 33B), la cual se presenta como agregados laminares formados por cristales de tamaño microscópico. Estos y otros precipitados de similar composición a idaita (Figura 33B y 33C) formados por los mismos cristales o laminillas que se entrelazan y agrupan entre sí, dando paso a pequeñas partículas esferoidales (Figura 33D) que se acumulan por distintos puntos. Así, el recubrimiento de extensas zonas de pirita se registró en zonas con un relieve uniforme, donde ocurre el intercrecimiento con calcopirita y la formación de otras fases secundarias, así como en bordes y concavidades de las partículas de pirita (Figura 34).

La idaita se menciona como un producto de alteración de la bornita [ $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ], fase mineral que también se identificó en el mismo nivel de profundidad y de forma cercana a estos precipitados laminares esféricos (Figura 35A).



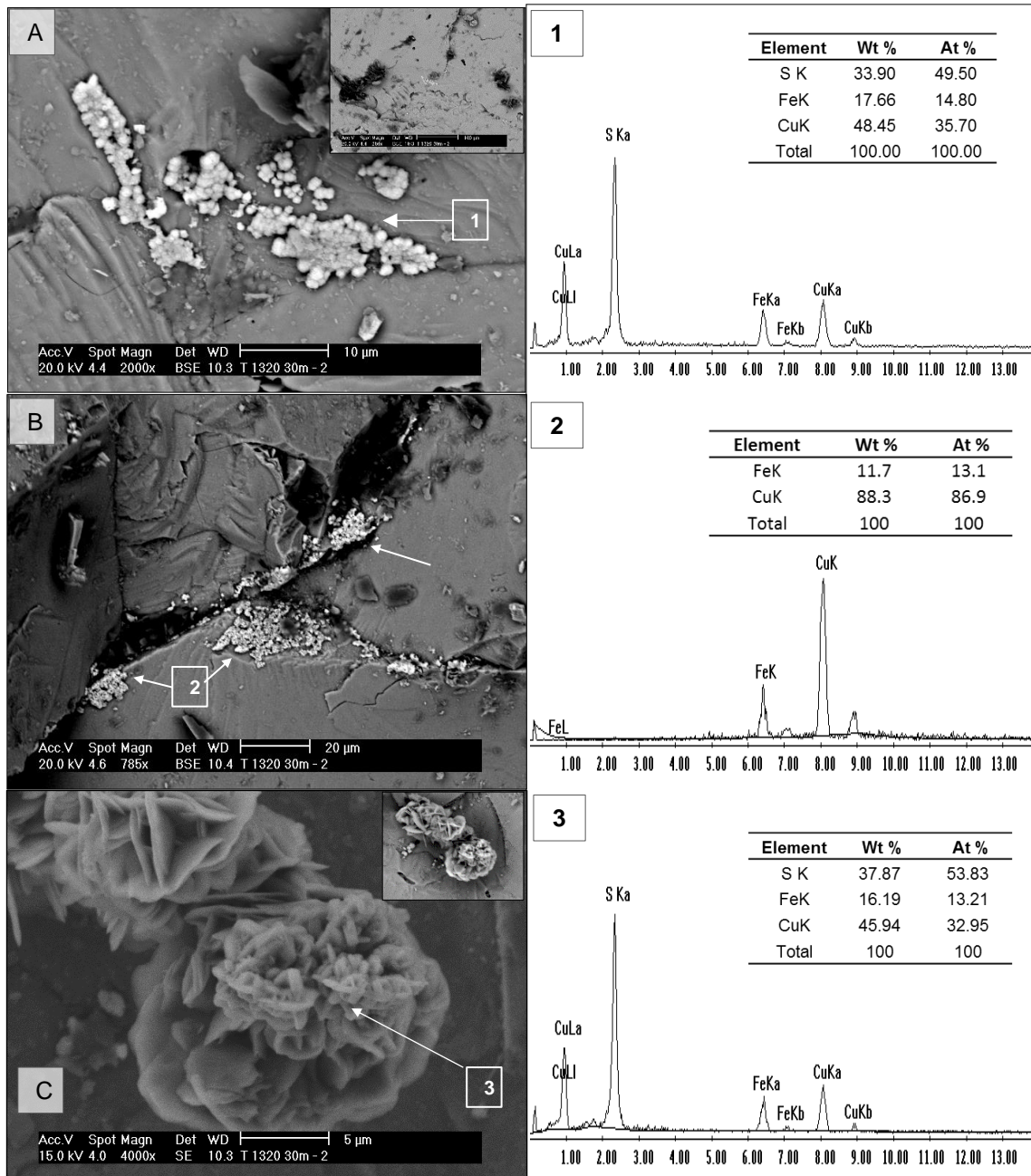
**Figura 33.** Formación de precipitados de idaita ( $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ) en la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ). A) Ubicación de las partículas de fase de cobre. B) Precipitados de sulfuros de cobre con distinta morfología sobre pirita, la estructura central corresponde a idaita ( $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ). C y D) Agrupación de precipitados esféricos de idaita [ $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ] en zonas donde se presenta el intercrecimiento de calcopirita y la formación de otras fases minerales secundarias. Continúan desarrollándose formaciones laminares al agruparse.



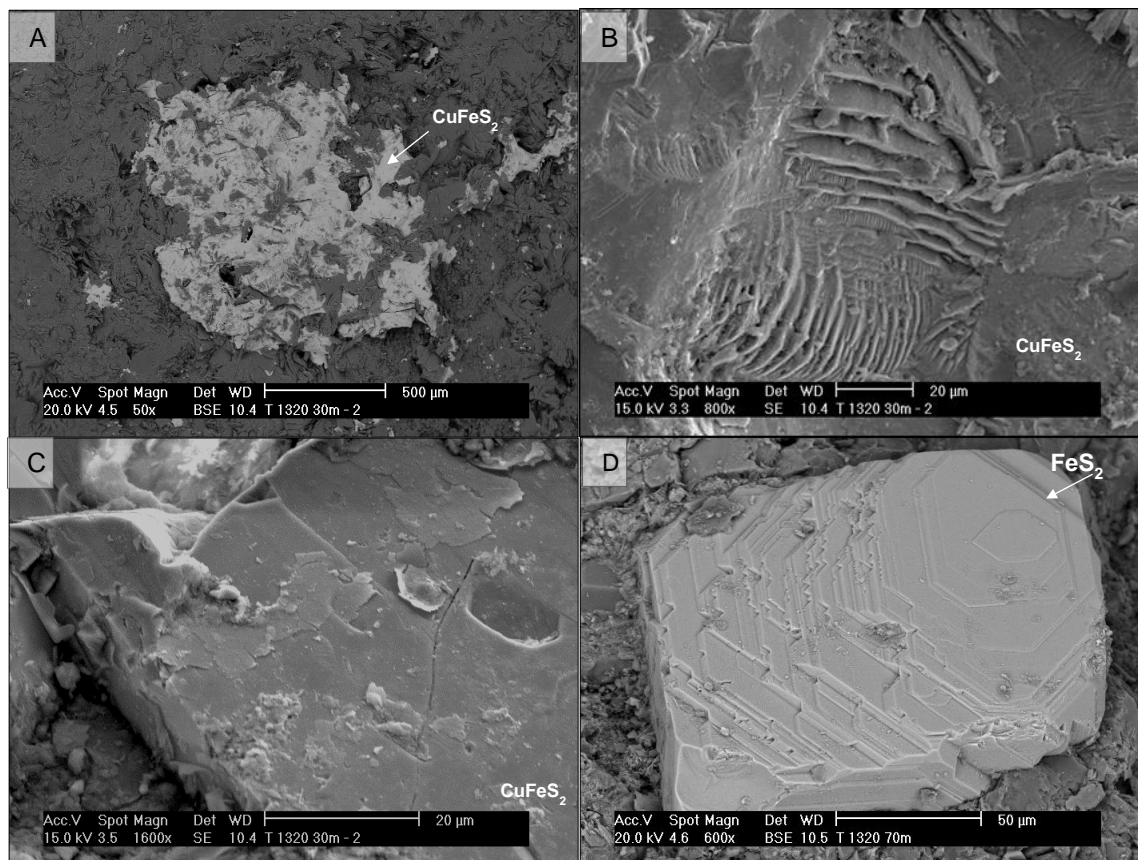


**Figura 34.** Nuevas formaciones de idaita [ $\text{Cu}_3\text{FeS}_4$ ] en el nivel 30-40 m que se extienden por cerca de  $400\ \mu\text{m}$  en la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ). A) Localización de los precipitados. B) La agrupación de los cristales en semiesferas y posteriormente en estructuras que recubren Desarrollo de una monocapa que recubre bordes y líneas de clivaje cercana a una concavidad en la pirita. C y D) Se observa cómo es que los precipitados de idaita conforman una monocapa sobre la superficie y mantiene una textura rugosa a  $1,600\times$  y  $3,200\times$ .

En bordes de fractura de pirita y zonas cercanas a las anteriores figuras se encontraron nuevas formaciones laminares de sulfuros de cobre similares a aquellas de idaita y bornita (Figura 35A). Mientras que en la figura 35B señala tres puntos de acumulación de precipitados, que mantienen una relación de 11.7 Wt% Fe y 88.3 Wt% Cu, la cual se acerca a la composición reportada para la digenita [ $\text{Cu}_9\text{S}_5$ ], mientras que precipitados esféricos de covelita también se reportaron cerca de esta zona. Por último, de diferentes características morfológicas, la figura 35C muestra una partícula de sulfuros de cobre de hábito lenticular compuesta por Cu-Fe-S cuya composición es similar a la bornita.



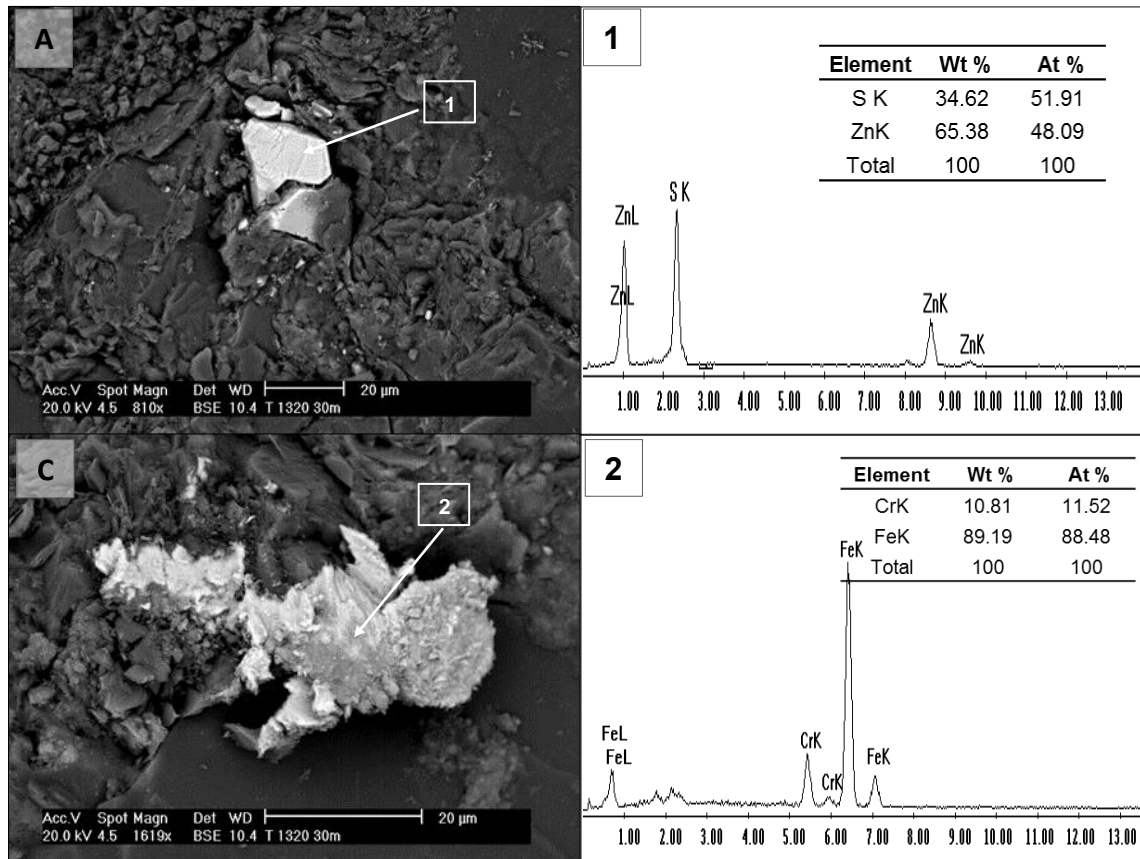
**Figura 35.** Partículas de sulfuros de cobre (bornita-idaíta-covelita) sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 30-40m del terrero 1320. A) Precipitados esféricos de bornita. B) Formaciones laminares conformadas por partículas de agregados esféricos de sulfuros de cobre. C) Partícula de los sulfuros de cobre con hábito lenticular.



**Figura 36.** Partícula de calcopirita en el nivel 30-40m del terrero 1320. A) Localización de calcopirita en la matriz de silicatos. B) Formación de clivaje característico. C) Desarrollo de capas de alteración sobre calcopirita, las cuales se encuentran desprendiéndose de la superficie. D) Partícula de pirita en el que se observa la alteración de la partícula y el desarrollo gradual de líneas de clivaje desde el extremo superior derecho.

Las partículas de calcopirita asociadas directamente a la matriz de silicatos en el nivel 30-40 mostraron distintos rasgos de alteración morfológica, presentando zonas con un amplio desarrollo de líneas de clivaje características para esta fase (Figura 36B). A pesar de que no se observaron cambios químico-mineralógicos en su superficie, en la figura 36C es posible observar indicios de su alteración morfológica ya que se encuentra el desprendimiento de estructuras laminares de su superficie, indicativo del proceso de disolución y oxidación que está ocurriendo. Las condiciones de acidez en el medio también se hacen notables debido a la alteración de partículas de pirita en el mismo nivel, donde se encuentra la generación de clivaje de forma gradual en la figura 36D.

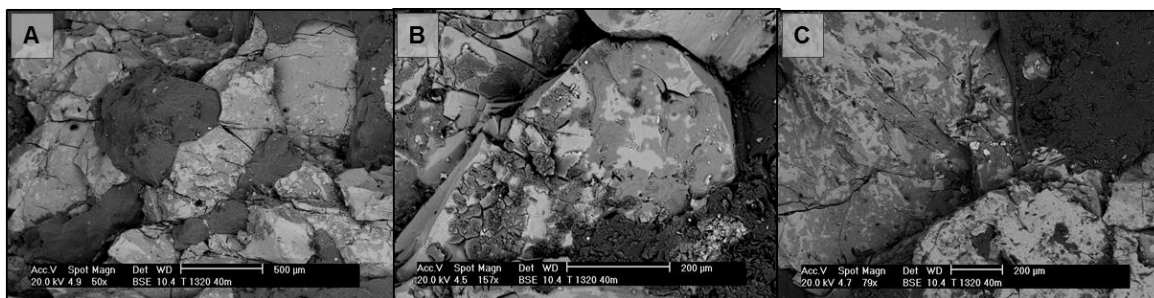
Aunado a las anteriores partículas minerales, asociados únicamente a la matriz de silicatos se identificó la presencia de esfalerita (ZnS) desplegando su característico hábito cristalino, así como precipitados de forma irregular de Fe y Cr, tal y como se señalan en la figura 37.



**Figura 37.** Partícula de esfalerita (ZnS) y precipitados de Fe-Cr encontrados de forma aislada en la matriz de silicatos.

En el nivel 40 a 50 m de profundidad se encontraron extensas zonas de alteración en forma de capas de oxihidróxidos e hidroxisulfatos de hierro sobre partículas de pirita en las que fue posible detectar la presencia de microorganismos. El desarrollo de capas de oxidación se presentó en la mayoría de la superficie expuesta, ocupando grandes extensiones de las partículas tal y como se ejemplifica en las fotomicrografías de la figura 38A, 38B y 38C (zonas oscuras en la pirita).



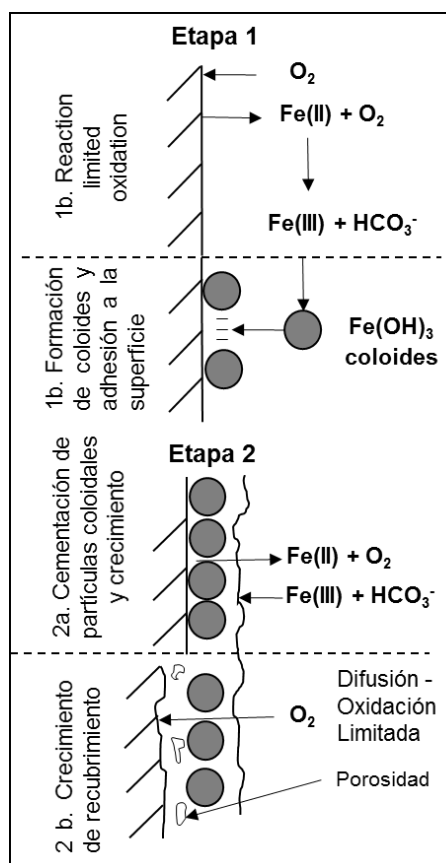
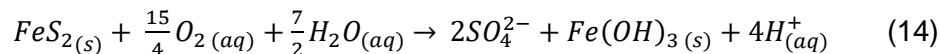


**Figura 38.** Desarrollo de capas de oxidación sobre grandes extensiones de la superficie de pirita en diferentes puntos del nivel 40-50m del terrero 1320.

Ya que presentaron distintas características de composición, en las siguientes figuras se incluyen algunos puntos de interés en la muestra, en las que también se observan diferentes características texturales. Así, en un principio la figura 40A y 40B señalan la fragmentación de la capa de oxidación desarrollada en una concavidad de la pirita, apreciando una textura característica para las láminas que se desprenden, las cuales mantienen un espesor cercano a los 2 µm. En una partícula contigua, se observa el recubrimiento de una superficie uniforme de pirita, donde la capa de oxidación posicionada directamente sobre esta se encuentra fragmentada, y cuya textura contrasta ampliamente con la de la superficie adyacente de pirita, que no muestra el mismo grado de alteración morfológica y química. A 3,800x (Figura 40D) se identifica como la capa de oxidación en las anteriores fotomicrografías se encuentra conformada por un conjunto de partículas coloidales distribuidas uniformemente, y que en base al análisis químico puntual por EDS se identificarían como partículas de oxihidróxidos de hierro.

La formación de oxihidróxidos de hierro ocurre durante el proceso de oxidación de la pirita con base en la reacción 14, posteriormente formando posibles fases secundarias de Fe(III) como ferrihidrita ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) o goethita ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) (Nordstrom et al., 2015). La generación de este tipo de fases secundarias se encuentra asociada a condiciones de pH neutras o cercanas a la alcalinidad del medio que favorecen su formación, y que al depositarse sobre la superficie de pirita se encontrarían recubriéndola de acuerdo al modelo propuesto por Huminicki y Rimstidt (2009) en la figura 39, el cual mantiene una notable similitud con las características observadas para los precipitados y la superficie de pirita en este

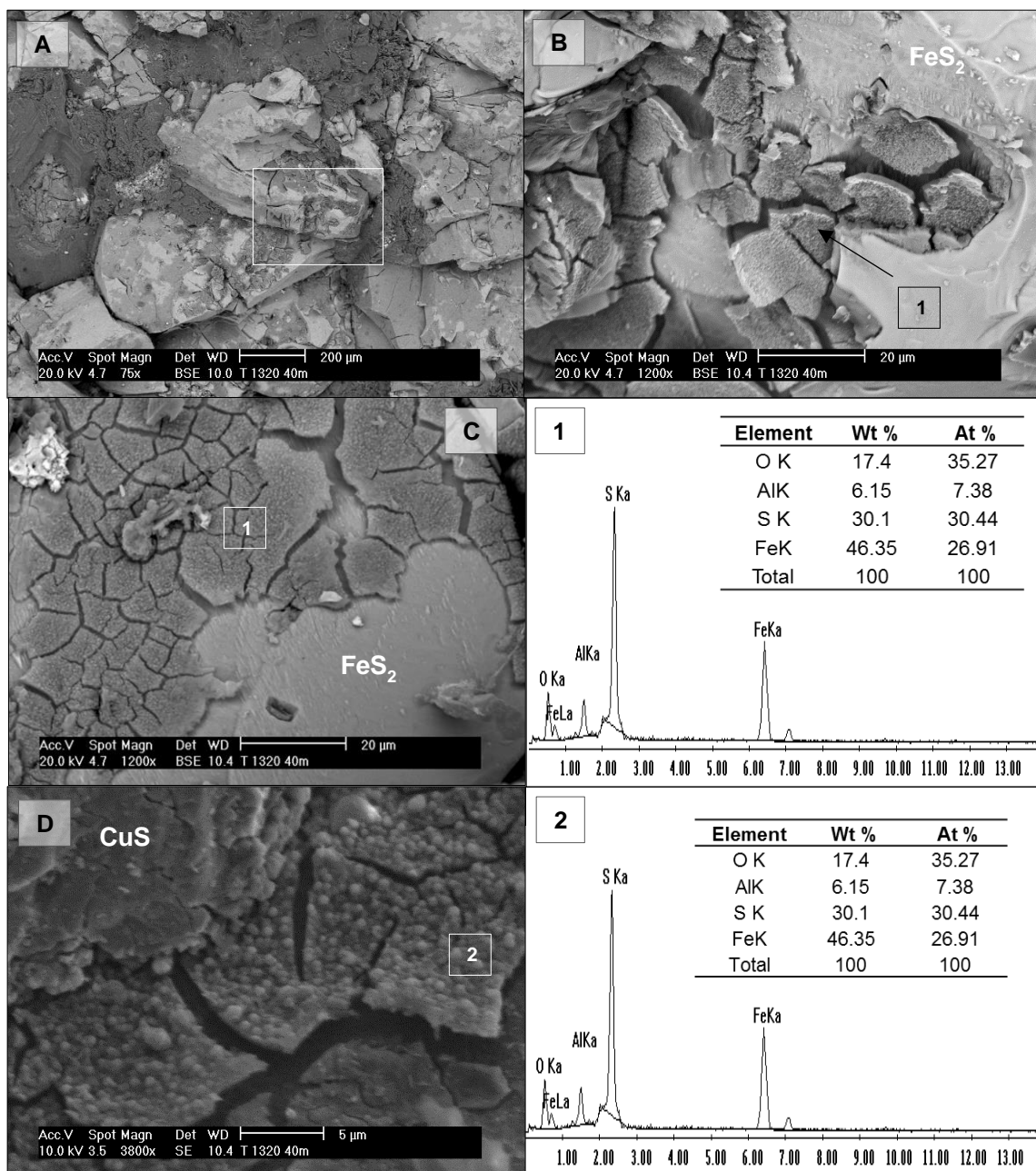
nivel. Este proceso ocurre en dos etapas: partículas coloidales de oxihidróxidos de hierro precipitan sobre la pirita, recubriéndola parcialmente y formando así una capa permeable en la superficie, que tras el continuo proceso de oxidación por Fe(III) y O<sub>2</sub> da paso a la acumulación de productos minerales entre las partículas coloidales, desencadenando en la formación de una capa pasivante de oxihidróxidos de Fe(III) que recubre la pirita, la cual continuaría desarrollando un mayor espesor conforme el proceso de oxidación y desgaste de la superficie continúe (Huminicki y Rimstidt, 2009; Nordstrom et al., 2015). La diferencia en cuanto al desarrollo y por consiguiente el espesor de la capa de oxihidróxidos se puede identificar al comparar las fotomicrografías obtenidas en la figura 40B y 40D.



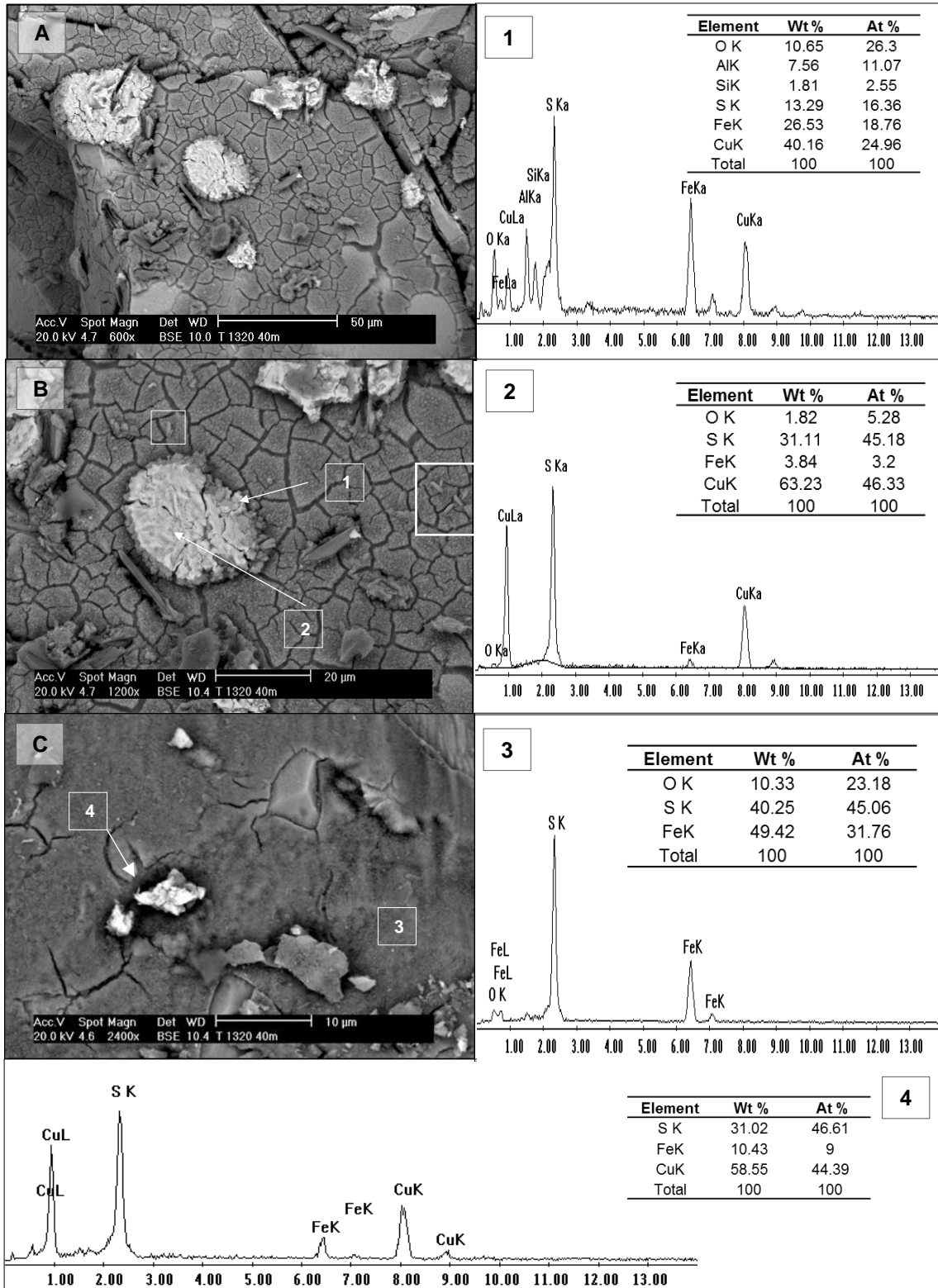
**Figura 39.** Diagrama de la formación del recubrimiento de oxihidróxidos de Fe(III) sobre pirita (FeS<sub>2</sub>) (Modificado de Huminicki y Rimstidt, 2009).

La composición y morfología de la capa de oxidación sobre la pirita encontró algunas variaciones a través de la muestra, encontrándose caracterizada por la presencia de elementos como Al, Fe, Si, P, O y S, así como Cu en una ocasión. La incorporación de Al, Si y P podría ser atribuido a que estos se encuentran en la solución intersticial del medio debido a la disolución de silicatos o debido a la solución nutritiva añadida a los terreros en el caso del fosforo, encontrándose disponibles para adsorberse o precipitarse formando así parte de la capa de oxidación que une las partículas coloidales de Fe sobre la pirita. La presencia de estos elementos se seguiría presentando más adelante, donde se encontrarían incorporados incluso en una nueva capa de oxidación sobre la superficie de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ).

Además de la capa de alteración en la pirita ( $\text{FeS}_2$ ), sobre esta misma se presentaron precipitados de sulfuros de cobre como los que se señalan en la Figura 41. Partículas de 5 a 50  $\mu\text{m}$  que se ubicaron en el centro y bordes de la superficie de pirita alterada (Figura 41A); en la figura 41B se observa uno de los sulfuros de Cu, el cual mantiene una composición distinta en sus bordes (Espectro EDS 1 Figura 41.1) que en el centro (Figura 41.2); conformándose por diferentes capas y rodeada de partículas coloidales de oxihidróxidos de hierro en sus bordes, tal y como se aprecia en la anterior figura (40D). Las diferencias en su morfología se asocian a su distinta composición, ya que se aprecia un mayor contenido de Fe en los bordes que presentan partículas coloidales depositadas en estos puntos.



**Figura 40.** A) Morfología de la capa de oxihidróxidos de Fe sobre pirita en el nivel 30-40m del terrero 1320. B y C) Desprendimiento y fractura de la capa de oxihidróxidos de Fe en diferentes puntos de pirita, se aprecian diferencias en el espesor de esta en las dos fotomicrografías. D) Superficie de la capa de alteración, se observan partículas coloidales de oxihidróxidos de Fe.



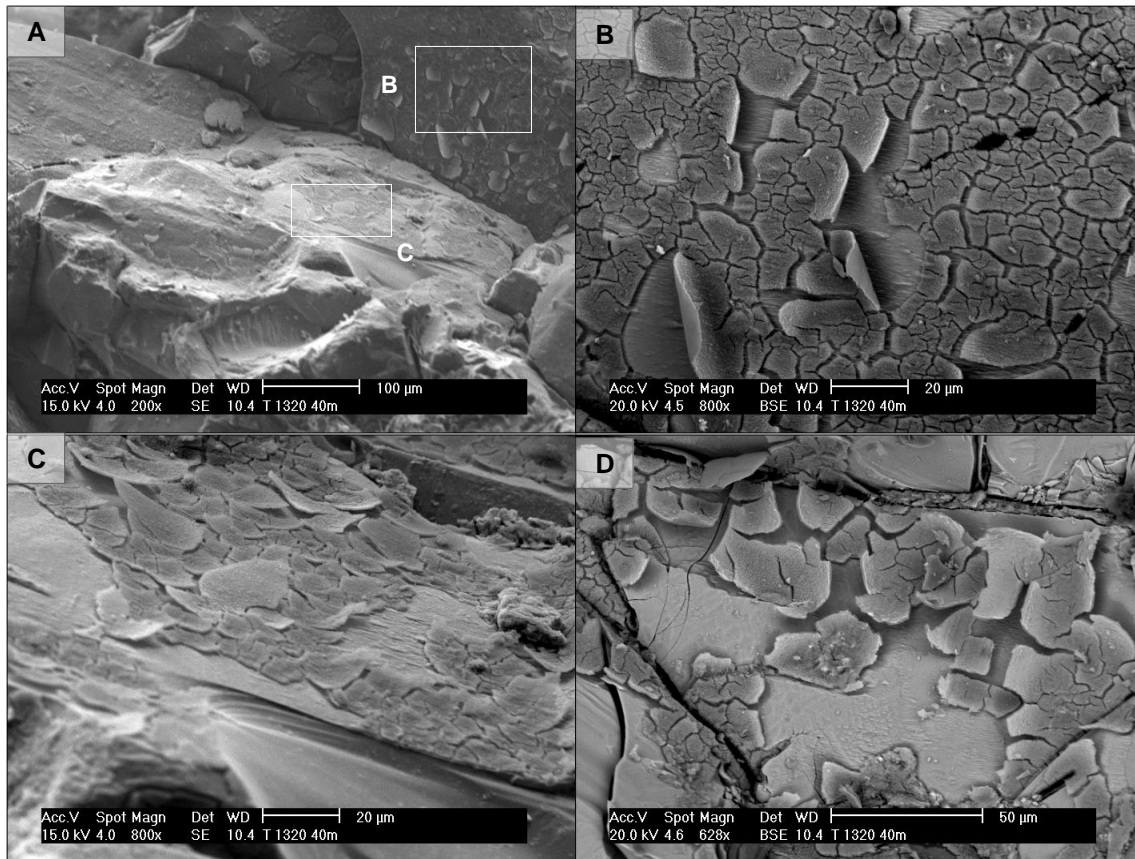
**Figura 41.** Desarrollo de capas de oxihidróxidos de Fe sobre pirita y precipitados de cobre. A) Precipitados de sulfuros de cobre con variables dimensiones sobre la capa de oxihidróxidos de hierro que recubre la pirita.

B) Partícula de similar composición a covelita (CuS), a la derecha de la fotomicrografía se indica la ubicación de un grupo de microorganismos bacilares sobre la superficie. C) Capa de óxidos de hierro sobre pirita que mantiene una distinta composición y textura a las anteriormente observadas. De igual forma se presentan precipitados de covelita en su superficie.

A 30 micrómetros de esta fase de cobre, en la derecha de la fotomicrografía se encontró la presencia de microorganismos bacilares en contacto con la capa de oxihidróxidos de hierro. Un conjunto de 6 bacilos se posicionó sobre o cerca de las fracturas que presenta, los cuales no mostraron una aparente generación de EPS hacia su entorno. Además de este punto, en la figura 40C a pocos micrómetros del anterior conjunto de microorganismos, también fue posible identificar varios bacilos de forma aislada. El encontrarlos en este nivel, permitiría asociar la presencia y actividad microbiana con el proceso de oxidación de la pirita. Además, es importante señalar que, a pesar de localizarse en este nivel, los microorganismos no fueron encontrados en las zonas de pirita donde la capa de oxidación se había previamente desprendido o no se encontraba desarrollada, lo que implicaría dos escenarios: en el que esta capa de oxidación impediría el contacto de los microorganismos con la pirita o que estos se hubieran posicionado en la pirita durante la oxidación de la superficie, y tras avanzar su oxidación se desprendieran junto con la capa de oxidación.

En la figura 41C fue posible observar una etapa anterior a la fragmentación de la capa de oxihidróxidos que recubre la pirita, presentando una superficie aparentemente más uniforme en comparación a las anteriores, ya que no se observa la misma formación de partículas coloidales, presentando una composición diferente, sin la incorporación de Al, Si y P. En esta zona de la superficie también ocurre el desprendimiento de la capa de oxidación, observando así la pirita sin alterar bajo esta y como es que permanece rodeada por la capa de oxidación, así como partículas de covelita que se precipitan a la izquierda de este punto. Continuando con la exploración de la superficie de pirita, las cuatro fotomicrografías de la figura 42 permiten observar con mayor claridad cómo es que la capa de oxihidróxidos de Fe se forma y fractura por encima de la pirita en distintos puntos de la muestra y la manera en que comienza a desprenderse de la superficie. Formando una especie de hojuelas o láminas que se curvan durante o tras su desprendimiento, es posible percibir la pirita por debajo de esta capa, encontrando una superficie con distinta textura y composición, la cual corresponde a la de una pirita sin alterar químicamente o en proceso de este.

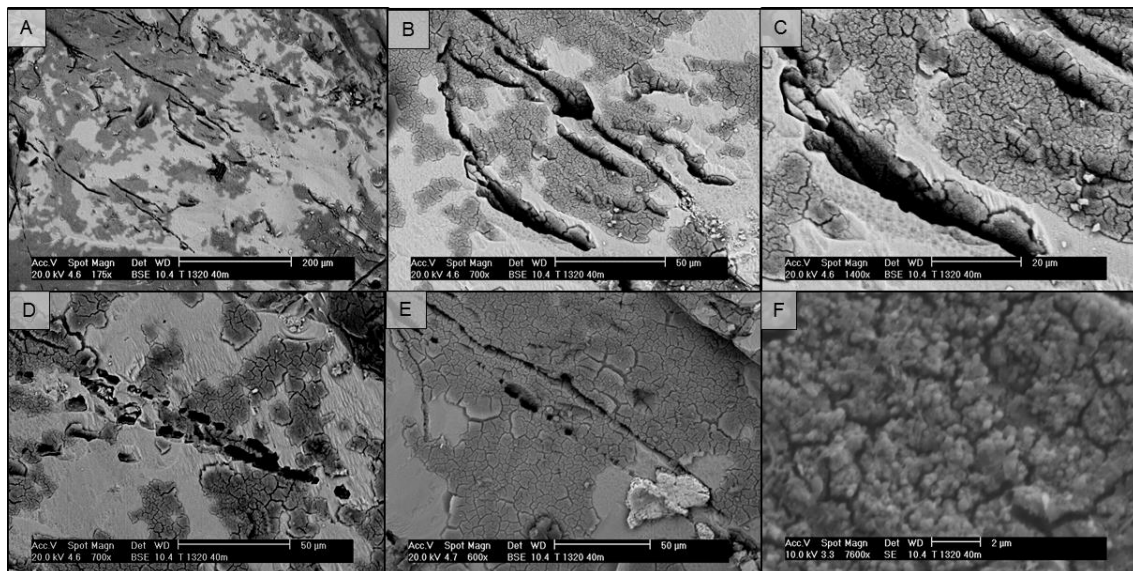
El recubrimiento de la superficie por oxihidróxidos de hierro ha sido reportado como un factor que disminuye la velocidad de oxidación de la pirita, ya que la capa de fases secundarias limitaría el transporte de los agentes oxidantes hacia la superficie, además de evitar al mismo tiempo el contacto de los microorganismos con la fase de sulfuros (Huminicki y Rimstidt, 2009; Vera et al., 2013; Nordstrom et al., 2015).



**Figura 42.** Desprendimiento de la capa de oxihidróxidos de hierro (III) desarrollada sobre la pirita en el nivel 40-50m del terrero 1320. Se observan las diferentes dimensiones que esta presenta y zonas donde se encuentra ocurriendo su desprendimiento.

A la formación de oxihidróxidos de hierro y la presencia de microorganismos en estos, se sumó la formación de canales y orificios con bordes geométricos distribuidos a través de la superficie de pirita, atribuidos al mismo proceso de oxidación y disolución que ocurre. Los canales más extensos se prolongaron hasta por 200 µm (Figura 43), principalmente en línea recta y de forma paralela unos a otros; por otra parte, en la figura 43D y 43E se observa la manera en que comienzan

a desarrollarse, ya que se identificó la formación de orificios hexagonales o redondeados individuales, que alineados uno junto a otros van creciendo hasta dar paso a la formación de un canal o a zonas de oxidación más grandes al unirse con otros previamente formados. Los canales mantienen bordes lineales y definidos en los que incluso hacia el interior de estos se alcanza a percibir el recubrimiento de la pirita por la capa de oxidación previamente descrita (Figura 43C), manteniendo aquellas características señaladas en su conformación por partículas coloidales de oxihidróxidos de hierro (Figura 43F). La formación de estos canales y el recubrimiento de sus paredes por oxihidróxidos de hierro indicaría que estos se desarrollaron previamente o a la par de la formación de las capas de fases secundarias que recubren la pirita, y como es que las condiciones necesarias para su generación podrían haber ocurrido tras el proceso de oxidación previo en la pirita u ocurrido al mismo tiempo.

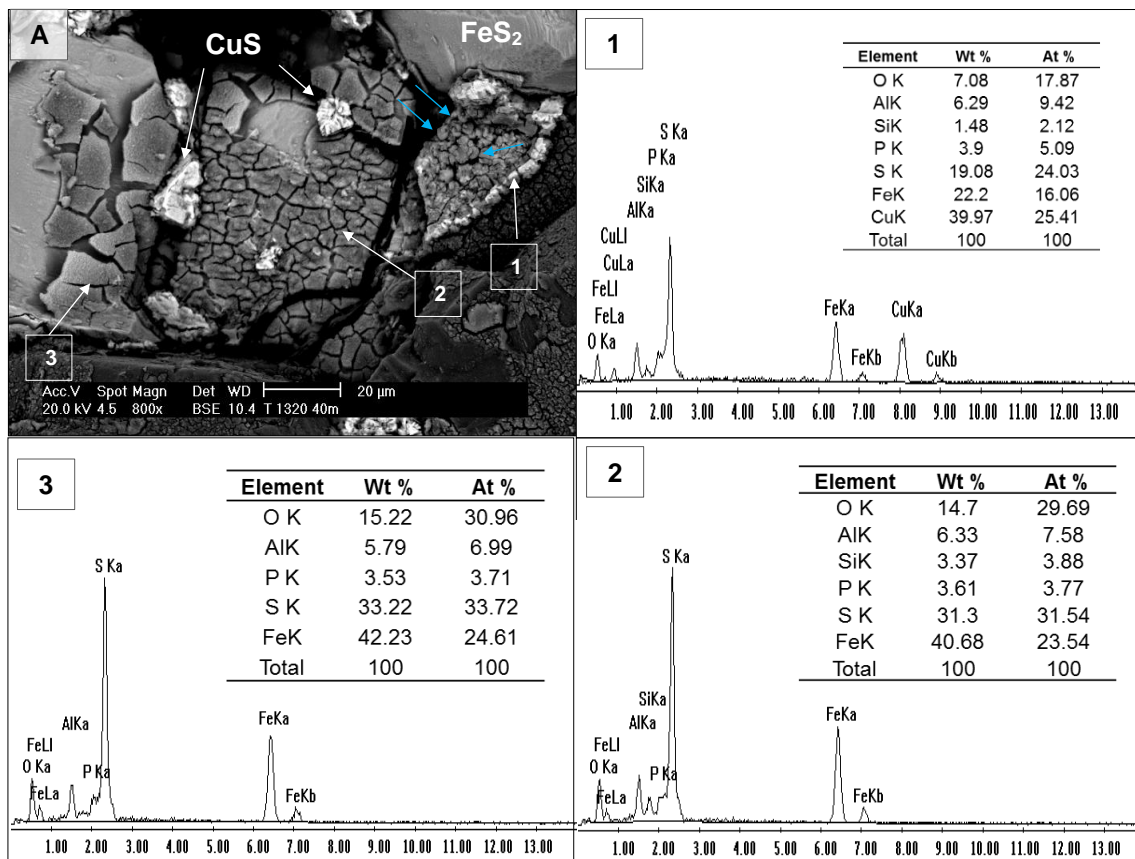


**Figura 43.** Aspecto de la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) donde se ubican canales de oxidación y la formación de oxihidróxidos de hierro que recubren las paredes de los canales y otras extensiones de la superficie de pirita.

En la figura 44 se presenta un punto en la superficie en la que se contrasta la composición elemental de los precipitados secundarios sobre pirita. A pesar de encontrarse a pocos micrómetros de distancia se presentan tres distintas composiciones; la capa de oxidación a la derecha de la fotomicrografía integra Al, Si, P y Cu indicando la posible formación de jarosita [ $\text{KFe}^{3+}_3(\text{OH})_6(\text{SO}_4)_2$ ], mientras

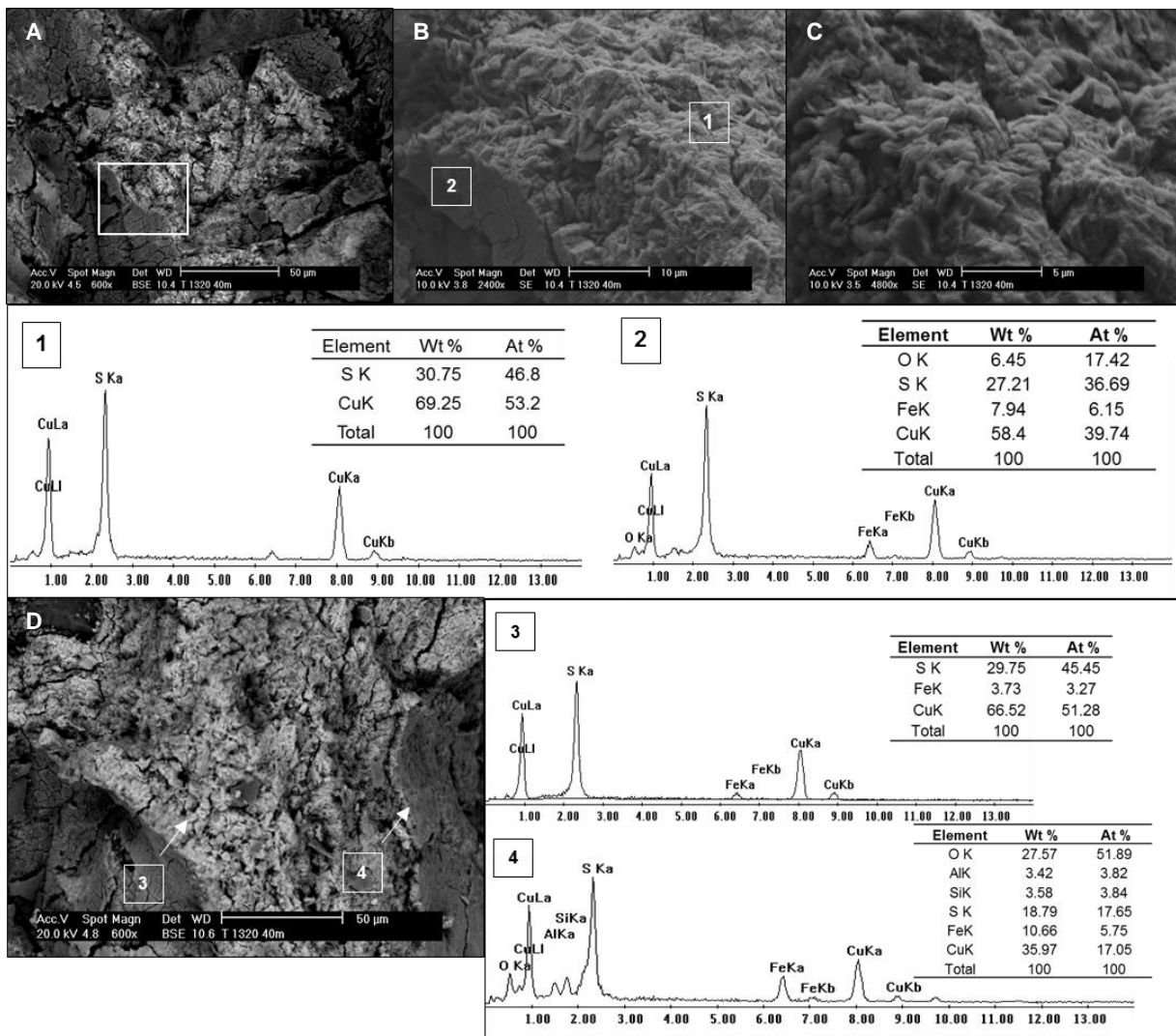


que al centro se encuentra la misma fase mineral, pero sin presentar la incorporación de Cu. Por último, al extremo izquierdo, la capa desarrollada sobre pirita cambia nuevamente en su composición al no incorporar cobre y sílice. Las tres zonas despliegan distintas texturas, además de que se encuentran fragmentándose en diferentes patrones, y de forma más importante, sobre la jarosita que integra cobre parecen posicionarse nuevas formas bacilares apenas perceptibles al revisar la fotomicrografía (señaladas por flechas azules). Sobre los precipitados también se identificó la formación de precipitados de covelita que también se señalan en la imagen.



**Figura 44.** Diferencias en composición en tres capas de alteración de posible jarosita, desarrolladas sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Se observa la incorporación de Cu y Si a los precipitados y como estos se encuentran ausentes a la izquierda de la fotomicrografía. A la derecha de la fotomicrografía se observan formas bacilares señaladas con flechas posicionadas sobre la capa de alteración.

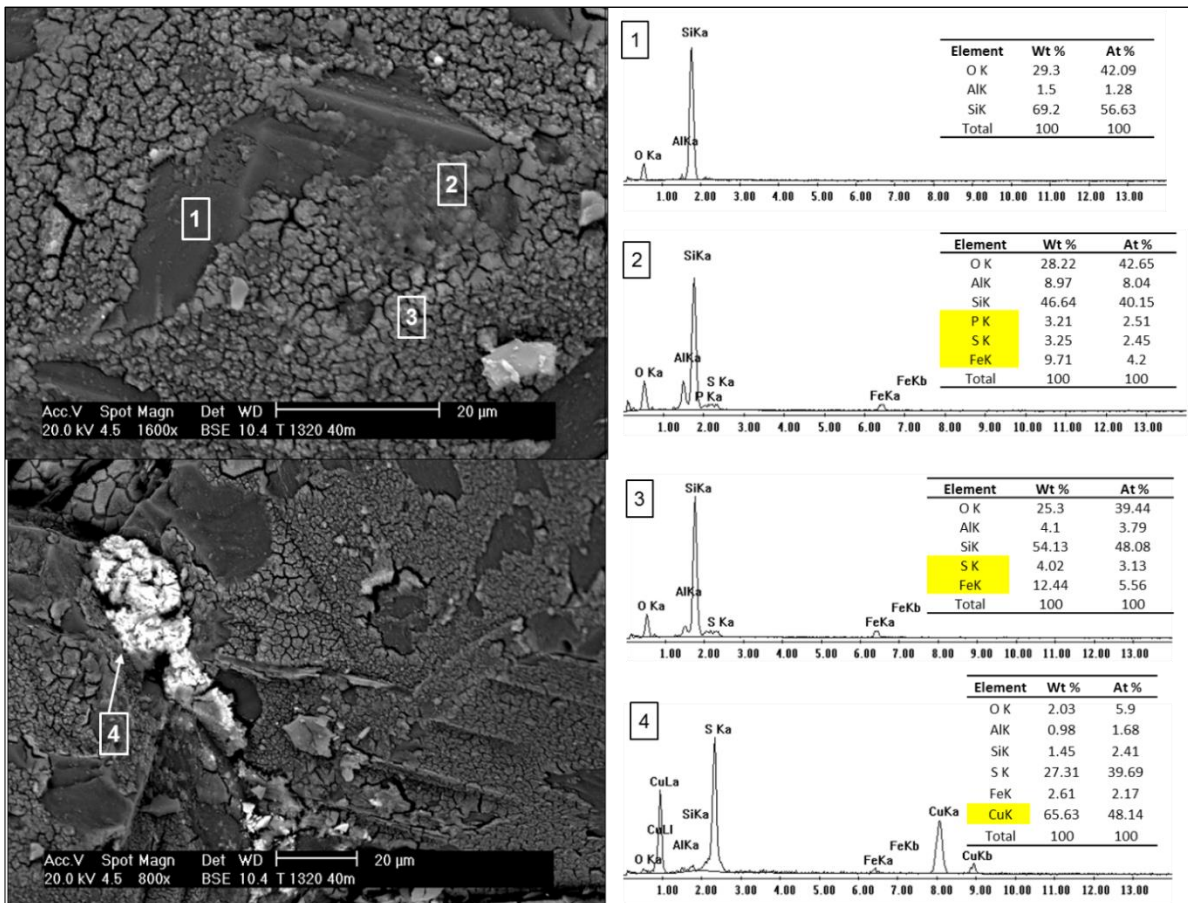
La presencia de cobre a este nivel de profundidad se siguió presentando al observar diferentes precipitados de sulfuros de cobre en grandes extensiones de la superficie en forma de conglomerados, tal y como el que se señala en la figura 45. Presentando la misma morfología en seis puntos de la superficie, estos se conformaban de estructuras tubulares compactas o similares a aquella morfología bacilar de los microorganismos sobrepuestas entre sí (Figura 45C), por lo que podrían encontrarse relacionados en su formación.



**Figura 45.** Formaciones de precipitados de sulfuros de cobre en el nivel 40-50m del terrero 1320. A y D) Características de la agrupación de precipitados de cobre. B y C) A grandes magnificaciones se observa las características morfológicas de la superficie de esta formación, se encuentran estructuras tubulares compactas cohesionadas a través de la partícula. D) Se observa las diferencias en composición y la formación de capas que recubren y delimitan los precipitados de Cu.

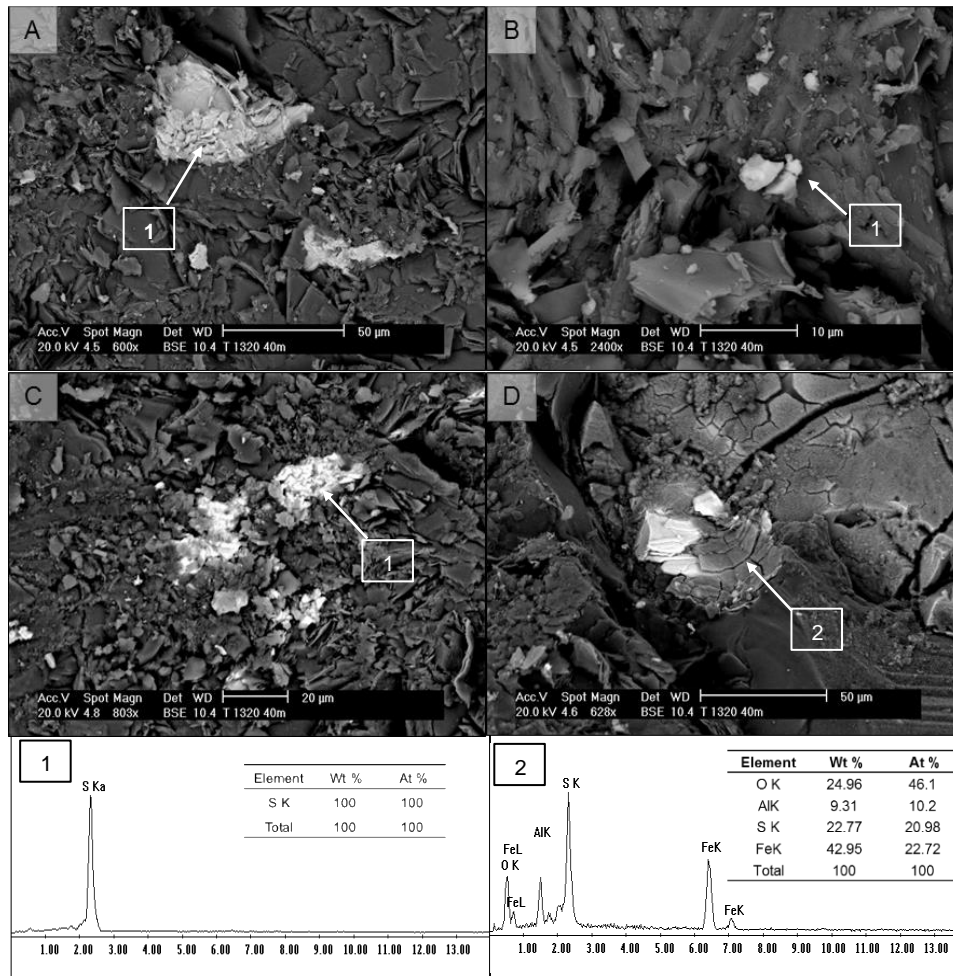
Mediante BSE se observó la diferencia en composición a través de estos, donde principalmente se encontraban como covelita, pero incorporando elementos como Fe, Al y Si. Los precipitados se encontraron delimitados por diferentes capas de óxidos de hierro formadas sobre o a sus alrededores (Figura 45B y 45D), las cuales presentaban variaciones composicionales conforme el punto donde se encontraron, de esta forma encontrando aquellas señaladas en los espectros 3 y 4 de la figura 45.

La formación de minerales secundarios no sólo se presentó en la pirita o sulfuros de cobre, ya que sobre la superficie de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) se encontró la formación de nuevas capas de hidroxisulfatos de hierro, tal como lo indican los análisis químicos puntuales en la figura 46. Recubriendo de la misma forma grandes extensiones de cuarzo, los precipitados incorporaron S (3.25 - 4.02% Wt), Fe (9.71 – 12.44% Wt), P (3.21 % Wt) y Al (0.98 – 8.97 %Wt) además de oxígeno, presentando diferencias texturales relacionadas a su composición a través de la superficie. En la figura 46A se identifican estas variaciones, ya que se presentan zonas con un relieve más uniforme en donde el hierro se presentó en menor abundancia (punto 2), mientras la superficie restante se encuentra fracturada ampliamente, manteniendo una textura semejante a las anteriores formaciones, aumentando el contenido de hierro y la formación de partículas coloidales sobre las capas de alteración desarrolladas en la superficie de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ).



**Figura 46.** Formación de capa de oxihidróxidos de hierro o hidroxisulfatos y precipitados de covelita (CuS) en la superficie de cuarzo (SiO<sub>2</sub>).

Con excepción del nivel 10-20m, en el terrero 1320 no había sido posible encontrar la presencia de partículas de azufre, siendo hasta los 40 m de profundidad en donde pudo apreciarse nuevamente su formación en 5 diferentes puntos. La Figura 47 presenta los precipitados de azufre encontrados, los cuales siempre se encontraron sobre la superficie de silicatos cómo se observa en las primeras tres fotomicrografías; mientras que en el caso de la Figura 47D fue el único caso donde se encontró asociada a los bordes de una partícula de pirita con marcado desarrollo de alteración química sobre su superficie. En esta, incluso se puede observar como en la esquina superior derecha parte de la capa de oxidación antes descrita se desprende de la superficie y cómo es que sobre la partícula de azufre parece encontrarse una capa de similar composición, incluyendo Al, O y Fe de acuerdo con el análisis por EDS número 2 en la Figura 47.



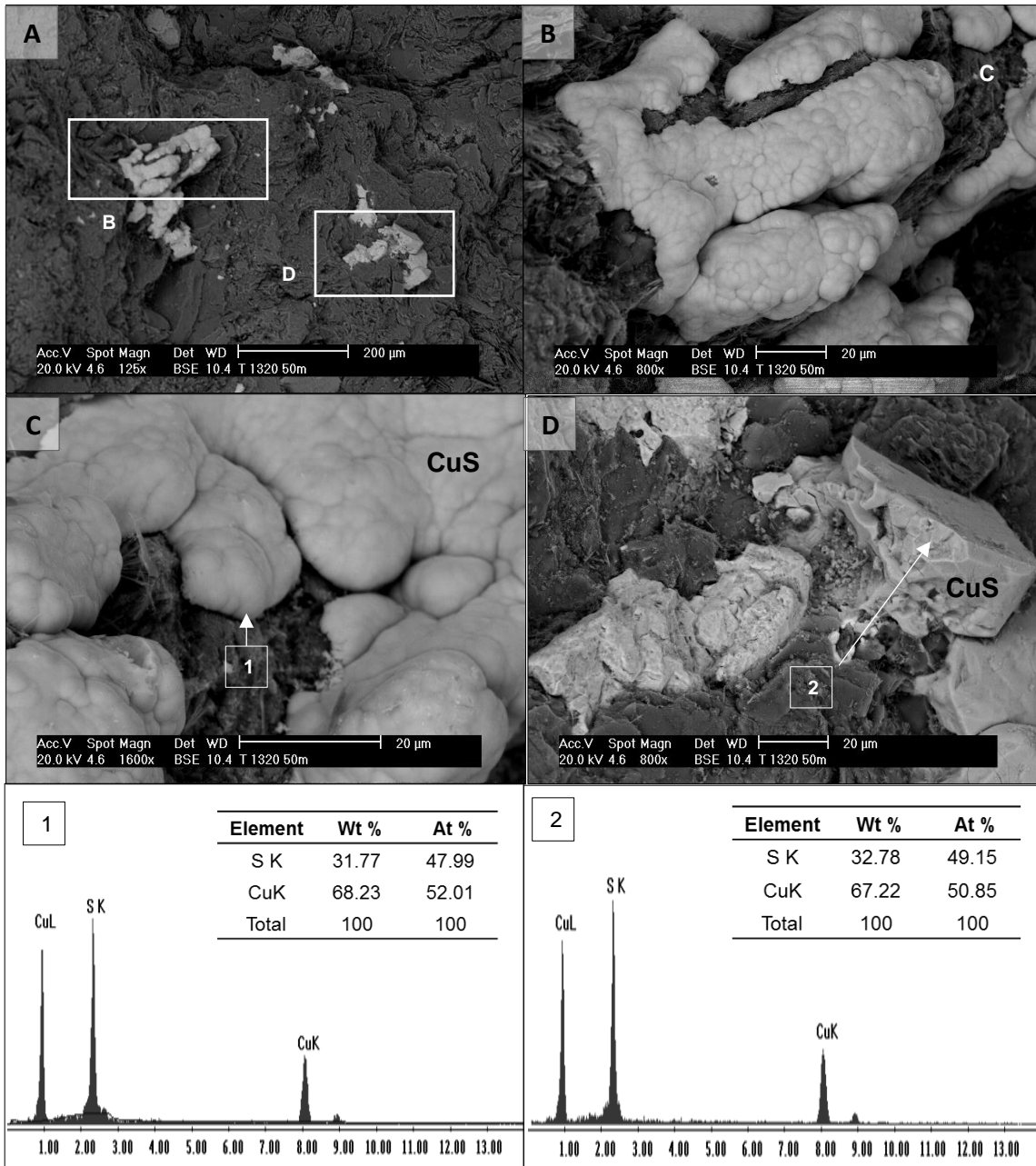
**Figura 47.** Formación de distintas partículas de azufre sobre la superficie de silicatos y pirita en el nivel 30-40m de profundidad del terrero 1320. Las partículas de azufre elemental se encontraron adheridas sobre la matriz de silicatos (A y C), sobre esta (B) o asociada a las partículas de pirita (D).

Continuando con el análisis de las muestras, en el nivel 50 – 60 m de profundidad, se identificaron variantes morfológicas en las partículas de sulfuros de cobre, incluso en aquellas con la misma composición. Es el caso de dos agrupaciones de partículas de covelita en la Figura 48, donde a pesar de encontrarse a pocos micrómetros de distancia, éstas mantienen distintos hábitos cristalinos. Con una morfología botroidal la primera se posiciona directamente sobre la matriz de silicatos (Figura 48B), aparentemente recubriéndola como si se tratara de un precipitado el cual se conformó de las mismas formaciones globulares agrupadas en cada uno de los puntos observados (Figura 48B y 48C). Por otra parte, en la Figura 48D se observan cristales prismáticos de covelita, manteniendo

superficies planas, así como zonas de desgaste, contrastando ampliamente con aquellas descritas anteriormente y las cuales, a diferencia de la anterior agrupación, se encontraban adheridas en la matriz de silicatos.

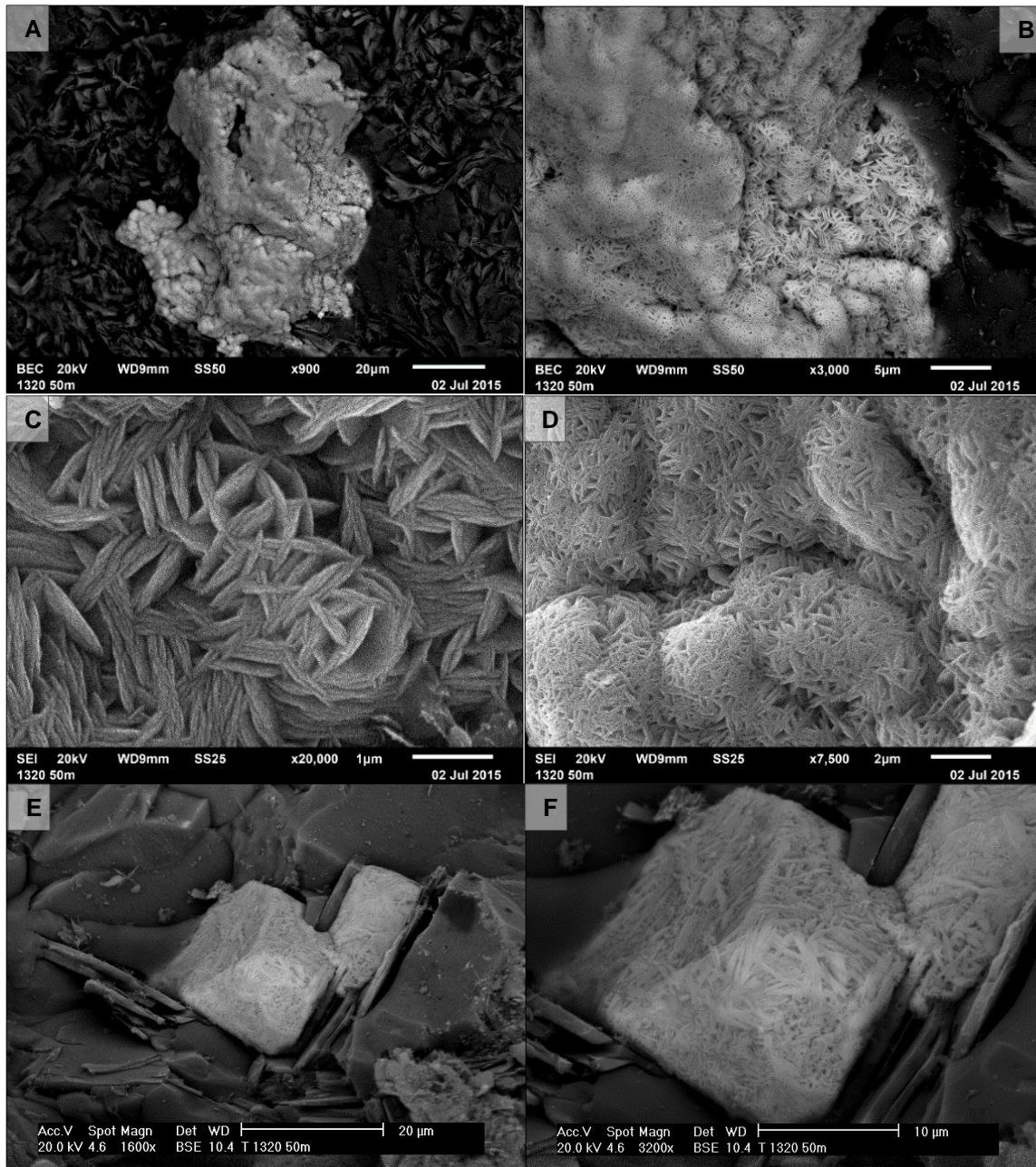
Todas las partículas de cobre observadas en este nivel se encontraron asociadas únicamente a silicatos. La misma composición se siguió exhibiendo en otros puntos, no obstante, la morfología fue nuevamente distinta. Una de estas partículas de covelita es aquella en la Figura 49A, que al ser observada a 3,000x se encontró conformada por la agrupación de un gran número de laminillas entrelazadas que al acumularse brindaban a la partícula un aspecto botroidal, similar a la anterior partícula. Sus características texturales se observan con gran detalle en las fotomicrografías 49B (7,500x) y 49D (20,000x), donde se distingue las diferencias en la acumulación o asociación de las partículas, ya que se observan zonas con extensiones sólidas y otras con cierto grado de porosidad interlaminar (Figura 49B). Así, la partícula está conformada por agrupaciones de cristales de sulfuro de cobre en forma de hojuelas de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 49C), que al entrelazarse forman esferas o semiesferas que gradualmente dan paso a la formación de estructuras de apariencia sólida al acumularse (Figura 49D).

Además de la asociación y conformación de estructuras botroidales, fue posible observar la acumulación y desarrollo de estructuras con hábitos cristalinos prismáticos (Figuras 49E y 49F), los cuales también se componen de cristales de sulfuro de cobre manteniendo la misma composición señalada para la covelita, y la capacidad de adoptar nuevas morfologías. A pesar de la peculiar conformación que mantienen y de que se observaron zonas de desgaste y alteración morfológica en algunas partículas de covelita, solamente en una de éstas se encontró la presencia de microorganismos, tal y como se señala con mayor detalle en la siguiente sección en la Figura 119. Lo anterior es de especial interés debido a que se observa la transformación de la calcopirita a calcocita y covelita, y la potencial relación de los microorganismos con este proceso.



**Figura 48.** Partículas de covelita (CuS) en el nivel 50-60m del terrero 1320. A) Ubicación de covelita en la matriz de silicatos. B y C) Características de covelita con un hábito botroidal. D) Se observa una nueva partícula de covelita con una morfología prismática totalmente diferente a la anterior.

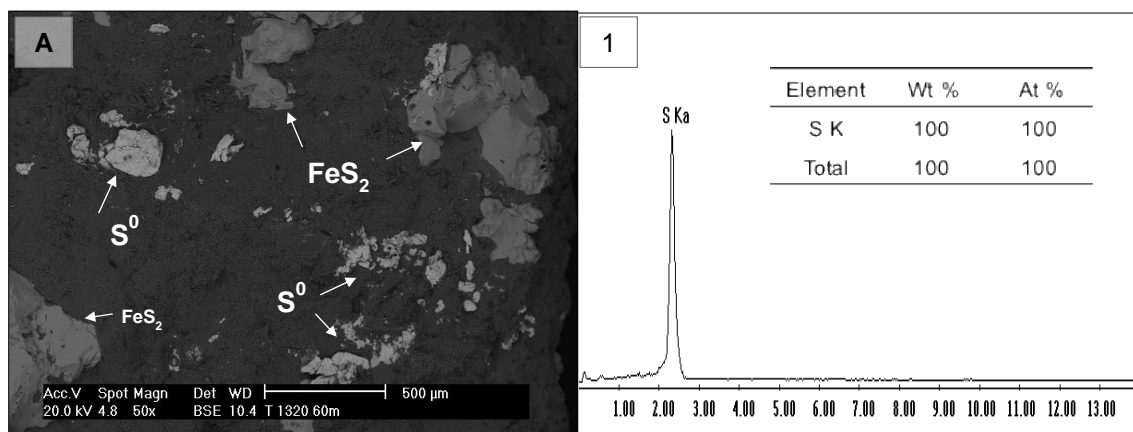




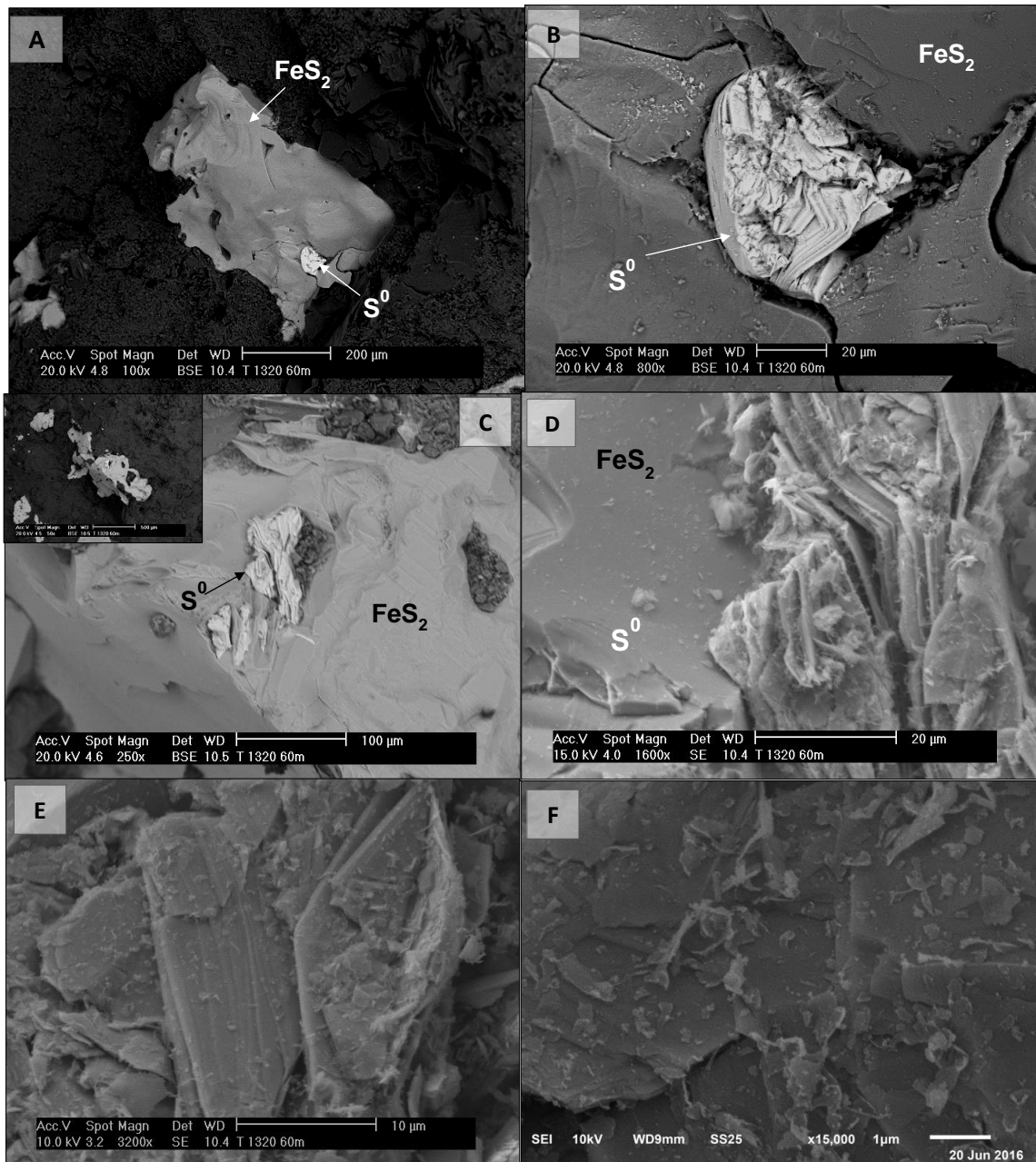
**Figura 49.** Características morfológicas y texturales de partículas de covelita en el nivel 50-60m del terrero 1320. A) Partícula de covelita asociada a silicatos. B) Superficie de CuS a 3,000x en donde se aprecia sus características texturales y como es que se compone de pequeños filamentos y laminillas. C y D) Acercamiento a los cristales de CuS que mantienen una 1  $\mu\text{m}$  de longitud. D) Se observa su agrupación y entrelazamiento formando superficies con aspecto sólido. E) Partículas de CuS con hábitos prismáticos compuestas diferentes cristales entrelazados y superpuestos que adoptan una nueva morfología con respecto a las anteriores.



En el nivel 60-70 m se identificó la mayor formación de azufre con respecto a los niveles anteriores del terrero. Las partículas de azufre se encontraron asociadas tanto al mineral de ganga (silicatos) como a partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ), exhibiendo una distribución y morfología específica. Partículas cercanas a los 100  $\mu\text{m}$  se encontraron asociadas a la matriz de silicatos adheridas de forma diseminada, mientras que el azufre asociado a pirita se encontró como precipitados en defectos de su superficie, tal y como se aprecia en las Figuras 51A y 51C. Estos mostraron dimensiones de entre 25 a 60  $\mu\text{m}$  de extremo a extremo, presentando una morfología característica que consistía de la formación de capas que se apilaban una sobre otra de forma paralela o incluso perpendicularmente a la superficie de pirita, ya que se encontraban posicionados sobre orificios o imperfecciones en la superficie adaptándose sus dimensiones y morfología, como ocurre con mayor claridad en tres puntos de la partícula en la Figura 51C. Sin ocupar puntos de la superficie circundante, uno de los precipitados de azufre elemental se observa a mayores magnificaciones en las Figuras 51D y 51E, encontrando diversas formaciones laminares de azufre que adoptan el relieve de la superficie, se observan con mayor claridad a una magnificación de 15,000x (Figura 51F) las características del precipitado de azufre, compuesto por varias láminas de distinto espesor en el orden de nanómetros, incluso se encuentran fragmentos laminillas desprendiéndose de las capas de mayor espesor.



**Figura 50.** Precipitados de azufre elemental en la superficie de pirita y en la matriz de silicatos en el nivel 60-70m del terrero 1320. A) Ubicación de partículas de azufre y pirita en la muestra.



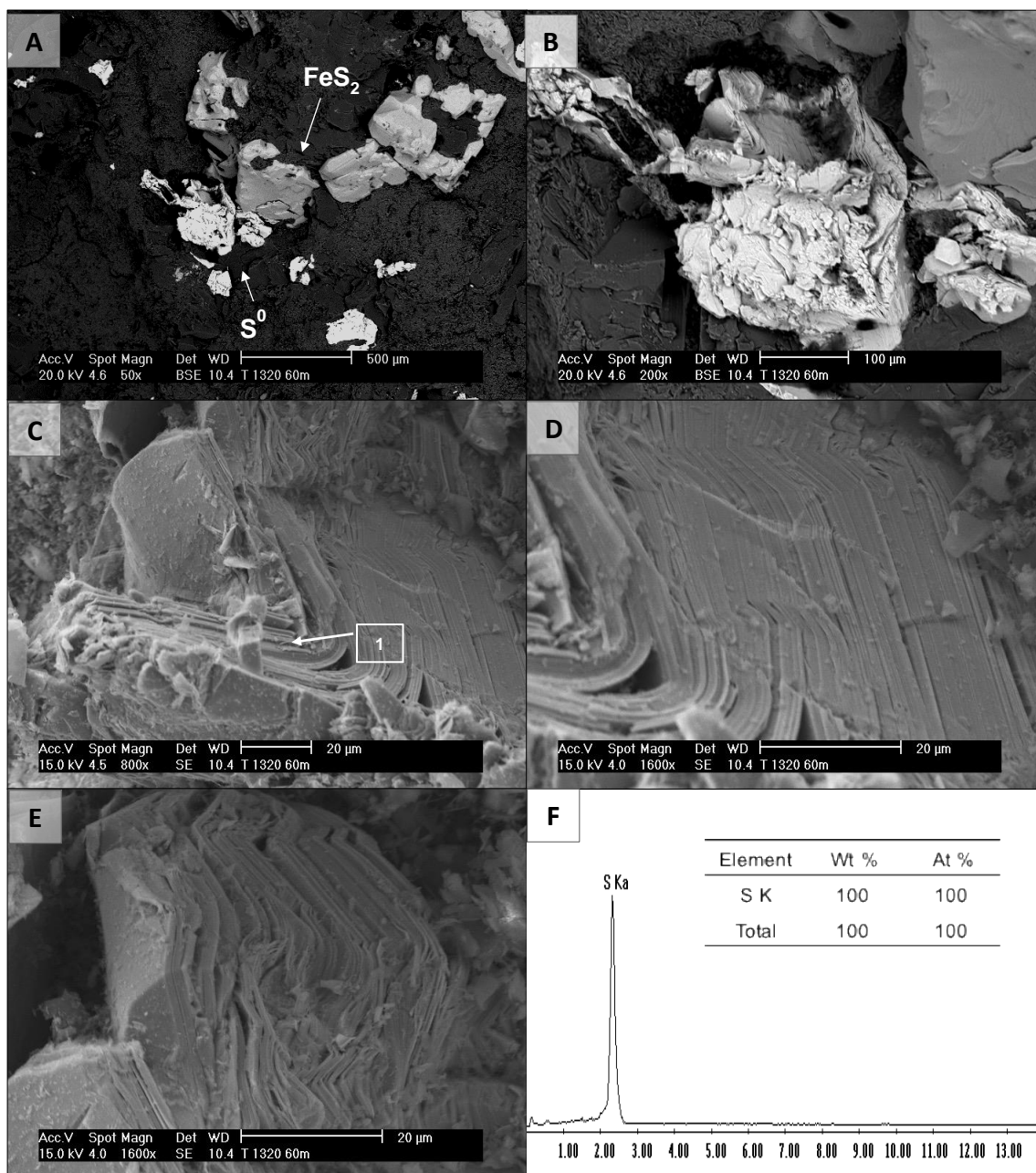
**Figura 51.** Precipitados de azufre elemental en la superficie de pirita y en la matriz de silicatos en el nivel 60-70m del terrero 1320 (continuación). B y C) Precipitados laminares de azufre sobre una concavidad de pirita. D y E) Características morfológicas de azufre elemental formado en la superficie de pirita a 15,000x.

Además de estos, el azufre se presentó en los bordes de las partículas de pirita asociada directamente a ella o sobre la matriz de silicatos inmediata, manteniendo en algunos casos mayores dimensiones en comparación a los anteriores precipitados (Figura 52). Mediante electrones secundarios (SE), en las

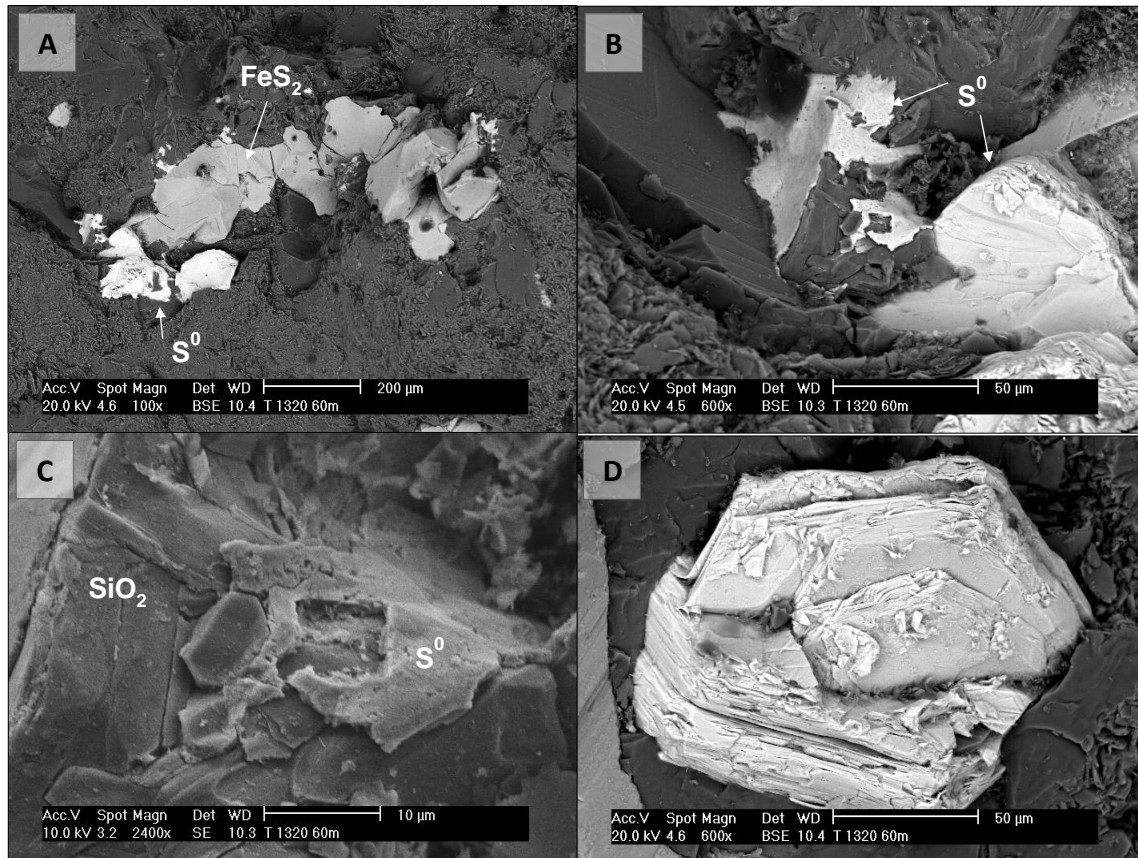
figuras 52C, 52D y 52E se aprecia con gran detalle las características de una de estas partículas, donde se observa cómo es que se conforman por un grupo de láminas superpuestas una sobre otra y que adoptan una morfología en base a los puntos de oxidación en los que se encuentran, formando estructuras curvas y que no son totalmente rectas o paralelas entre sí como se observa con mayor claridad en la Figura 52E.

Uno de los principales factores que coadyuvan a una menor eficiencia en la disolución de los sulfuros es la pasivación de su superficie por la formación de productos secundarios, evitando así la difusión y el transporte de los agentes oxidantes hacia su superficie. El azufre elemental es uno de los principales productos señalados como potenciales causantes de esta problemática. En este caso, a pesar de encontrar partículas de azufre en el nivel 60-70m, no se presentó recubriendo la superficie de la pirita o calcopirita, siendo identificado de esta manera únicamente sobre cuarzo, tal y como se señala en la Figura 53. Las fotomicrografías muestran un conjunto de partículas de azufre a un costado de pirita asociada a la matriz de silicatos, donde se aprecia una diferencia morfológica en el azufre (Figura 53B), al formar una película que recubre al cuarzo, adoptando la morfología de esta partícula tal y como se observa en la Figura 53C. A pesar de ser una capa sólida en ciertas zonas, en su superficie se encuentran fracturas y orificios, confiriéndole cierta porosidad.

Es importante señalar que tras examinar las anteriores partículas de azufre no se observó la presencia de microorganismos sulfo oxidantes en su superficie, situación que era probable sucediera debido a que representan un sustrato idóneo para organismos como *Acidithiobacillus thiooxidans*, presente en el terrero. No obstante, la producción de azufre elemental se encuentra asociado a la actividad microbiana tras la oxidación de las fases minerales o a la de sulfatos en la solución del medio, lo cual explicaría la presencia de estas partículas sobre la matriz de silicatos o incluso cerca de la pirita, ya que se estaría precipitando a partir de la solución del medio, sin hacerlo directamente como un producto intermedio de la oxidación directa de la superficie.

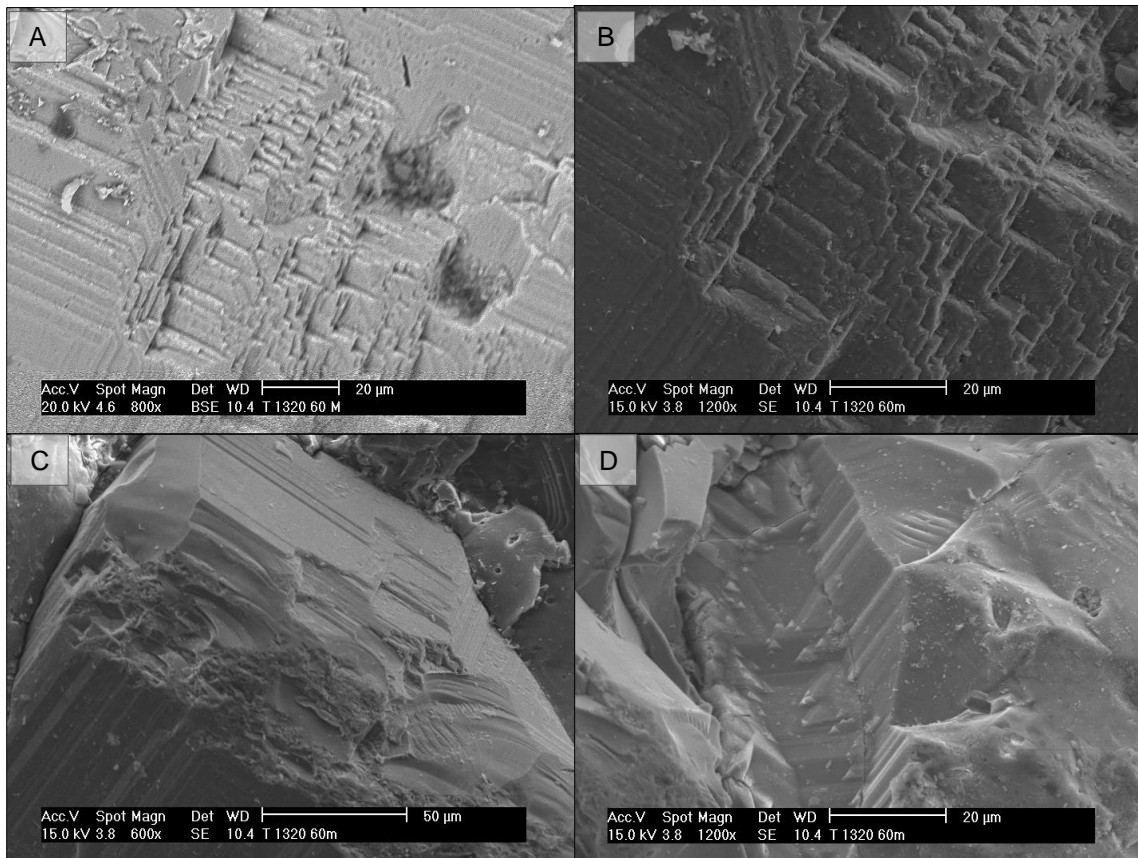


**Figura 52.** Precipitados de azufre elemental en los límites de pirita (FeS<sub>2</sub>). A) Ubicación de partículas de pirita y azufre. B) Partícula de azufre localizada junto a un extremo de pirita. C-E) Características morfológicas de los precipitados de azufre, se observa la integración de estructuras laminares sobrepuestas que adoptan distintas disposiciones conforme la partícula se deposita sobre la superficie. F) Análisis químico puntual por EDS que señala como azufre las anteriores partículas.



**Figura 53.** Precipitados laminares de azufre sobre cuarzo (SiO<sub>2</sub>). A) Ubicación de las partículas de interés. B) Diferentes precipitados de azufre asociados a la matriz de silicatos. C) Formación de precipitados laminares sobre cuarzo (SiO<sub>2</sub>), se observa una estructura parcialmente compacta. D) Partícula de azufre incrustada en cuarzo que presenta morfología laminar.

La mayoría de las partículas de pirita en la muestra presentaron desarrollo de clivaje además de exhibir fracturas en su superficie. A pesar de no ser un desarrollo avanzado en la mayoría de las partículas, en la Figura 54 se observan las características más sobresalientes en este nivel, sobre las que no fue posible identificar la presencia de microorganismos.



**Figura 54.** Desarrollo de clivaje en pirita en el nivel 60-70m de profundidad en el terrero 1320.

El último nivel del terrero 1320 comprende los 70 a 80 m de profundidad, el cual presentó distintas características con respecto a los anteriores niveles, ya que en este no se encontraron partículas de pirita y se presentó una baja abundancia de otros sulfuros metálicos como la calcopirita. No obstante, se observó la alteración de este sulfuro de cobre y la formación de diferentes oxihidróxidos de hierro que adoptaron distintas morfologías sobre la matriz de silicatos; principalmente en bordes o huecos de la superficie precipitados esféricos o semiesféricos de óxidos de hierro unidos entre sí, formando agregados de mayor tamaño (Figura 55), mientras que en zonas de la muestra con un relieve más uniforme se presentaron como capas que recubrieron amplias zonas de silicatos (Figura 56).

Dentro y en bordes de concavidades en la matriz de silicatos se registraron diversas agrupaciones de partículas esféricas entre 1 a 2  $\mu$ m de diámetro, y cuya textura superficial, en la que aparentan desplegarse fibras a partir de esta; asemeja

a las típicas características morfológicas señaladas para schwertmannita (Figura 55B y 55C) (Liao et al., 2009). A pesar de que mediante EDS la composición mineralógica de esta fase secundaria no puede determinarse de forma exacta, su composición elemental para Fe (54.21% Wt), O (25.01% Wt) y S (5.68% Wt), llevaría a señalarla como schwertmannita  $[\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{6-4.5}(\text{SO}_4)_{1-1.75}]$  debido a su similitud química y morfológica. Este hidroxisulfato de Fe(III) se ha asociado a la presencia y a la actividad de microorganismos acidófilos, siendo una de las primeras fases de Fe(III) en precipitar durante la oxidación de sulfuros de hierro, además de la ferrihidrita  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ . Durante el análisis por EDS de éstas y otras partículas de similar morfología y composición, se detectó la presencia de Al, Si, Mg y P, lo cual podría ser explicado por la composición de la solución del medio en el que se encuentra la muestra, al haber sido liberados debido a la disolución del mineral de ganga o debido a que se encuentran formando parte del medio nutritivo que acompaña a las bacterias al ser inoculadas en los terreros. La presencia de fósforo (P) en las diferentes capas y productos secundarios como jarosita en este y a los 10-20 y 40-50 m de profundidad, es también un importante nutriente para bacterias. A través de los análisis por DRX no fueron identificados fases minerales que mantuvieran P; sin embargo, mediante EDS se identificó la presencia de apatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$  en otros niveles de profundidad en el terrero, partículas que incluso se encontraron cerca de una formación y desarrollo de biopelícula.

La formación de fases secundarias de óxidos de hierro con morfología laminar se presenta en las Figuras 56 y 57, las cuales recubren de forma heterogénea la superficie de silicatos por extensiones mayores a los 600  $\mu\text{m}$  de longitud. Contando con morfología asimétrica y elongada, en la Figura 56B se observa cómo es que no se trata de una capa sólida completamente, sino que dos capas sólidas se encuentran superpuestas una sobre la otra y en el medio de estas se encuentra un precipitado con una textura fibrilar (Figura 56C), siendo posible detectarlo ya que se encuentran zonas donde la capa superior se ha desprendido, e incluso se puede detectar un cambio en su composición. Cubriendo otras zonas de la superficie, en la Figura 57 se observan nuevas formaciones laminares de óxidos de hierro, en esta ocasión adoptando diferentes espesores y disposiciones.

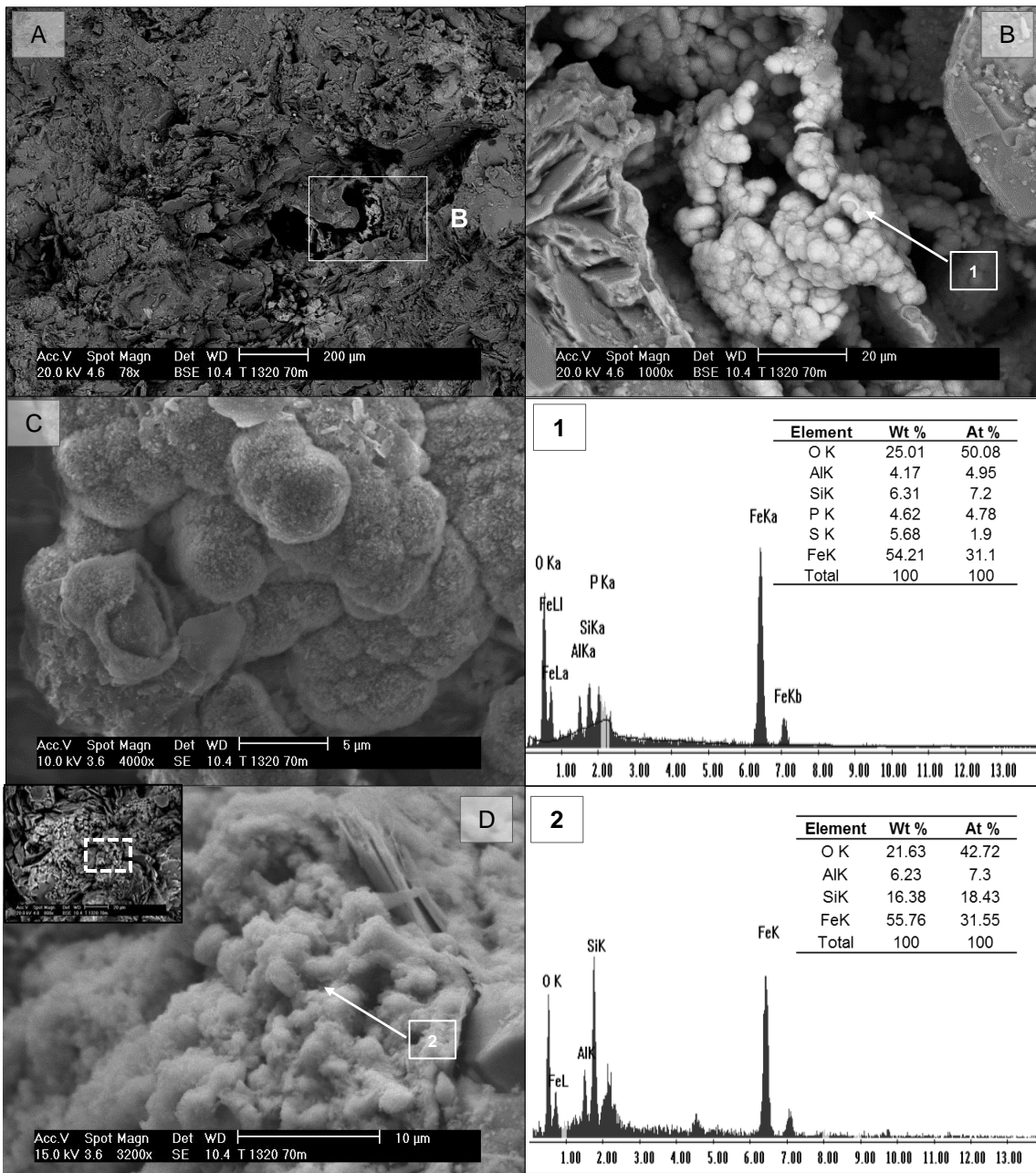
Sobre una de las láminas de 6  $\mu\text{m}$  espesor posicionada de forma perpendicular a la superficie se encuentra un conjunto de estructuras bacilares de 2  $\mu\text{m}$  de longitud que, debido a sus similares dimensiones y a que la mayoría están aisladas una de otra como las 14 formas bacilares de las Figuras 57B y 57C, podrían tratarse de microorganismos, aunque es importante considerar otro posible origen para estas, debido a las características que han presentado los anteriores precipitados. Por otra parte, una nueva agrupación laminar se señala en la Figura 57D, donde se encuentran esferas o semiesferas y agrupaciones de las mismas en la superficie cuya composición indicaría la formación de jarosita potásica. La morfología de esta fase es similar a aquella sintetizada en laboratorio por Sasaki (2004), en un ambiente mediado por *Acidithiobacillus ferrooxidans*, obteniendo precipitados framboidales similares a los que se observan en el nivel 70-80m, por lo que es posible señalar la influencia de los microorganismos tanto en su formación como en la morfología que terminarían presentando.

Las fotomicrografías en las Figuras 57, 58 y 59 buscan remarcar las diferentes características texturales y químico-mineralógicas que distintas formaciones de jarosita que se siguieron presentando a esta profundidad, formadas nuevamente sobre la matriz de silicatos, ocupando diversas zonas de aparente alteración, como concavidades y defectos en la superficie, posiblemente generados por las condiciones de acidez del medio. Se encontraron principalmente como formaciones laminares y en ciertos puntos, framboidales que recubren las paredes de partículas de silicatos cercanos a los puntos de alteración, como se observa en la Figura 59A. Presentando un menor espesor con respecto a los anteriores casos, la formación se compone de un gran número de semiesferas aparentemente depositadas o generadas sobre esta, las cuales mantienen una textura de características fibrilar y a su vez, incorporan nuevos elementos como magnesio (Mg) y titanio (Ti) (7.03 Wt%).

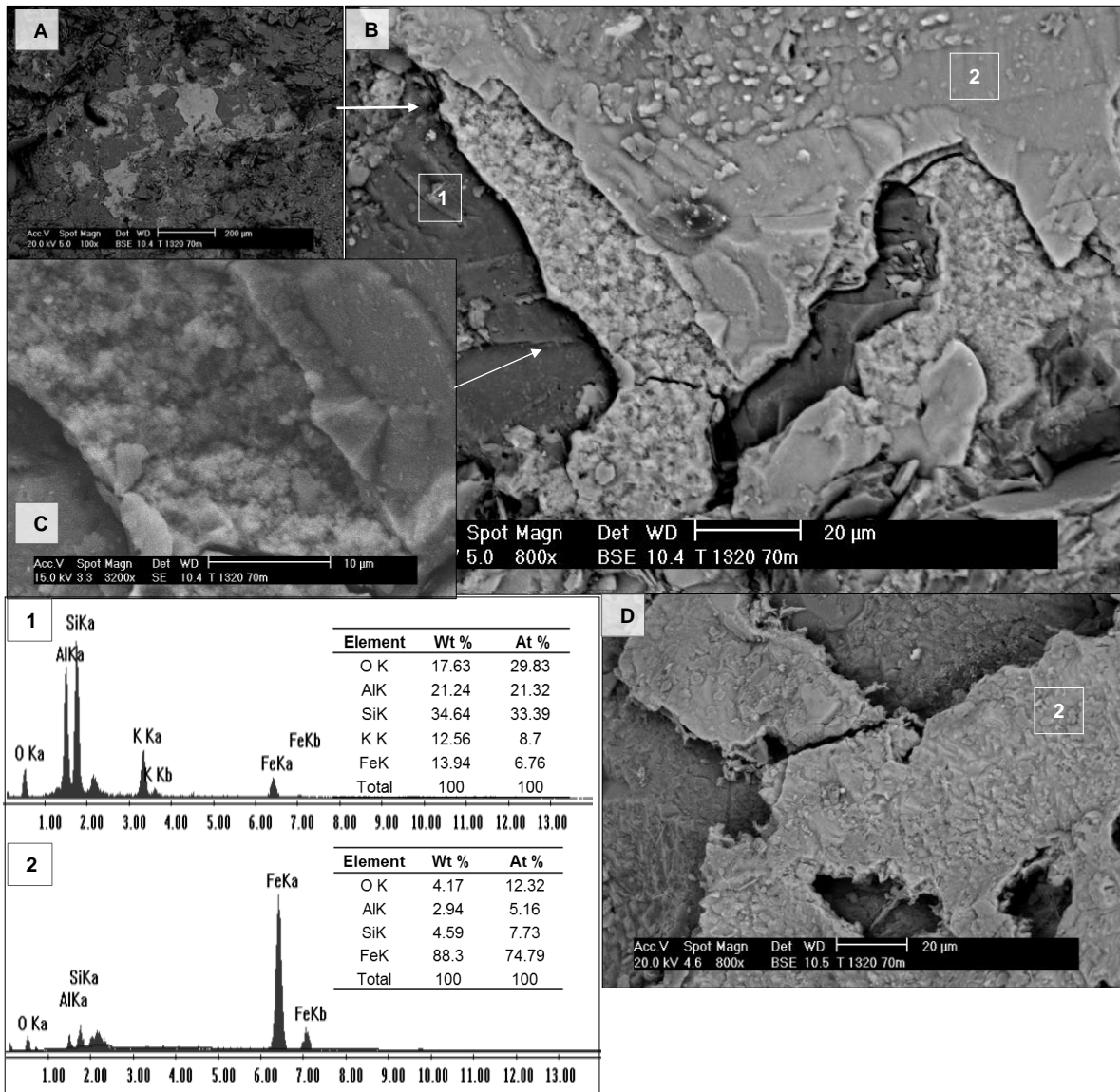


La siguiente formación de jarosita (Figura 59C) mantiene una textura distinta a pesar de su similar composición a la anterior, con la excepción de la inclusión de Cu (2.02 Wt%). Sin exhibir el mismo relieve que la anterior, no se presenta la misma formación de estructuras botroidales en la capa que se observa en la Figura 59D. Sin la integración de los anteriores elementos minoritarios en su estructura, la formación de jarosita se registra por mayores extensiones en forma de precipitados laminares que recubren la superficie de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ), tal como lo evidencia la Figura 59E. Presentando una composición similar a la de la jarosita potásica, sin la integración de Ti u Cu, mantienen una textura distinta, al mostrar un relieve con mayor uniformidad sin la formación de estructuras esféricas o semiesféricas. Su desarrollo coincide con formaciones y defectos en la superficie de cuarzo, donde de igual forma que las agrupaciones de schwertmannita, en oquedades en la matriz de silicatos se encuentra la formación de scheelita ( $\text{CaWO}_4$ ), cuya partícula exhibe un hábito piramidal en sus bordes, característico para los cristales de esta fase mineral en la que parece también integrarse Fe.

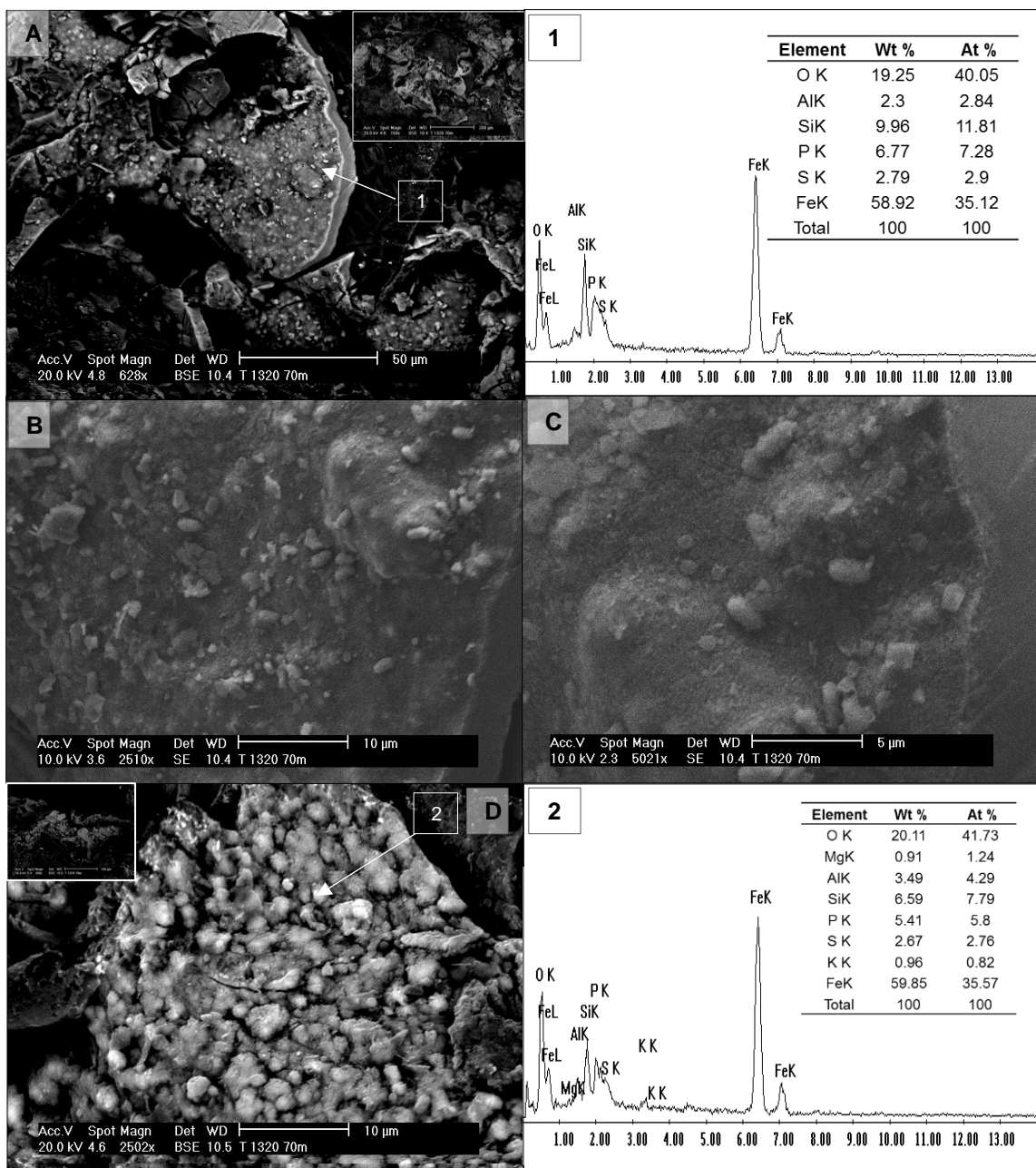
Además de la constante formación de fases de oxihidróxidos o hidroxisulfatos de hierro, también se presentó la formación de otras fases minerales como cristales de sulfato de calcio o yeso [ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] tipo selenita, de 30 o más micrómetros de longitud con espesores en ocasiones variables menores a  $1 \mu\text{m}$ , los cuales se encontraban dispuestos sobre la superficie de cuarzo o formando agregados radiales o divergentes (Figura 60), teniendo como base las partículas de silicatos desde los cuales se desplegaban.



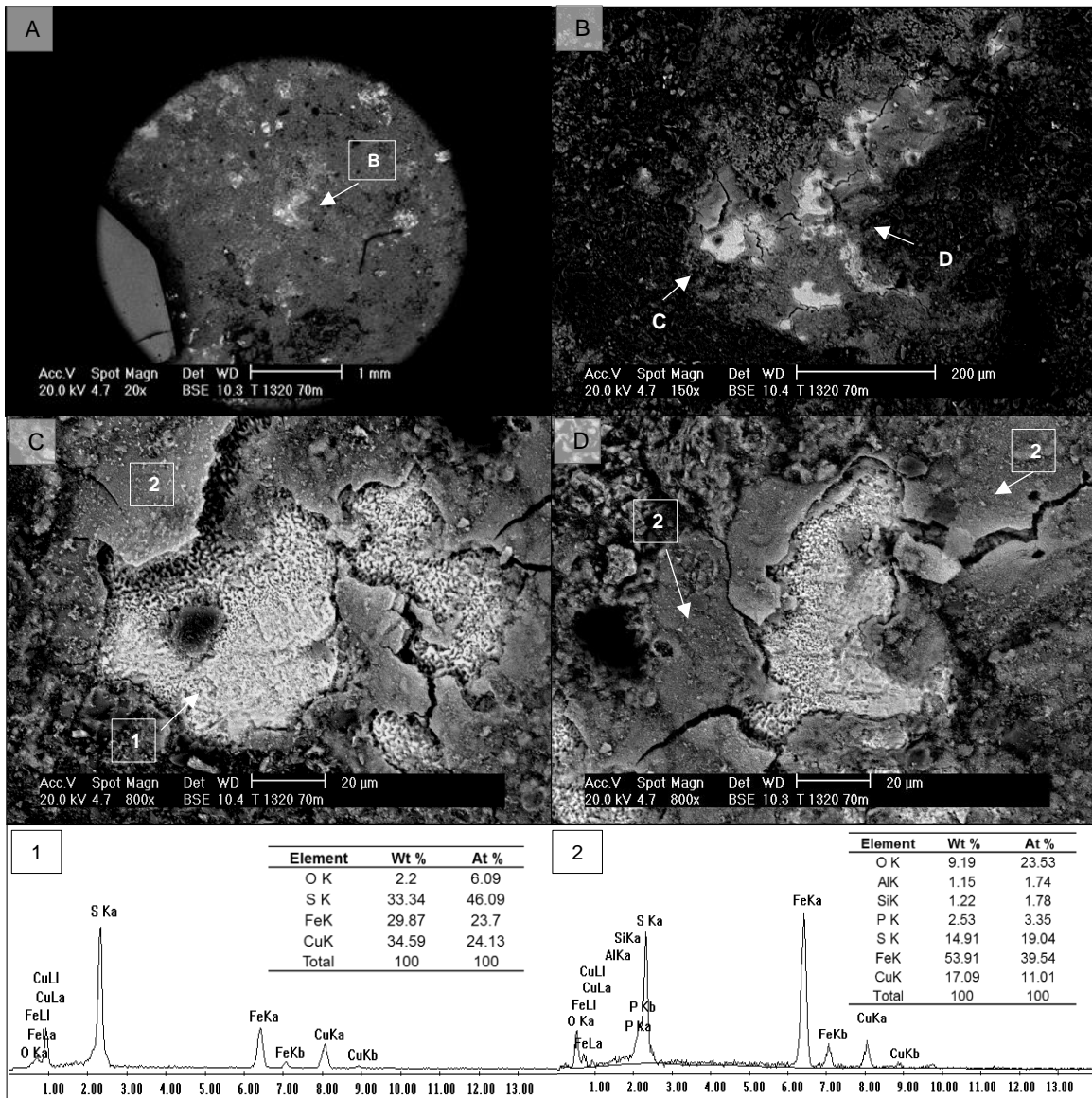
**Figura 55.** Precipitados esféricos de schwertmannita  $[\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{6-4.5}(\text{SO}_4)_{1-1.75}]$  en el nivel 70-80 m del terrero 1320.



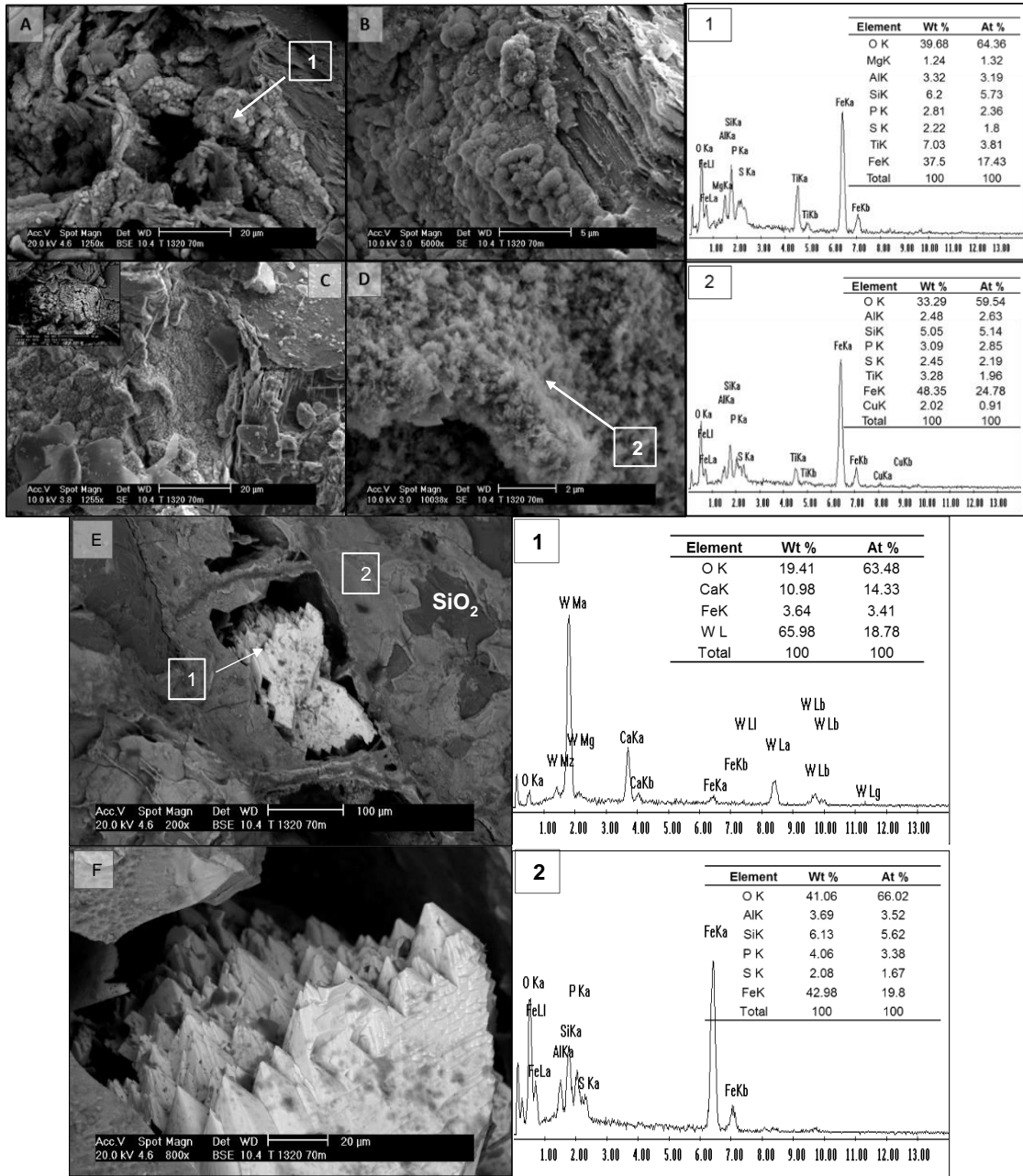
**Figura 56.** Precipitados de óxido de hierro sobre la matriz de silicatos en el nivel 70-80 m del terrero 1320. A) Ubicación de los precipitados a 100x. B) Capa de óxido de hierro sobre la superficie de silicatos. Esta se compone de dos láminas posicionadas una sobre otra, donde también se observa el desprendimiento de la lámina superior. C) Aspecto de los precipitados de hierro entre las capas sólidas de FeO, el cual mantiene una textura fibrosa. E) Formaciones de óxidos de hierro de similares características a la fotomicrografía (B) que se extienden en amplias extensiones en otros puntos de la muestra.



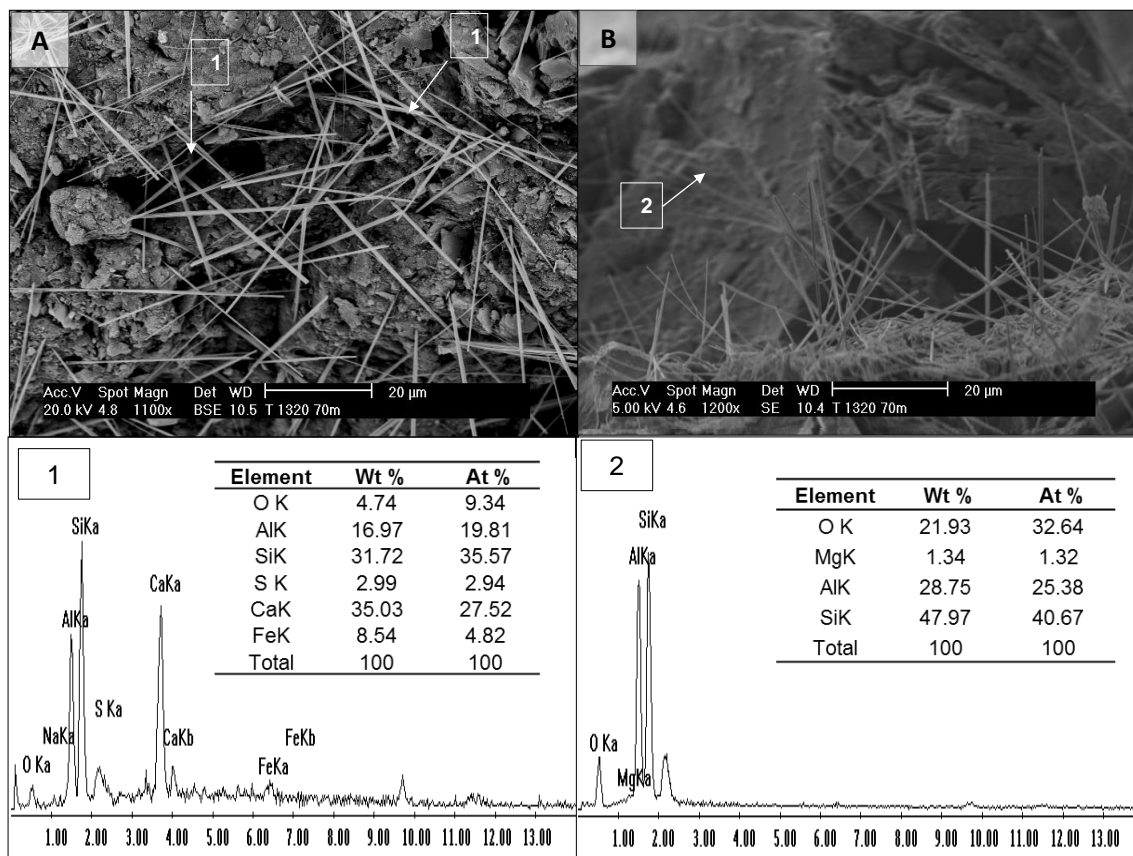
**Figura 57.** Formación de precipitados laminares de óxido de hierro sobre la superficie de silicatos en el nivel 70-80 m del terrero 1320. A) Precipitados de óxidos de hierro laminares. B) Magnificación a 2,510x de la superficie, se observan diferentes formas similares a las bacilares. C) Acercamiento a la superficie a 5,021x, se distingue con mayor detalle la incorporación de las estructuras a la superficie que mantiene cierto grado de alteración. D) Formación de Jarosita, conformada por precipitados semiesféricos agrupadas sobre la superficie mineral.



**Figura 58.** Calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) alterada incrustada en la matriz de silicatos en el nivel 70-80 m del terrero 1320. A) Localización de las partículas de interés. B) Aspecto de la partícula de calcopirita alterada, se observa el desarrollo de capas de alteración que recubren su superficie. C y D) Superficie de calcopirita desgastada en la que se observan distintos grados de alteración morfológica y química, sobre la que se encuentran productos secundarios. La generación de una capa de oxidación corresponde potencialmente a jarosita que se encuentra fracturada y desprendiéndose parcialmente. Los análisis puntuales por EDS 1 y 2 señalan el estado de alteración de la calcopirita y la composición de la capa de alteración desarrollada sobre esta.



**Figura 59.** Precipitados de Jarosita y partícula de Scheelita ( $\text{CaWO}_4$ ) en el nivel 70-80 m del terrero 1320. A) Formaciones laminares y framboidales de jarosita que recubren distintos puntos de la superficie de la matriz de silicatos. Las características texturales de las partículas mantienen distinciones al mismo tiempo que ocurren diferencias en su composición. E y F) Partícula de Scheelita ( $\text{CaWO}_4$ ) en una concavidad de la matriz de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) y la formación de jarosita sobre esta.

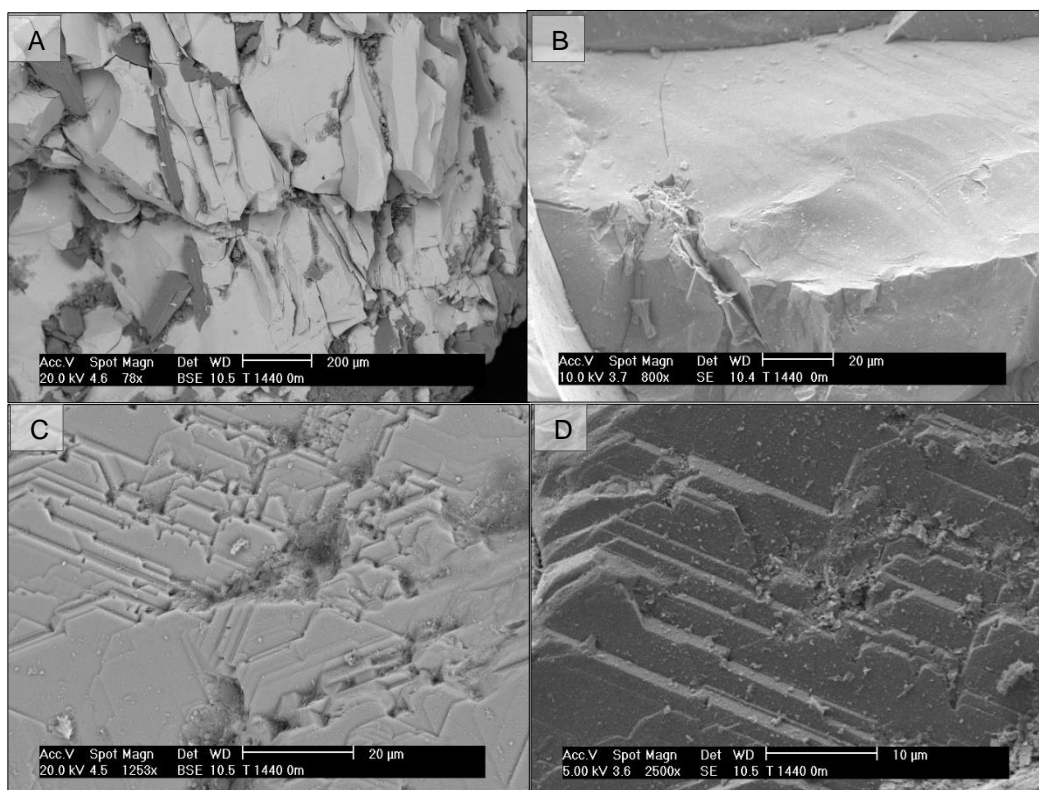


**Figura 60.** Agrupaciones de cristales de yeso [ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] (selenita) en el nivel 70-80 m del terrero 1320.



#### 4.1.1.2 Terrero 1440

En el nivel 0 – 10m del terrero 1440 se presentaron distintos grados de alteración para la pirita. A pesar de que la mayoría de la superficie explorada mostró relieves con escasa alteración (Figura 61A y 61B), de manera localizada se presentó el desarrollo de clivaje (Figura 61C y 61D). Así mismo, se registró la formación de fases secundarias de sulfuros de Cu-Zn que recubrían la mayoría de la superficie de pirita expuesta en la Figura 62A y 62B. Las fases minerales secundarias adoptaron la morfología de la superficie de las partículas de pirita sobre la que se sobreponían, recubriéndola parcialmente o en su totalidad como se observa en ciertos puntos en la fotomicrografía 62A. En forma de precipitados laminares que presentaron distintos espesores y morfología, la fotomicrografía 62C permite observar el recubrimiento parcial de la superficie y cómo la fase de Cu-S forma una capa compacta de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de espesor, mientras que en la figura 62D la formación de sulfuros de Cu-Zn mantiene un menor espesor, presentando líneas de fracturas y cierto grado de porosidad, así como aquellos en la Figura anterior.

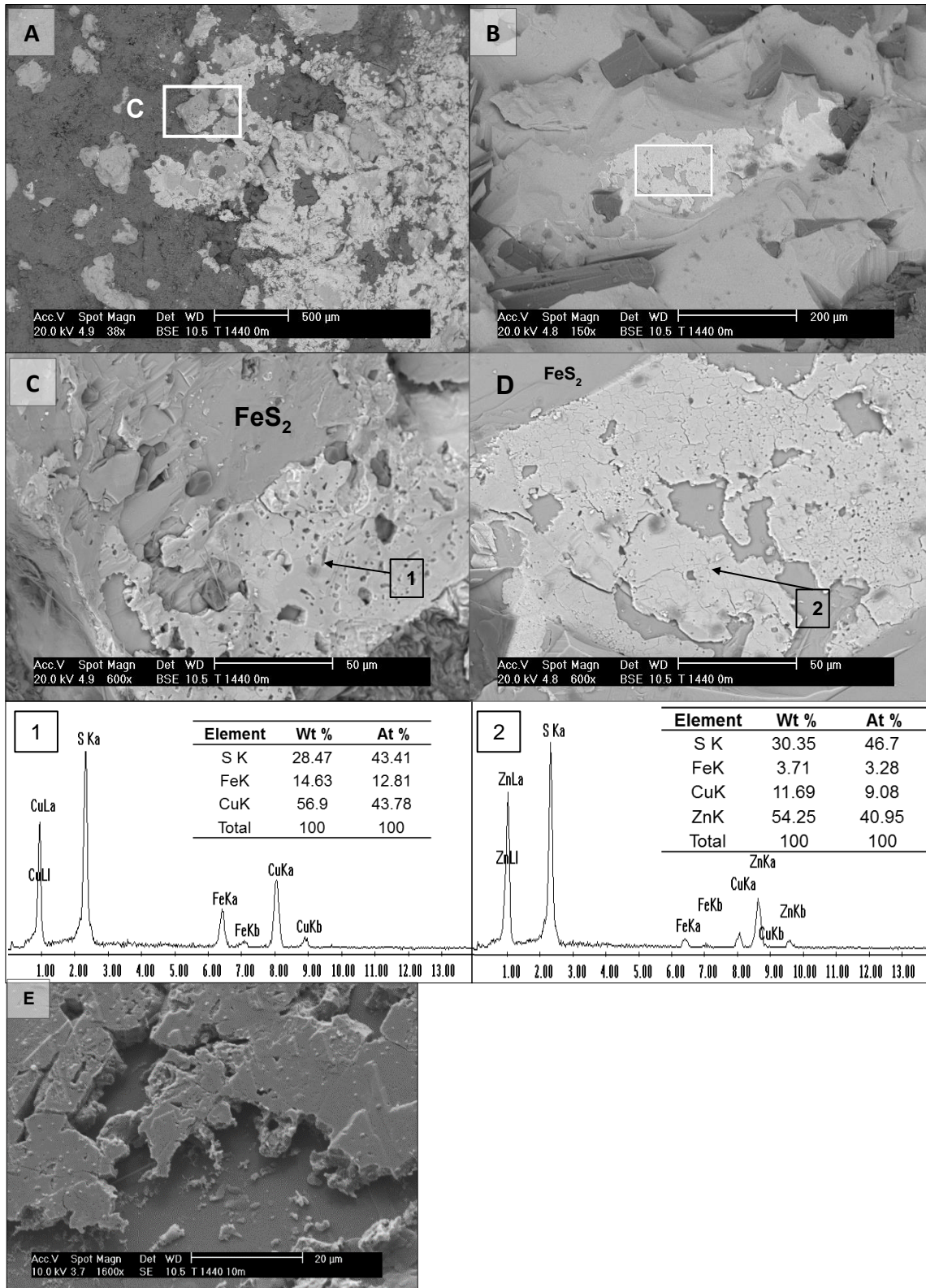


**Figura 61.** Superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 0-10m del terrero 1440. A y B) Pirita con escasas señales de alteración morfológica y/o química. C y D) Desarrollo de clivaje en otro punto de la muestra, esta condición fue localizada.

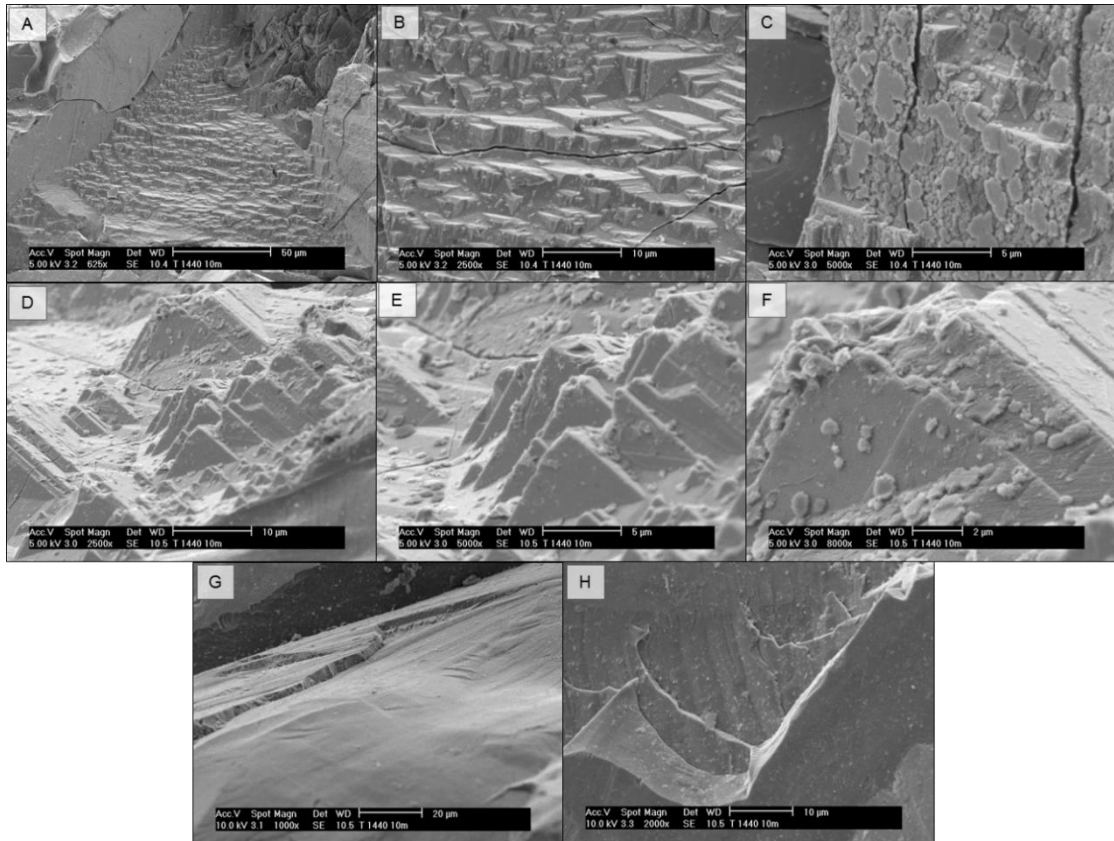


Los precipitados laminares de Cu-Zn en la Figura 62D mantienen similitudes morfológicas y texturales con las formaciones de biopelícula detectadas en este nivel, y que en un principio fueron considerados sólo como fases minerales secundarias sobre la superficie de pirita en este mismo nivel de profundidad. Dentro de la estructura compuesta por distintos polímeros y microorganismos, las biopelículas identificados presentaron la incorporación de los mismos elementos: Zn y Cu. Por lo que con base en las observaciones reportadas en la siguiente sección de este trabajo es probable que esta formación pertenezca a esta clase de desarrollo de biopelícula, y esta se siga desarrollando con mayor frecuencia en el nivel, siendo necesario seguir examinando esta zona a mayores magnificaciones para así comprobar la presencia de microorganismos, tal y como se realizó con los otros puntos del terrero.

La Figura 63 muestra las diferentes condiciones en que se encuentra la superficie de pirita en el nivel 10-20 m del terrero 1440. Tal y como ha sido una constante en el terrero anterior, la superficie de pirita no se encontró alterada uniformemente, esto probablemente debido a la heterogeneidad de las condiciones fisicoquímicas que se presentan en el terrero. En esta figura se observa la comparación de los diferentes clivajes desarrollados en el nivel, contrastando con las superficies que sólo presentan señales de alteración morfológica debido a la fractura de la pirita en ciertos puntos y/o que presentan una superficie uniforme, sin la formación de alguna fase mineral secundaria (Figura 63G y 63H). Contrariamente, la fotomicrografía 63A señala un corredor de pirita en el que la superficie se encuentra alterada totalmente, desarrollando un amplio clivaje en donde se observan estructuras cúbicas sobresaliendo de la superficie, las cuales se encuentran en forma escalonada una sobre otras.



**Figura 62. Precipitados de sulfuros de Cu y sulfuros de Cu- Zn en el nivel 10-20 m del terrero 1440.** A) Recubrimiento de una gran extensión de partículas de pirita por la formación de precipitados de Cu. B) Precipitados laminares de sulfuros de Cu-Zn. C y D) Se observan con mayor detalle cada uno de las fases secundarias sobre pirita, identificando notables diferencias en cuanto al espesor que presentan. E) Fotomicrografía mediante SE de los precipitados observados en la figura C, se observan una formación sólida y la superficie de pirita bajo esta.



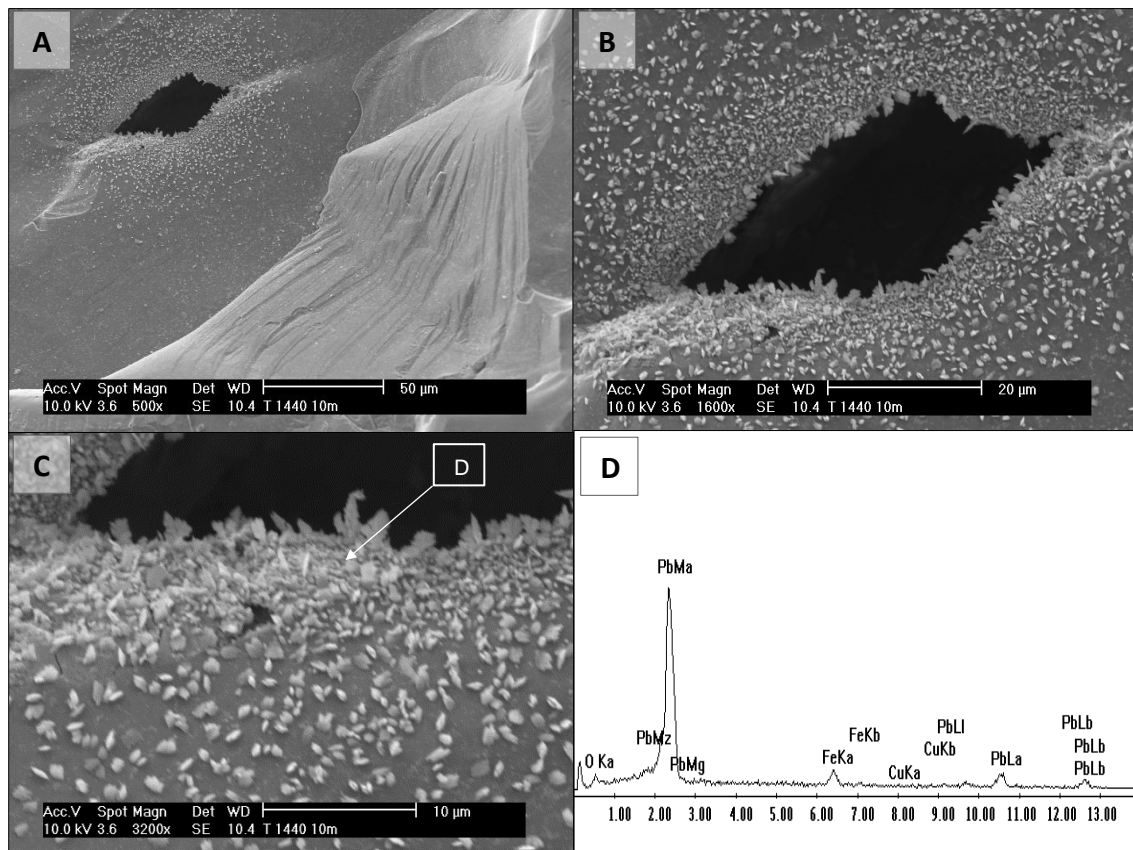
**Figura 63.** Distintas formaciones y desarrollo de clivaje en partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 10-20 del terrero 1440. A, B) Formaciones piramidales surgidas en la superficie de pirita debido al proceso de oxidación de la superficie. C) Formación de precipitados laminares que recubren una pared de pirita. D, E y F) Formaciones piramidales de distintas dimensiones que se encuentran recubiertas puntualmente por precipitados de forma laminar. G y H) Superficies de pirita sin desarrollo de clivaje, solo se observan fracturas de las partículas.

Además, en la misma figura se observan líneas de fractura que atraviesan la pirita, encontrando una diferencia significativa con el clivaje. A la derecha de esta zona, se encuentra una pared de pirita con un relieve menos pronunciado en la que comienza a desarrollarse el mismo tipo de clivaje, aunque contrastantemente, se observa una superficie con rasgos de alteración que consisten en el desgaste del mineral y/o en la formación de una determinada capa de fases secundarias que la recubren (Figura 63C). A pesar de esta característica, no se presentó una diferencia en su composición al examinarla mediante BSE o realizar el análisis químico puntual por EDS.

Al otro extremo de la partícula, se conjuntaron los dos tipos de alteración previamente observados; identificando formaciones piramidales en la superficie y sobre estos, fragmentos laminares o esféricos depositados sobre su superficie

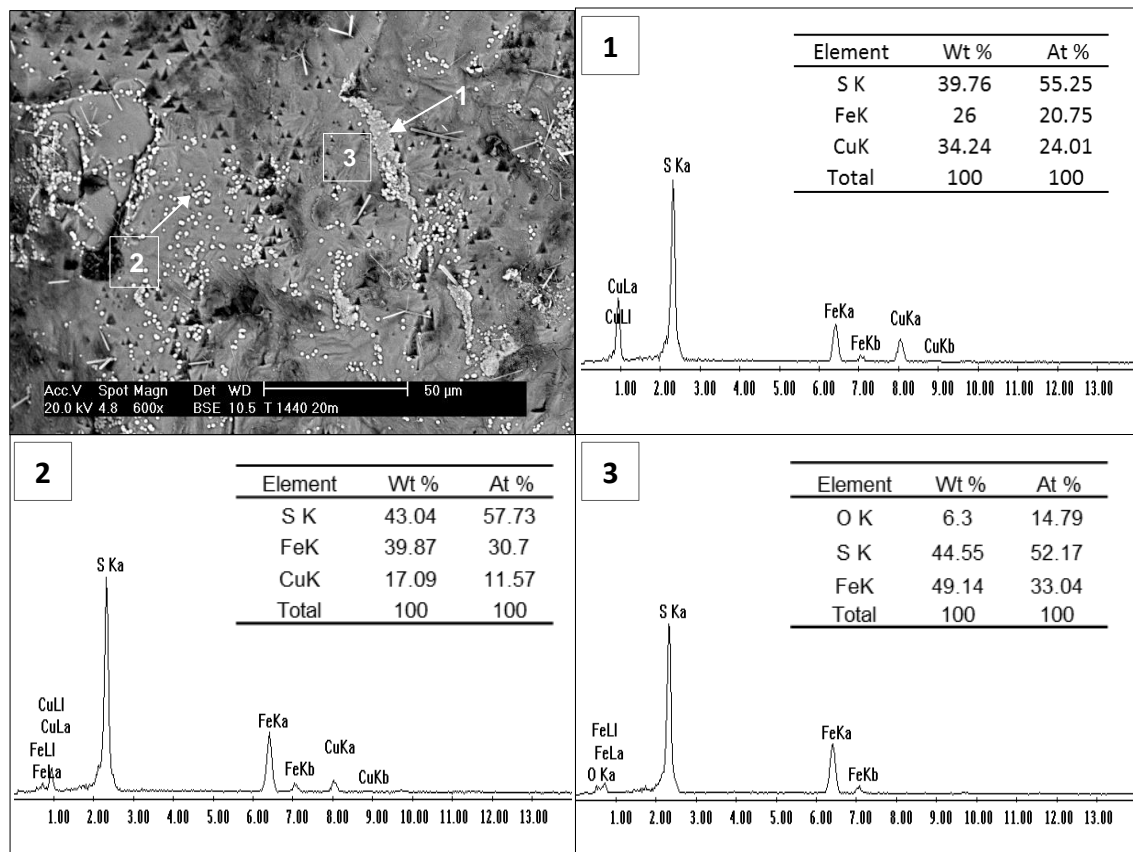
(Figura 63D). Incluso, al acercarse a 8,000x a las estructuras piramidales resultantes del desarrollo de clivaje (Figura 63F), se observa cómo estos precipitados mantienen diferente espesor y variables dimensiones que se adaptan al relieve de la pirita, contrastando con aquella formación laminar en la fotomicrografía 63C. Al igual que la figura anterior, estos no presentaron algún indicio de la formación de precipitados de otra fase mineral a pesar de encontrar esta característica.

Otros puntos de la restante superficie de pirita en este nivel exhibieron una superficie uniforme tal y como se observa en la Figura 63G, en donde se presentó la acumulación de partículas de óxido de Pb-Cu en los límites y áreas inmediatas a fracturas o bordes de orificios en la superficie (Figura 64A). A mayores magnificaciones (3,200x) se observa cómo es que se trata de cristales por debajo de  $1\mu\text{m}$ , y que confluyen en mayor grado en los bordes del orificio, formándose pequeñas agrupaciones desencadenando en el desarrollo de cristales de mayor tamaño que mantienen una estructura similar a la dendrítica (Figura 64C).



**Figura 64.** Superficie de pirita en el nivel 10-20 del terrero 1440 en la que se acumulan cristales de óxido de Pb.

Las condiciones de desarrollo de clivaje y alteración de la pirita encontraron una gran diferencia en los siguientes diez metros, ya que en el nivel 20-30m la superficie de pirita presentó signos de oxidación química con base en el análisis químico puntual por EDS (Figura 65.3), indicando posiblemente la formación de óxidos de hierro al mismo tiempo que ocurrían cambios morfológicos, al encontrar “*pits*” y la incorporación de fases secundarias de cobre triangulares en su superficie. La disolución y generación de las estructuras triangulares invertidas sobre la pirita señalan la oxidación del plano (111), las cuales al extenderse y conjuntarse formaron mayores cavidades tal y como se presenta en la Figura 65. Sobre esta superficie, se distribuyen un gran número de partículas esféricas de sulfuros de Cu-Fe cercanas a los 1.6  $\mu\text{m}$  de diámetro; en un principio de forma aislada, los precipitados se encuentran posteriormente acumulados en bordes o fracturas de las partículas o sobre los mismos *pits*, rodeando aquellas zonas de clivaje en la superficie.



**Figura 65.** Desarrollo de clivaje y cambios químico mineralógicos en la superficie de pirita asociados con la formación de fases secundarias de sulfuro de cobre en su superficie en el nivel 20-30m del terrero 1440.

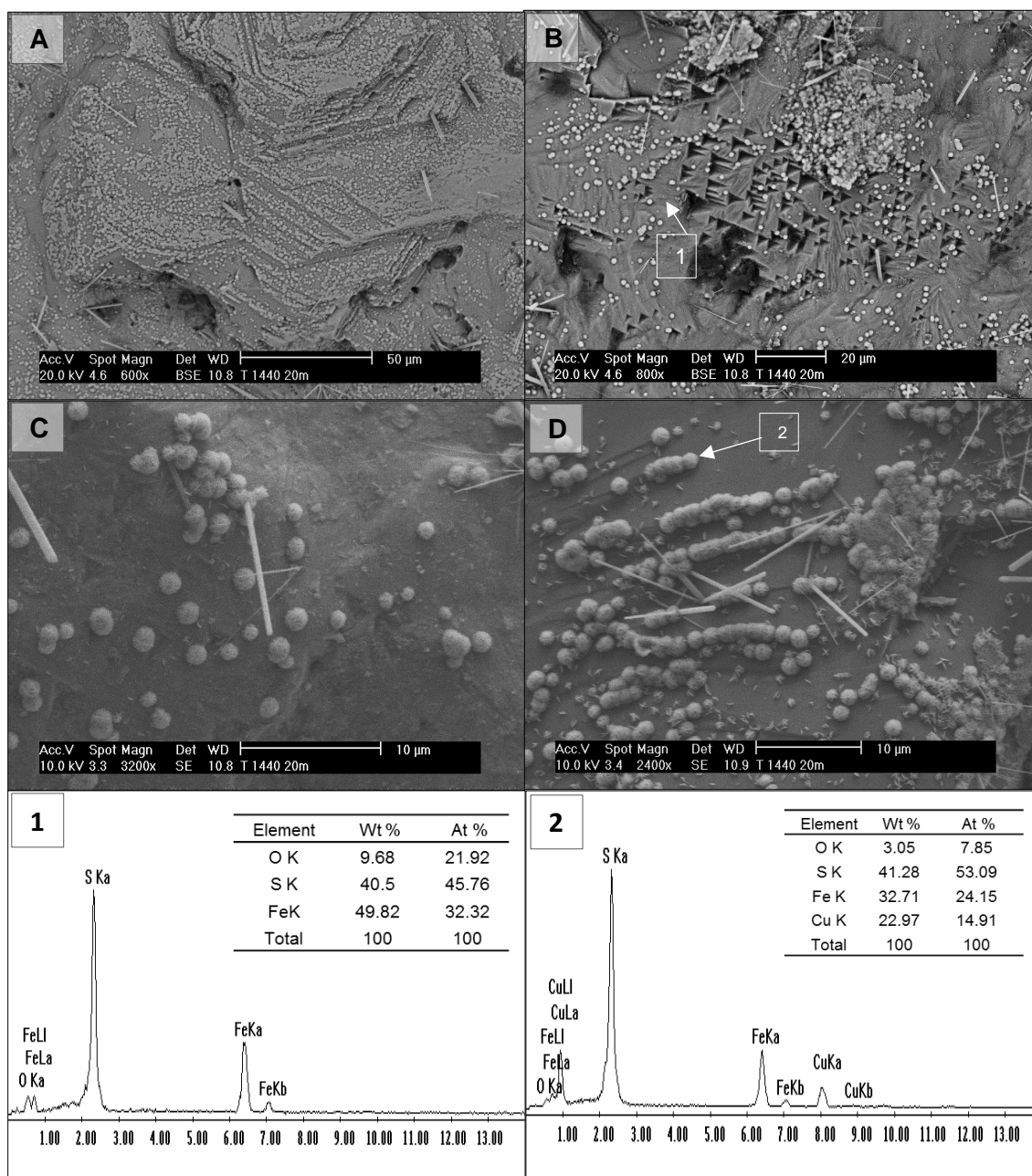
Es importante denotar que la composición de ciertos puntos de acumulación como aquellos señalados en la Figura 65 y 66, cambian con respecto a aquellos donde se puede analizar un menor número de partículas. Así, la agrupación señalada con el número 1 en la Figura 65, mantiene una composición similar a la calcopirita, mientras que en el número 2, el análisis químico de las partículas arroja un menor contenido de Cu (17.09% Wt) comparado a esa fase.

En la Figura 66 se observa una zona en la que ocurre una mayor acumulación de los precipitados esféricos de cobre, recubriendo la mayoría de la superficie de pirita señalada en la fotomicrografía; situación que continúa presentándose en la mayoría de la muestra. La superficie presenta un avanzado desarrollo de clivaje y alteración morfológica, desarrollando formaciones similares a mesetas sobrepuestas entre sí que siguen determinados planos cristalinos, al igual que las formaciones triangulares de la figura anterior, señalando la continua oxidación de la superficie. Las partículas esféricas de cobre se acumulan principalmente en los bordes de estas mesetas o siguiendo las líneas de clivaje en la partícula desarrollados a través de estas, desde donde se extienden recubriendo la superficie, mientras que la misma tendencia a acumularse se observa en el centro de la Figura 66B, en los alrededores de zonas con una amplia formación de *pits*.

La superficie de pirita presenta casi imperceptibles diferencias texturales y signos de oxidación con base en el análisis por EDS al observarla en la Figura 66C con respecto a la 66D. Los precipitados de Cu en estas zonas parecen estar formados por pequeños filamentos debajo de los 0.4  $\mu\text{m}$  de longitud, que se entrelazan formando las esferas de Cu o se acumulan directamente sobre la superficie. Al acumularse, los precipitados forman progresivamente una monocapa que se extiende por la superficie observando su desarrollo cuando las partículas se agrupan alrededor de otras (Figura 66C) o tras el desarrollo de esferas que también se agrupan formando filas al posicionarse una tras otra (Figura 66D). Además, sobre o cerca de las partículas de cobre en las anteriores figuras también se ubican

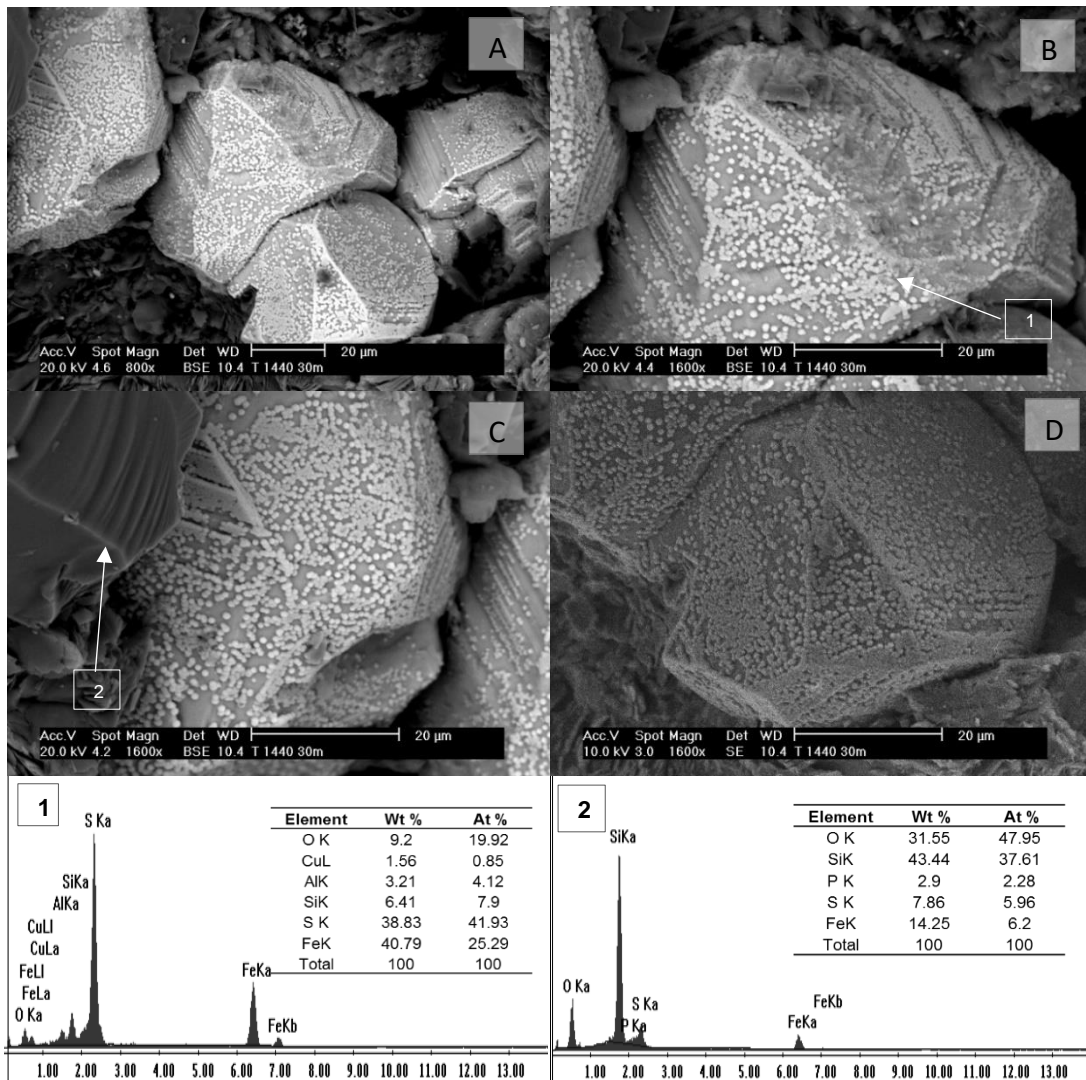


cristales de yeso entre 8 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud y un espesor por debajo de los 0.5  $\mu\text{m}$ , tanto de forma individuales como agrupados.



**Figura 66.** Acumulación y recubrimiento de la superficie de pirita por precipitados de Cu en el nivel 20-30 m del Terrero 1440. A) Recubrimiento de la superficie de pirita siguiendo líneas de clivaje. B) Acumulación y distribución sobre ó en los alrededores del clivaje. C) Superficie de pirita en contacto con precipitados esféricos de Cu-S a 3,200x. D) Distintas etapas en la conjunción y recubrimiento de la pirita por los precipitados. Se observan también cristales de yeso sobre las partículas.

En el nivel 30-40 m de profundidad continuo registrándose la formación de precipitados sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Las partículas de pirita en la Figura 67A presentaron hábitos entre el cúbico y prismático (“piritohédrico”) de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  que exhibieron la alteración de su superficie, desarrollando líneas de clivaje que representaron los principales puntos de posicionamiento de partículas esféricas cercanas a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro y que recubren parcialmente su superficie. En base a la incorporación de oxígeno, Al (3.21 Wt%) y Si (6.41 Wt%), estos precipitados podrían señalarse como partículas de oxihidróxidos de Al-Si, señalando un cambio en la acidez del medio (pH 4-5) (Nordstrom et al., 2015) tras la oxidación de la pirita, que presentó una disminución en el contenido de hierro asociado a este proceso.



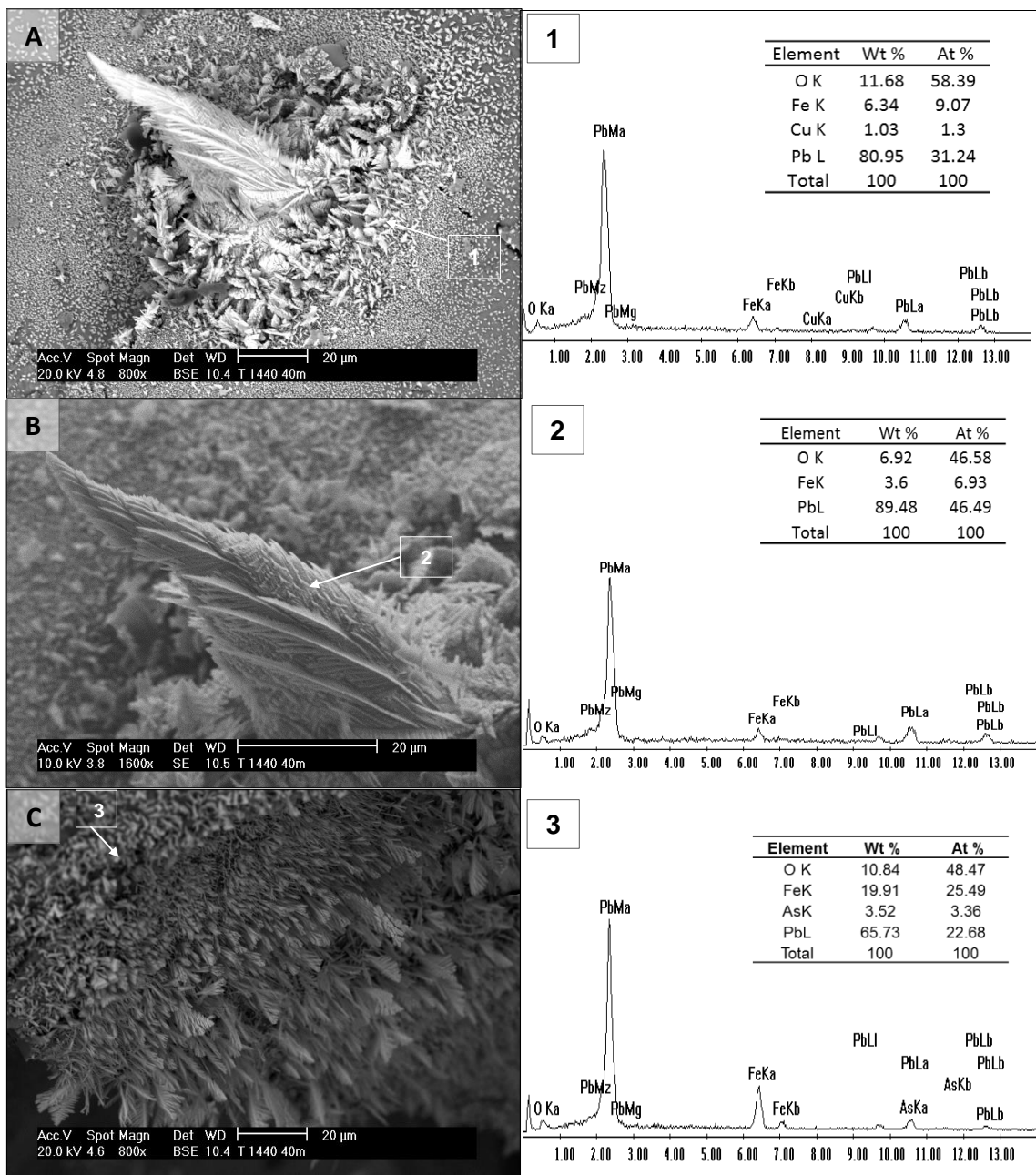
**Figura 67.** Partículas de pirita recubiertas por potenciales precipitados esféricos de oxihidróxidos de Al-Si en el nivel 30-40 m del terrero 1320.



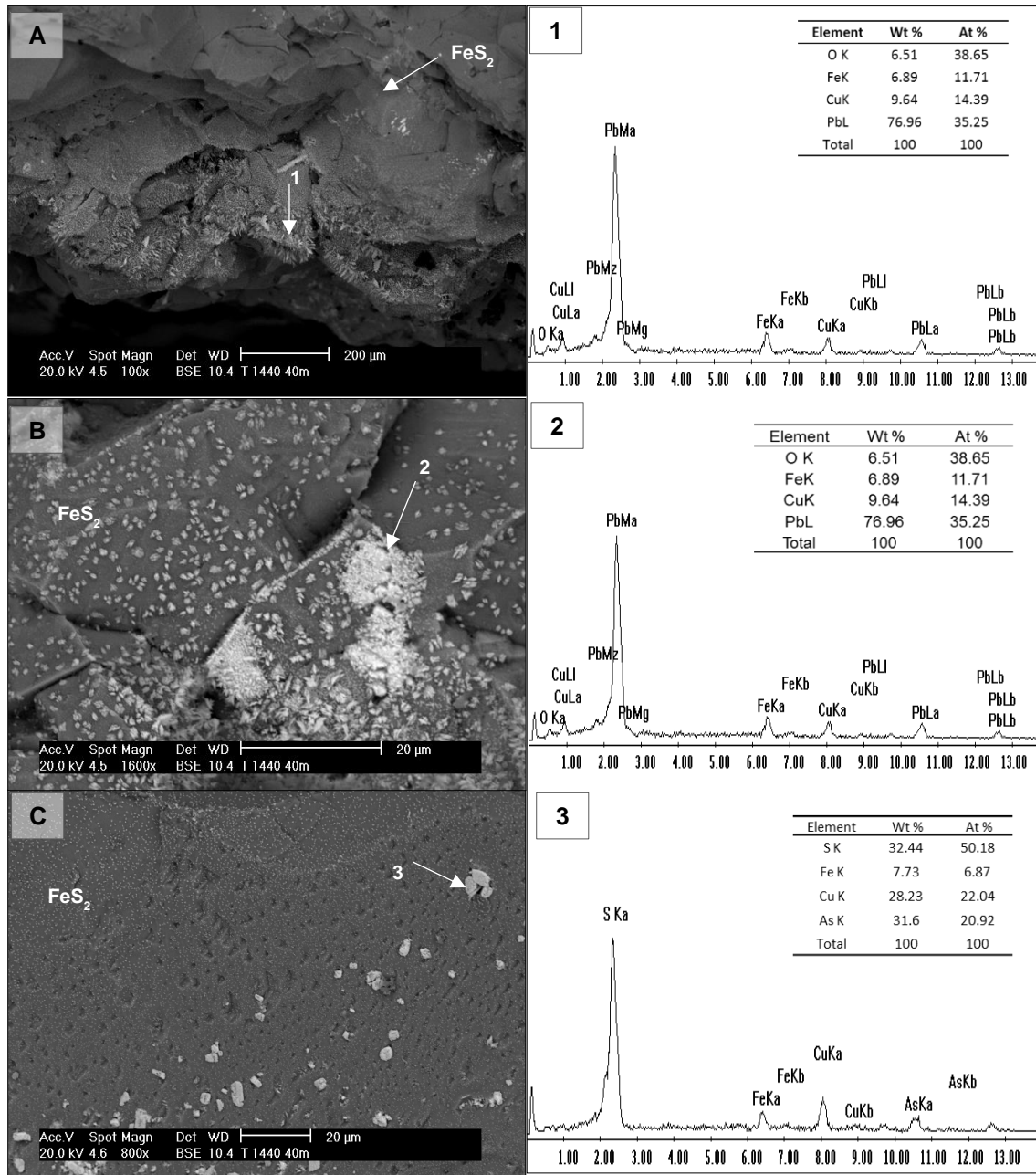
En el nivel 40 a 50 m del terrero 1440 las muestras se conformaron casi en su totalidad de cristales de pirita con grandes dimensiones, sobre los cuales se encontraron distintas partículas y estructuras de Pb, calcopirita [CuFeS<sub>2</sub>] y enargita [Cu<sub>3</sub>AsS<sub>4</sub>]. La superficie de pirita mostró la adición y desarrollo de estructuras de óxido de Pb-Fe-Cu en fracturas o bordes, de manera similar a lo que ocurría en el nivel 10-20 m del mismo terrero. En esta ocasión también se formarían estructuras de mayor tamaño y diferentes morfologías tal y como se señala en la Figura 68. En la primer fotomicrografía se observa un precipitado de óxido de Pb-Fe que adoptaba una forma semejante a una pluma, incluso por la textura de su superficie (Figura 68B) y que se encuentra rodeada de pequeñas partículas de la misma fase mineral. A diferencia de la anterior formación, la Figura 68C muestra una nueva morfología de los óxidos de Pb-Fe, sin incorporar Cu; de manera similar a un hábito dendrítico, las agrupaciones de cristales de óxido de Pb-Fe aparentemente continuaron

creciendo desde la base de la pirita, formando así un gran conjunto de formaciones cuya morfología recuerda a la de un árbol, tal y como se señala para estructuras dendríticas. Además, rodeando a esta se encuentra un gran número de cristales aislados en un costado de pirita.

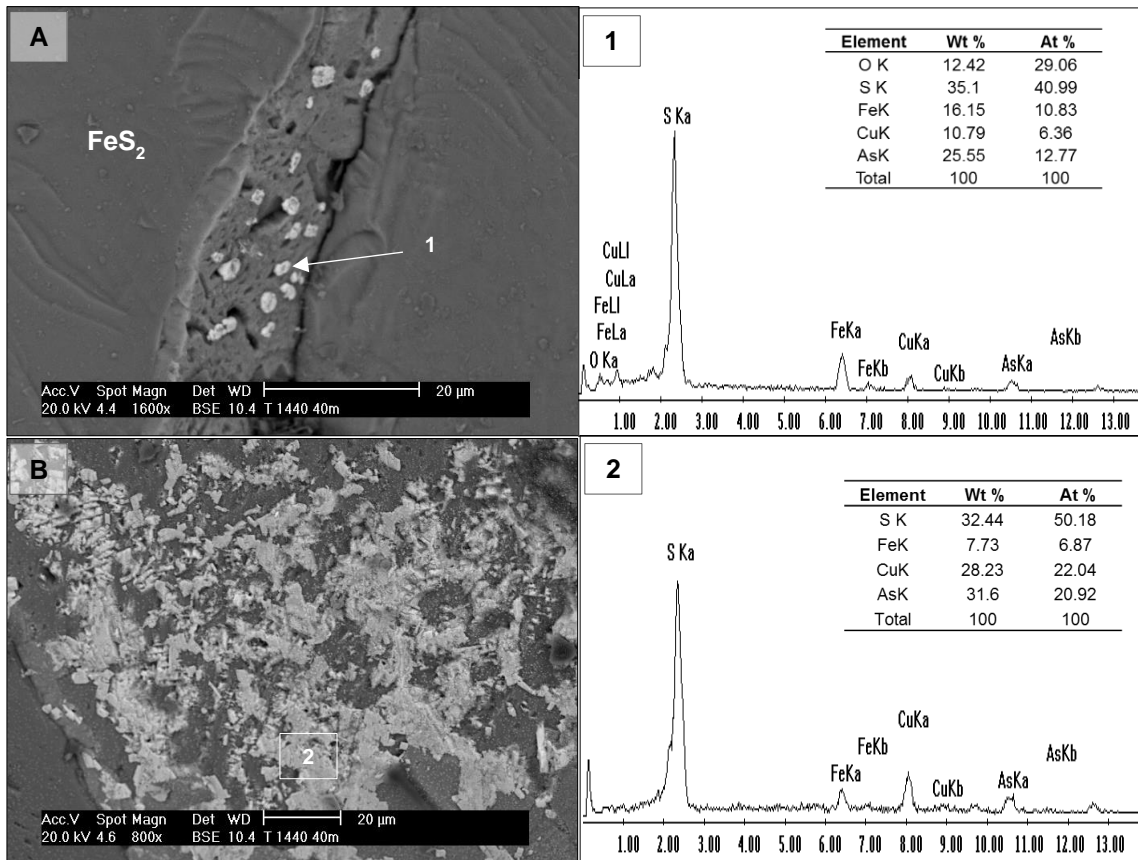
Sobre otros puntos de la pirita, ocurrió la acumulación de los cristales de óxido de Pb-Cu, tal y como se observa en la Figura 69, mientras que en la Figura 69C se observan inclusiones de enargita en la superficie de la misma partícula. Es importante recalcar que en la fotomicrografía se puede identificar los puntos en donde se encuentran las partículas incrustadas, así como aquellos puntos donde al parecer se han liberado, dejando atrás los orificios en la pirita donde se encontraban. No solamente se observó directamente sobre la superficie, sino que incluso se identificaron en una sección transversal al encontrar una fractura en la superficie, encontrándose el mismo tipo de partículas ocluidas, así como aquellos puntos donde aparentemente se liberaron al encontrarse expuestas además de observar que en este punto se presenta oxígeno como parte del análisis por EDS, denotando la oxidación de la superficie (Figura 70A). Finalmente, la Figura 70B señala una mayor acumulación de enargita, al encontrarse en forma de intercrecimientos y de forma diseminada en pirita.



**Figura 68.** Precipitados de óxido de plomo sobre la superficie de pirita del nivel 40 – 50 m del terrero 1440. A y B) Precipitados de óxido de Pb-Cu en la superficie de pirita, la morfología del precipitado adopta la forma de una pluma. C) Formación dendrítica de óxido de Pb.



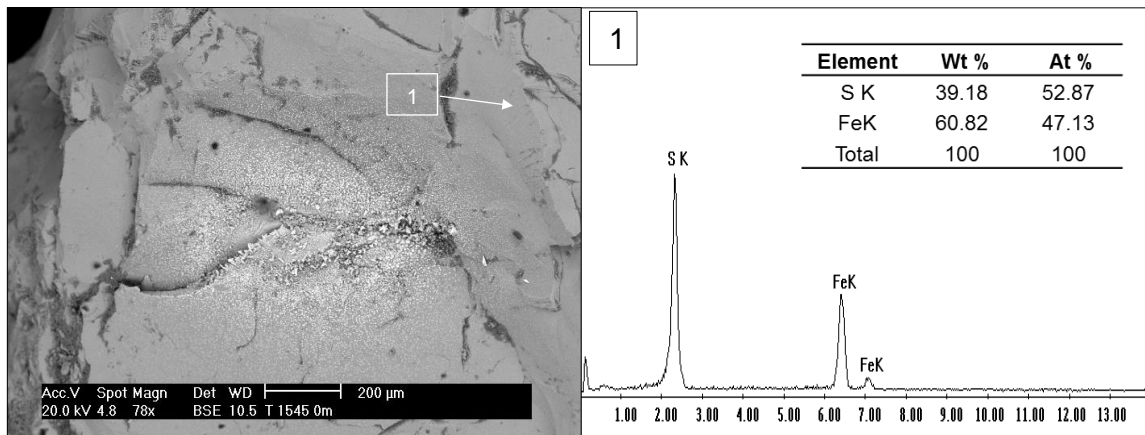
**Figura 69.** Precipitados de óxido de Pb-Cu sobre la superficie de pirita y la formación de inclusiones en su superficie. A) Precipitados de óxido de Pb-Cu sobre los bordes de la partícula de pirita. B) Cristales con similar composición a los anteriores se encuentran acumulados alrededor de una agrupación de óxido de Pb-Cu. C) Inclusiones de enargita [Cu<sub>3</sub>AsS<sub>4</sub>] en pirita, se observa la distribución de las partículas y los puntos donde previamente se encontraban otras similares.



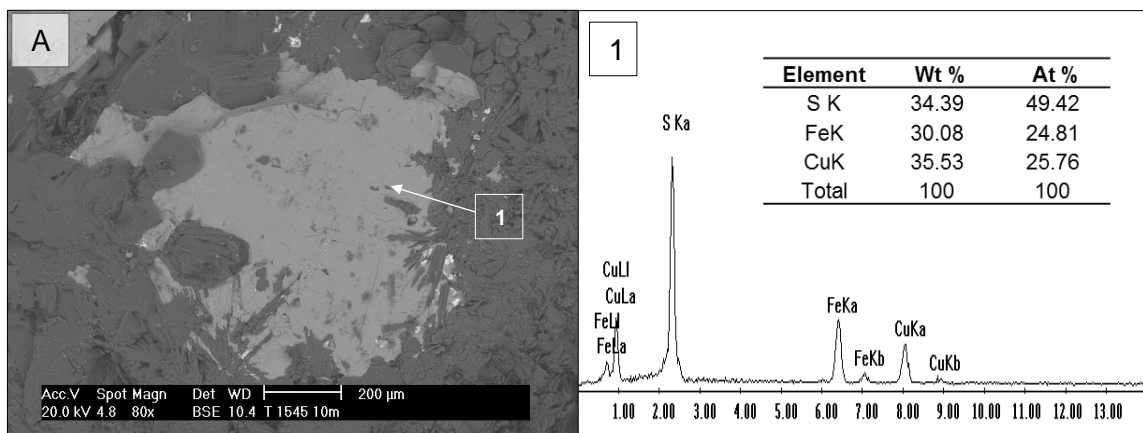
**Figura 70.** Inclusiones de enargita [ $\text{Cu}_3\text{AsS}_4$ ] en pirita. A) Distribución de las partículas ocluidas y los puntos donde previamente se encontraban otras similares en una sección transversal de la superficie de pirita. B) Enargita asociada a la superficie de la pirita.

#### 4.1.1.3 Terrero 1545

El terrero 1545 presentó una mayor abundancia de pirita en los primeros 10 metros de profundidad en el nivel 0-10m, sin encontrar señales que indicaran la formación de minerales secundarios en su superficie o microorganismos (Figura 71). En el siguiente nivel en el terrero (10-20m) se observaron partículas de calcopirita asociadas a la matriz de silicatos sin presentar importantes rasgos de alteración morfológica o química, mostrando superficies uniformes y sin un avanzado desarrollo de clivaje, tal y como se observa en la Figura 72.



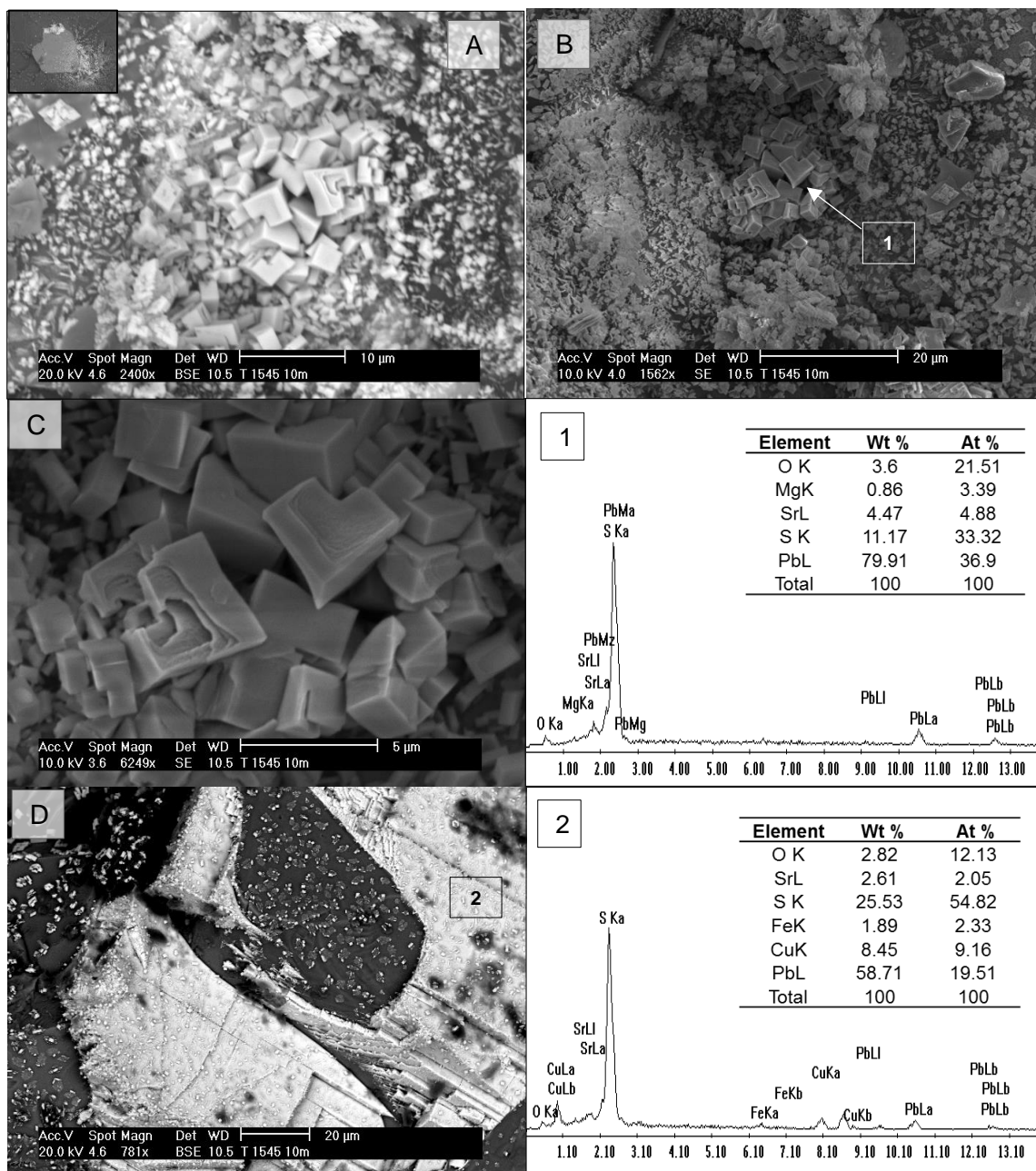
**Figura 71.** Aspecto de partícula de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y precipitados de óxido de Pb sobre su superficie en el nivel 0-10m del terrero 1545.



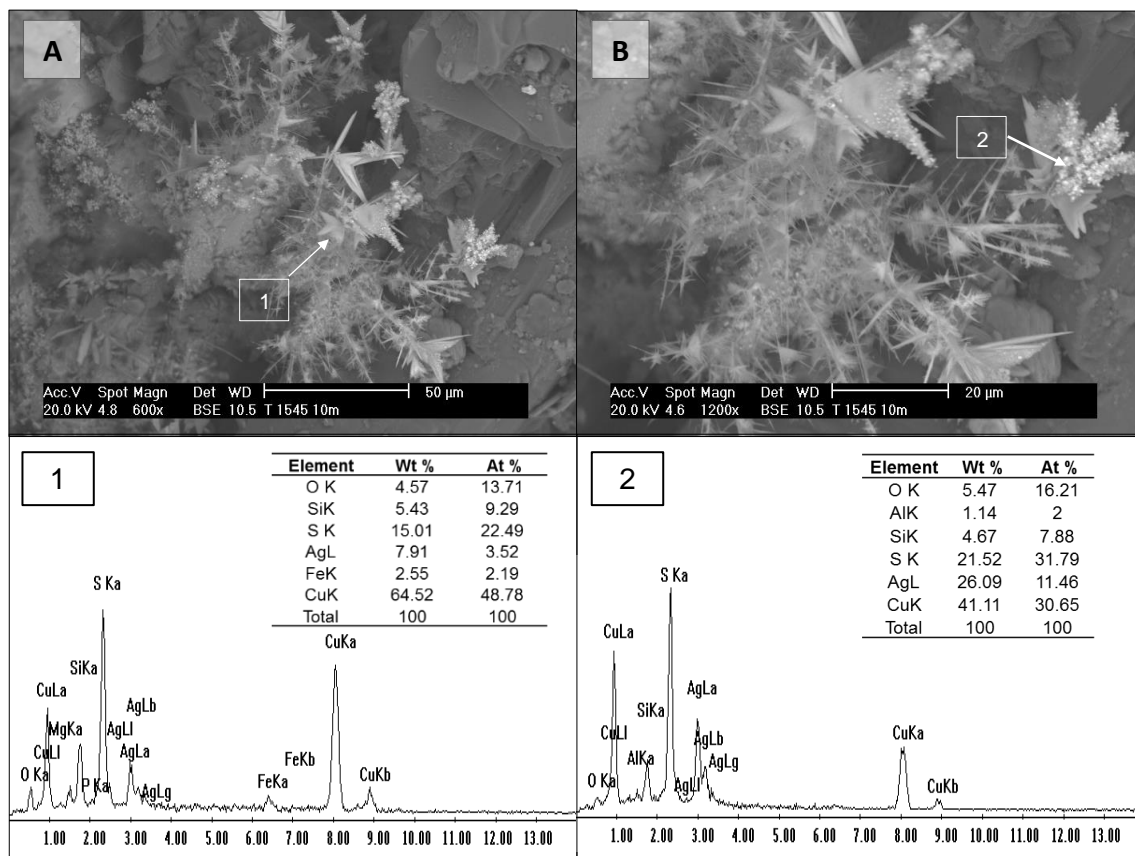
**Figura 72.** Partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) sin alterar en el nivel 10-20m del terrero 1545.

Sobre las partículas de calcopirita se encontraron diferentes precipitados de Pb que recubrieron parcialmente su superficie; uno de ellos se señala en la Figura 73, al encontrar un gran número precipitados de Pb en la Figura 71B. A 6249x magnificaciones se observa con gran detalle la morfología cúbica con bordes definidos que presentan cada uno de los cristales de Pb, con dimensiones entre los 1 y 5  $\mu\text{m}$ . En otras partículas de calcopirita se siguió presentando la formación de precipitados de Pb como en la Figura 68D, donde un óxido de Pb recubre la superficie de forma laminar, componiéndose al parecer de distintas capas con bordes regulares y geométricos que se superponen una a otras tras depositarse en la calcopirita. Aunado a su formación, sobre esta fase y en los alrededores de calcopirita, se observan cristales de óxido de plomo similares a aquellas observadas en los niveles 10-20m del terrero 1440.

Se encontró en oquedades formadas en la matriz de silicatos una formación de cristales de Cu con composición compleja y particular morfología (Figura 74); presentando a este elemento como principal constituyente, bajo la forma de un sulfuro de Cu de similar composición a la calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ). La agrupación de cristales se compone de diferentes estructuras; en un principio en el centro mantienen una morfología fibrosa, mientras que filamentos de mayor espesor asemejan a un hábito acicular al prolongarse de forma perpendicular a la superficie en varias direcciones, manteniendo unidos a estos cristales en forma de punta de flecha de variable tamaño. Aquellos con mayores dimensiones parecen estar sostenidos por los filamentos más delgados, además de que sobre su superficie se encuentran partículas esféricas de Plata (Ag) acumuladas que forman precipitados de mayor tamaño y recubren parcialmente los cristales de punta de flecha, tal como se observa en la Figura 74B.



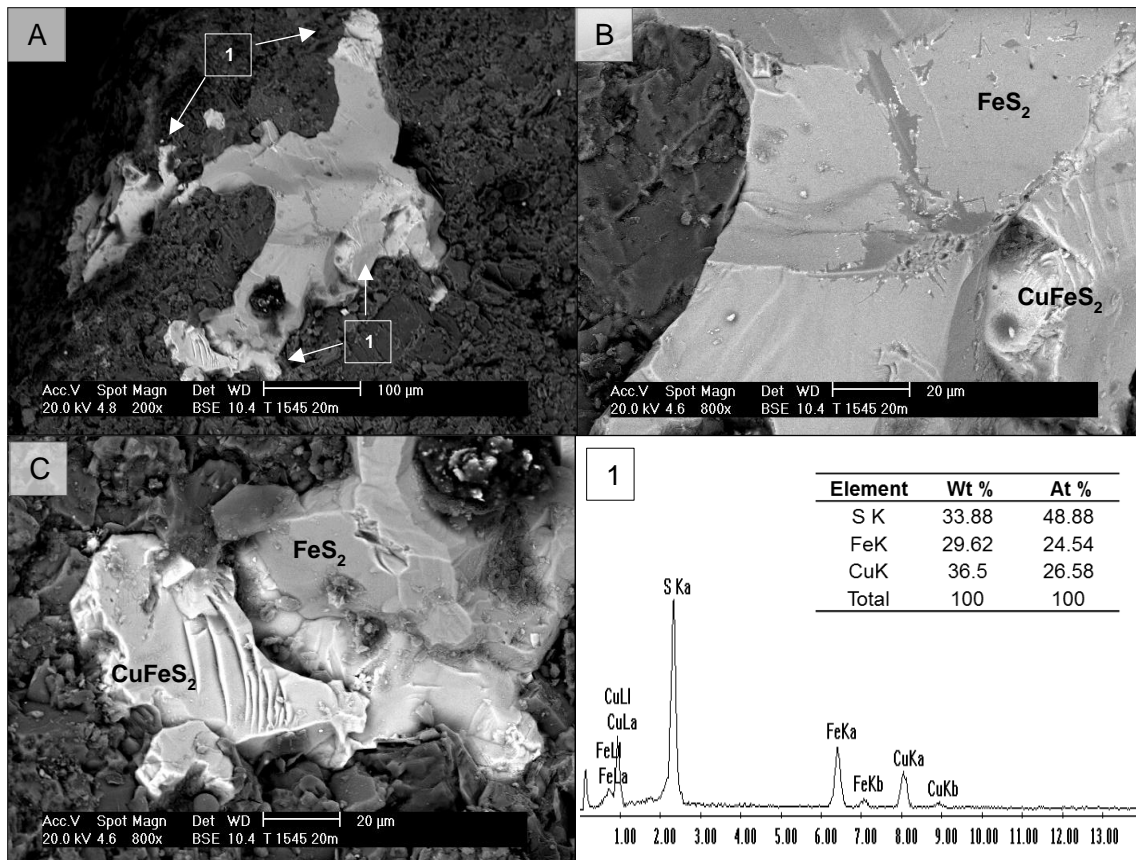
**Figura 73.** Partículas y precipitados de Pb en el nivel 10-20 del terrero 1520. A y B) Cristales cúbicos de Plomo entre los 1 y 5 µm posicionados sobre calcopirita. C) Apariencia a grandes magnificaciones (6,249x) de los anteriores cristales de Pb, se observa a gran detalle D) Precipitados laminares de Pb-Cu sobre pirita.



**Figura 74.** Precipitados de sulfuro de Cu en formación dendrítica sobre la superficie silicatos. A y B) Se observa la formación de partículas coloidales de plata sobre la estructura de cobre similares a una punta de flecha.

En los siguientes diez metros se observaron partículas de calcopirita asociadas a pirita (Figura 75). Los puntos de asociación se encontraron en los extremos de la partícula que se observan en la fotomicrografía, presentando dimensiones entre los 50 y 20 µm con base a los puntos de unión con las partículas de pirita. Al acercarse a la Figura 75C se observa el clivaje característico de ambas fases, sin presentar alteraciones químico mineralógicas en base al análisis químico puntual efectuado por EDS.



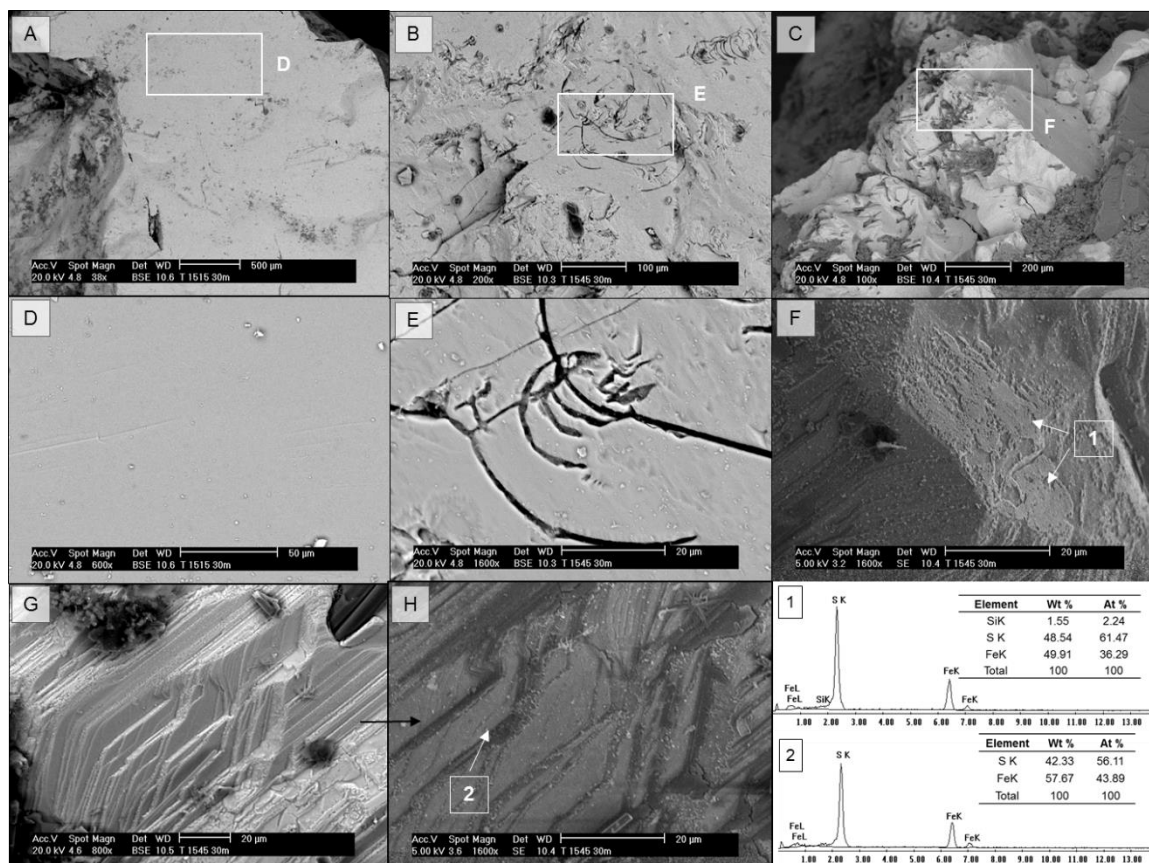


**Figura 75.** Asociación de partículas de pirita y calcopirita en el nivel 20-30m del terrero 1545. A) Partículas de pirita y calcopirita en la matriz de silicatos. B y C) Calcopirita asociada a los bordes de la pirita.

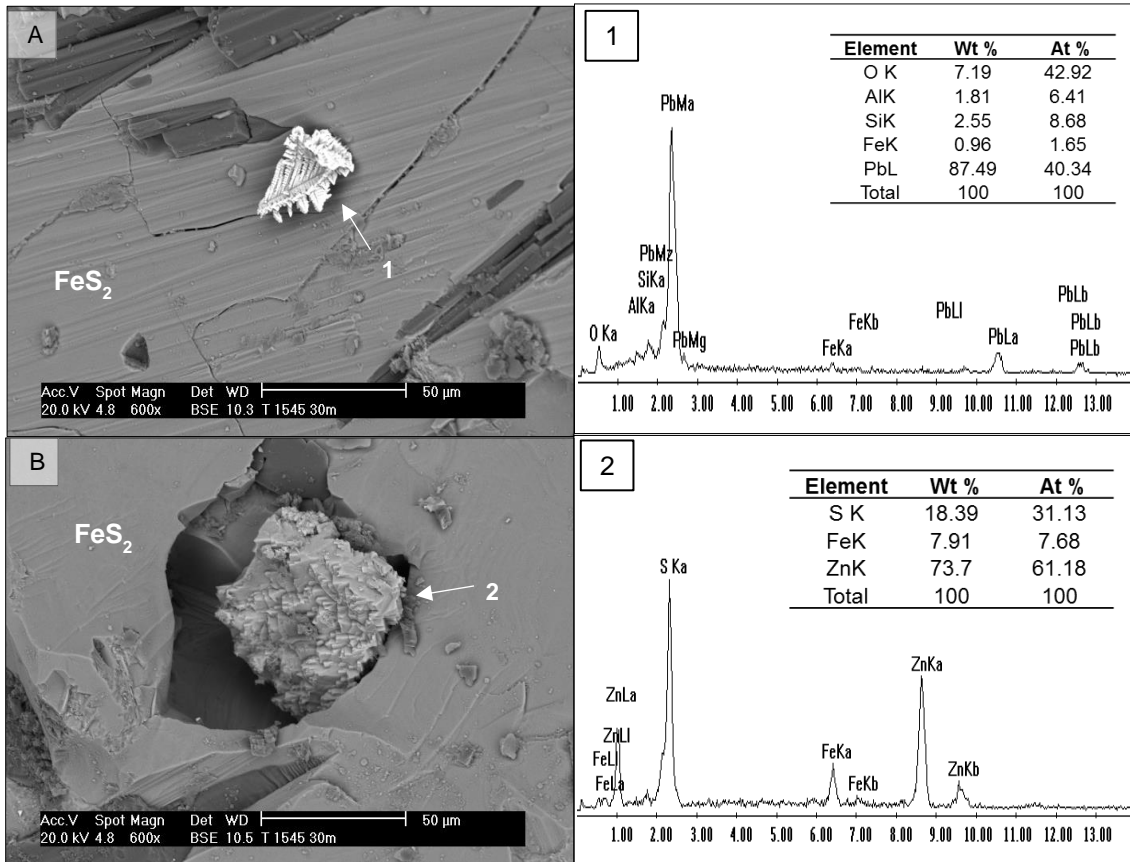
En el siguiente nivel no se identificaron fases de sulfuros de cobre, prevaleciendo partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en las que se encontraron amplias zonas de desarrollo de clivaje e indicios de la alteración química de su superficie. Las partículas señaladas en la Figura 76 indican los diferentes rasgos morfológicos y texturales que la pirita presentó debido al proceso de oxidación bajo el que se encuentra. Así, en un principio, se señala una superficie totalmente uniforme de pirita (Figura 76D), representando la textura que exhibiría previa a su oxidación o ataque químico. Junto a esta, en la Figura 76B) se señala un mayor grado de alteración, encontrando la formación de grietas y canales entre 1 a 1.5  $\mu\text{m}$  de espesor, que se podían llegar a extender de forma continua por más de 100  $\mu\text{m}$  debido al proceso de oxidación y disolución de la superficie (Figura 76B y 76E). La alteración morfológica de pirita en la Figura 76F, se ve acompañada del cambio en la composición elemental de la superficie al desarrollarse una película conformada

por un gran número de partículas diseminadas en este y otros puntos de la superficie, como zonas de desarrollo de clivaje (Figura 76G). En base al análisis por EDS la película correspondería a la presencia de Sílice (2.21 % Wt), presentando la disminución del contenido de azufre (48.54 % Wt) y hierro con respecto a la pirita sin alterar. El mismo comportamiento se presentó para la superficie con amplio desarrollo de clivaje en las Figuras 76G y 76F, presenciando un aumento en el contenido de hierro (57.67 % Wt) y la disminución de azufre (42.33 % Wt), aunque sin detectar la presencia de sílice.

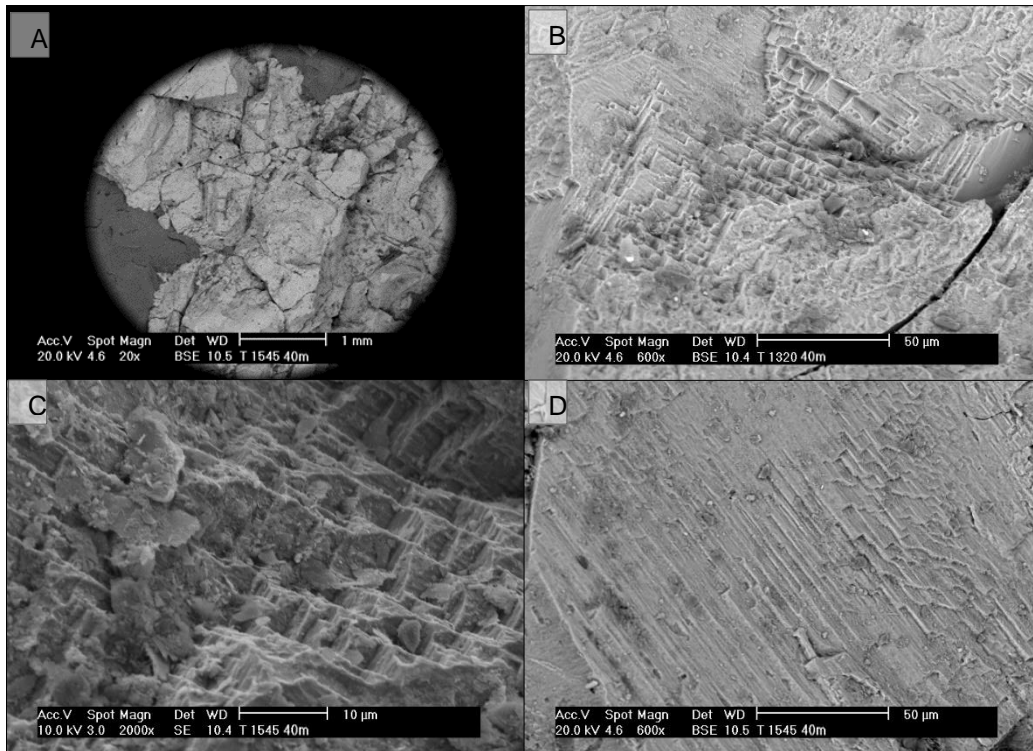
Por otra parte, en este nivel también se observaron precipitados de óxido de plomo que mantuvieron un hábito dendrítico (Figura 77B), además de identificar partículas de esfalerita con hierro en solución sólida [(Zn, Fe) S] en una de las concavidades en la superficie de pirita (Figura 77B).



**Figura 76.** Comparativa de los diferentes rasgos morfológicos y texturales de la superficie de pirita en el nivel en el nivel 30-40 m del terreno 1545.



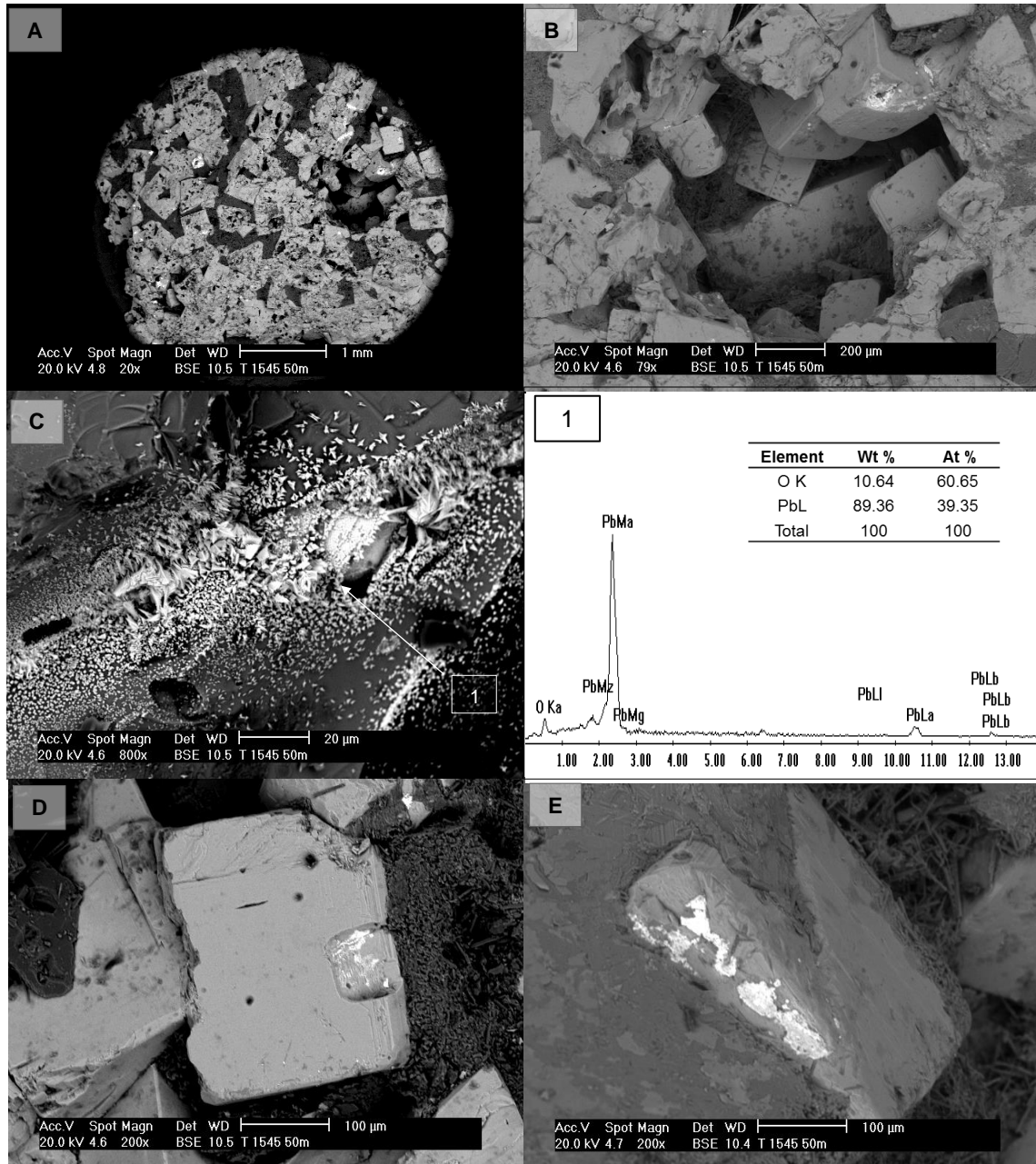
**Figura 77.** A) Precipitado de óxido de Pb en forma dendrítica. B) Incrustación de esfalerita con hierro en solución sólida en oquedad de pirita en el nivel 30-40 m del terrero 1545.



**Figura 78.** Aspecto de la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 40-50m del terrero 1545.

En el último nivel del terrero, a los 50 - 60m de profundidad, se encontró una gran abundancia de cristales cúbicos de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) asociados con la matriz de silicatos. La mayoría de la superficie de pirita no mostró el desarrollo de clivaje, pero sí presentó la formación de otros defectos como orificios en los que se encontraron microorganismos desarrollando biopelícula conforme a lo observado en la Figura 104, sobre la que se hablara más adelante. Sobre la pirita se presentaron nuevamente precipitados laminares y cristales de óxido de plomo, los cuales nuevamente se posicionan en defectos de la superficie, o en los bordes de las partículas. En el caso de la Figura 79C, los cristales se acumulan y adhieren a las paredes o bordes de pirita, formando agregados de morfología similar a la dendrítica, contrastando con aquellos no agrupados. Ya que aparentemente estos cristales continúan creciendo, es posible que representen una de las primeras etapas de formación de estructuras dendríticas con mayores dimensiones como aquellas observadas anteriormente en el nivel 40-50m del terrero 1440 (Figura 63),

en el nivel 10-20 m del terrero 1440 y a pocos metros por encima de este nivel, a los 30 metros (Figura 77).



**Figura 79.** Partículas de óxido de Pb-Cu sobre la superficie de pirita y la formación de incrustaciones en su superficie.

### 4.1.2. Columnas de biolixiviación

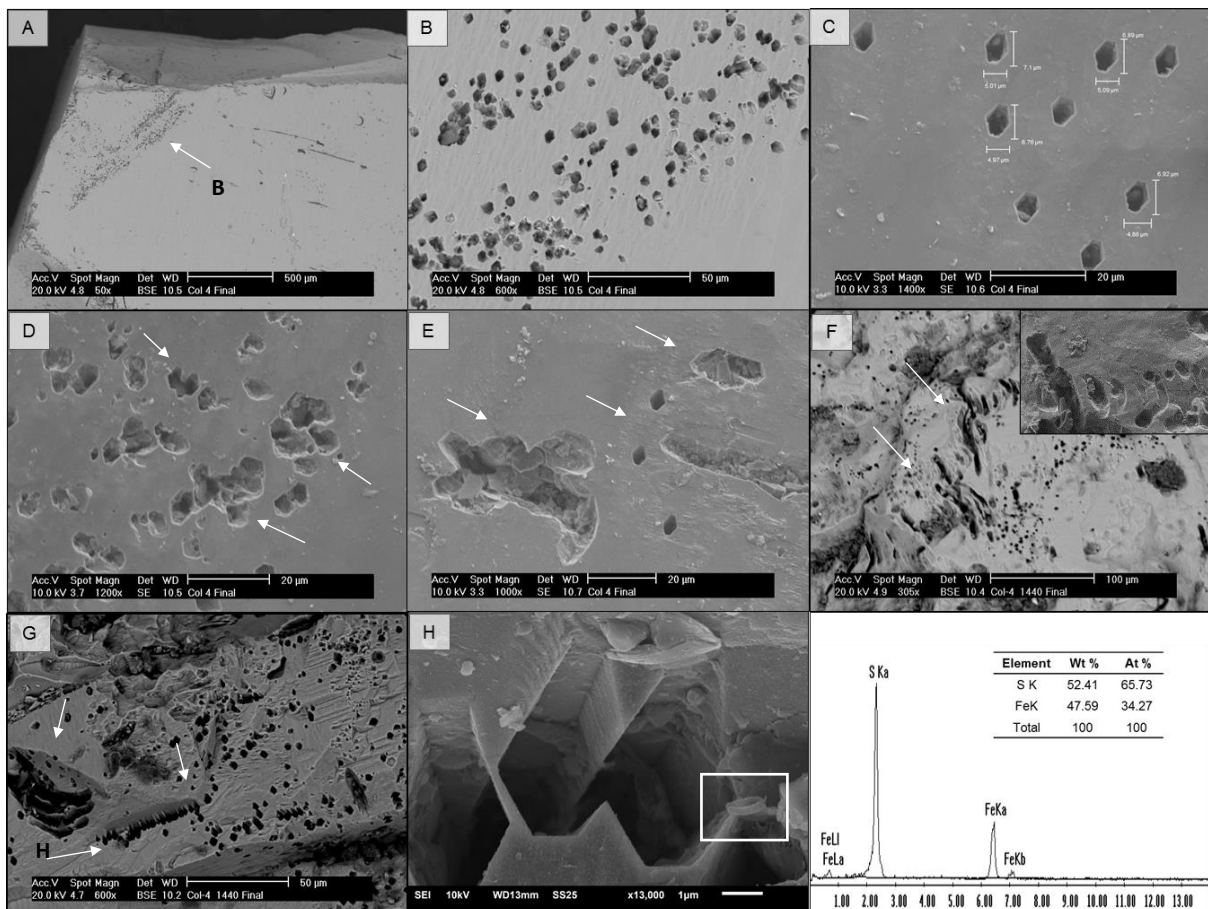
Las columnas de biolixiviación están compuestas por mineral proveniente del terrero 1440, presentando una notable abundancia de pirita con respecto a otros sulfuros metálicos. De esta manera, en las siguientes figuras se incluyen fotomicrografías que reflejan el estado de alteración de la pirita y sulfuros de cobre en las tres columnas de biolixiviación examinadas, donde se observa notablemente como es que las partículas de pirita presentan un mayor desarrollo de clivaje y alteraciones químico mineralógicas en cada sección final de las respectivas columnas, las cuales fueron divididas en dos secciones cada una.

Algunas de las características mineralógicas y alteraciones morfológicas más relevantes se encontraron relacionadas con la presencia de microorganismos, tal es el caso de la columna 4, en donde la Figura 80 indica una primera partícula de pirita con una superficie uniforme en la que se desarrollan orificios hexagonales atribuidos al proceso de oxidación. Con una morfología definida y por lo tanto con dimensiones similares ( $1.8 \times 1.55 \mu\text{m}$  en promedio); se presentan en un principio aislados, alineándose uno junto a otro al progresar la oxidación de la superficie, dando así paso a la formación de canales o concavidades de mayor tamaño en la pirita. El inicio de estos canales y otro tipo de defectos en la superficie se señala en la Figura 80D y 80E (flechas), observando una longitud y profundidad variable, mientras que en las Figuras 80G y 80H se observan canales ya desarrollados que se extienden de forma paralela por cerca de  $50 \mu\text{m}$  en diferentes puntos sin importar las condiciones del relieve de la partícula.

La formación de este tipo de clivaje o *pits* en la superficie se encontraría atribuida a la estructura cristalina de la pirita, debido a las semejantes y continuas dimensiones registradas en varios puntos (Pisapia, et al., 2008). Aunque representan evidencia del proceso de oxidación de la pirita, estas no pueden ser consideradas como una huella de la oxidación localizada de los microorganismos debido a la disimilitud de dimensiones con las bacterias y archeas involucradas (Edwards et al., 2001; Pisapia et al., 2008). No obstante, sí se encuentran involucradas en su desarrollo, tal y como se contrasta en la fotomicrografía 80H,

donde se encuentran dos microorganismos de morfología bacilar en los bordes de este tipo de *pits*.

Las características morfológicas exhibidas por la pirita y el contacto de los microorganismos aquí observados indica la posible acción microbiana en el proceso de oxidación de la superficie, ya que este extenso desarrollo de clivaje no se presentó en superficies que aparentemente carecían de la presencia de microorganismos, tanto en terreros como en otras columnas. Lo anterior reafirma lo señalado por Pisapia et al. (2008), al indicar que este tipo de formaciones no se desarrollan en la pirita durante el proceso de oxidación abiótica por acción de ion férrico, siendo así asociadas al proceso de oxidación bacteriana.

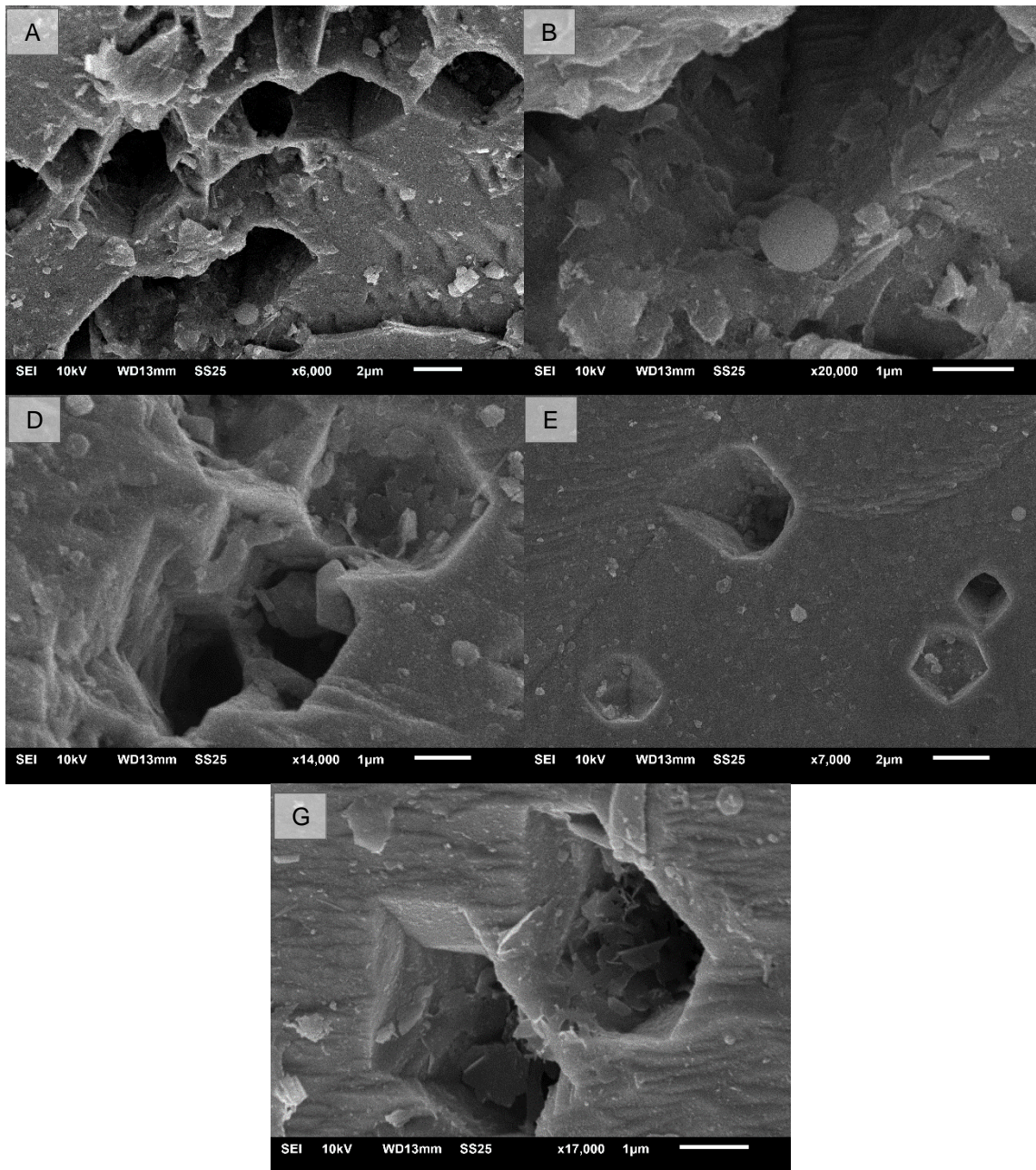


**Figura 80.** Formación de *pits* hexagonales en la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) debido al proceso de oxidación microbiana en la sección final de la columna de biolixiviación 4. A través de las diferentes fotomicrográficas se observan las características morfológicas de esta formación, así como su relación con microorganismos bacilares, al encontrarse adheridos en bordes de estas formaciones en la figura H.

Además de servir como un indicativo del proceso de oxidación microbiana, los *pits* desarrollados en la superficie representan un sitio potencial de adhesión y/o acumulación para los microorganismos, tal y como se comprobó en el nivel 30-40m del terrero 1320 con la Figura 80. De igual forma, no en todos los *pits* hexagonales y canales de las figuras 80 y 81 se observan microorganismos, incluso en aquellos canales que mantenían mayores dimensiones (Figura 80H), al solamente encontrarlos en los bordes. La formación de canales y clivaje no fue exclusiva de zonas con un relieve uniforme, ya que en una segunda muestra se observó su amplio desarrollo a través de diferentes condiciones de la superficie. En la Figura 81 se observan distintas zonas de pirita, donde a mayores magnificaciones se detecta la formación progresiva de *pits*, al presentar diferentes profundidades, desde cerca 0.2  $\mu\text{m}$  a más de 2  $\mu\text{m}$  de profundidad (Figura 81D y 81E). Las mismas fotomicrografías nos permiten observar cómo es que dentro de los *pits* varias capas minerales se desprenden de su base y paredes internas, dando paso al desgaste del mineral y la formación progresiva de dichos canales y túneles en la pirita. Al mismo tiempo, la superficie inmediata a estos se encuentra alterada, presentando un relieve irregular, así como fragmentos y otras capas minerales que se desprenden de esta.

La gran cobertura de *pits* en su superficie es un indicativo del proceso de oxidación bajo el que se encontró la pirita contenida en la sección final de la columna 4, la cual atraviesa un mayor grado de alteración morfológica con respecto a las demás columnas, e incluso a ciertas partículas que conforman los terreros. Considerando el origen de las muestras, en las columnas de biolixiviación es probable que ocurra un mayor periodo de retención de los microorganismos en cierto punto de la columna; y de esta manera mejorar la probabilidad de que los microorganismos se encuentren a mayor cercanía de las fases minerales examinadas, o que, debido a las condiciones controladas, exista una mejora en la biolixiviación.

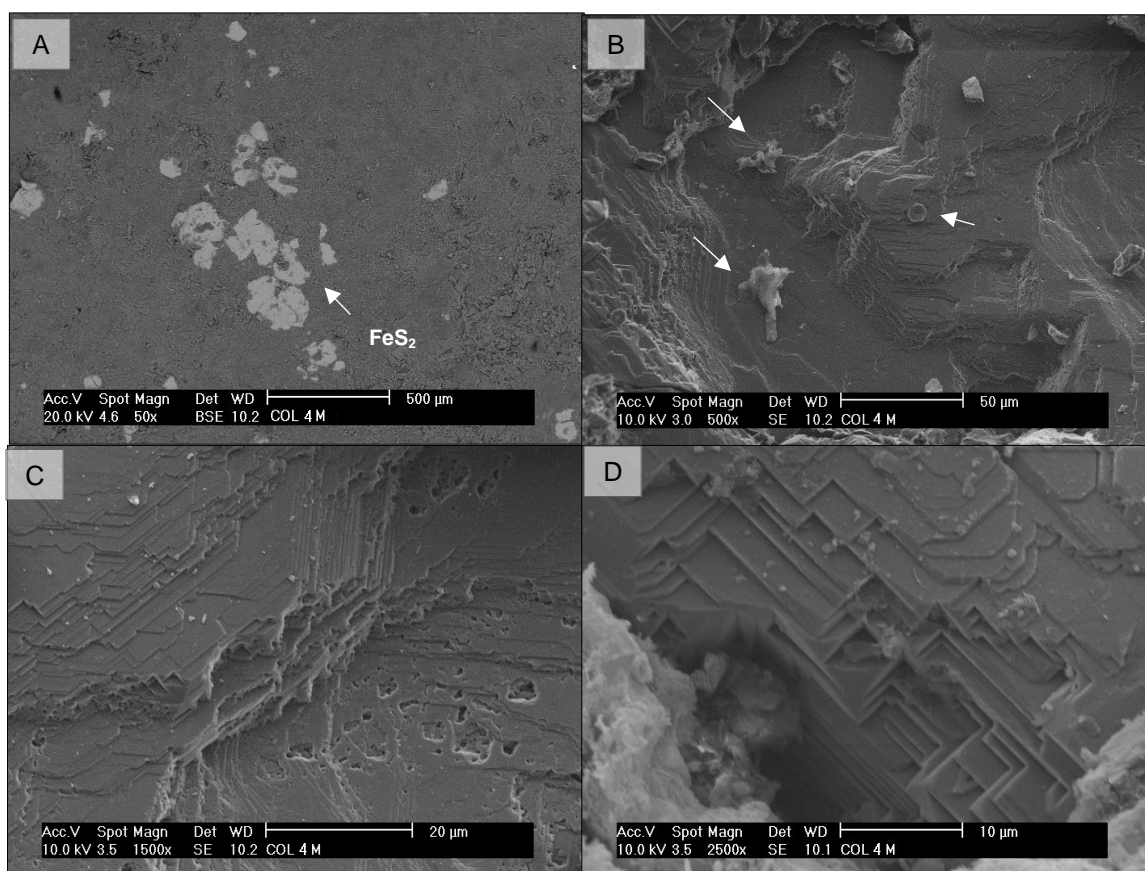




**Figura 81.** Formación de *pits* hexagonales en la superficie de pirita perteneciente a la columna 4 sección final. En las diferentes fotomicrografías se observan las distintas morfologías y desarrollo progresivo de los *pits*.

La generación de *pits* hexagonales a través de extensas zonas en pirita se presentó únicamente en la columna 4, encontrando distintas condiciones para las columnas y secciones restantes. Así, en la sección superior de la columna 4 se desplegaron nuevos patrones de alteración morfológica, encontrando zonas de desarrollo de clivaje en un solo plano sobre superficie de pirita, presentándose como

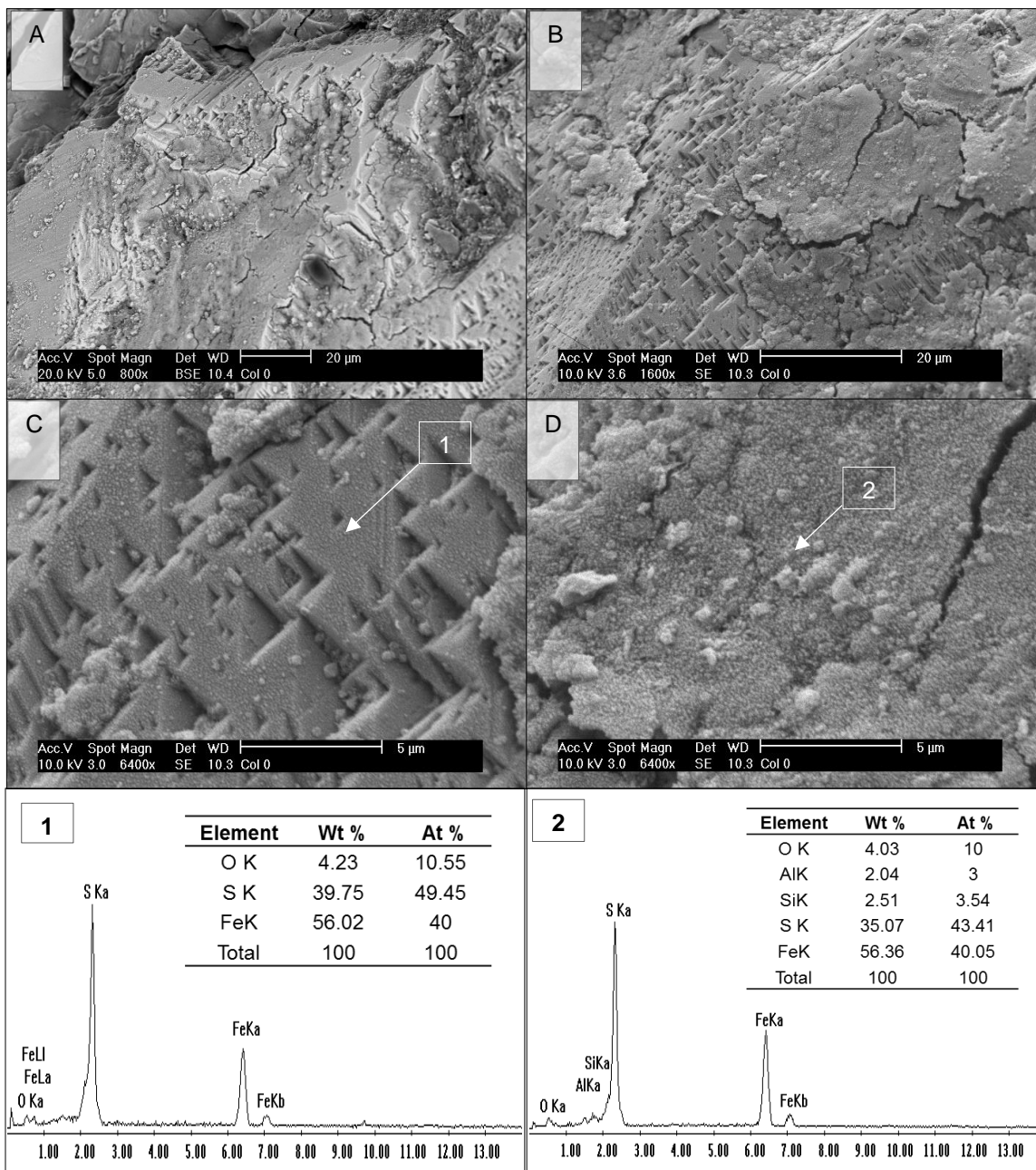
mesetas y planicies de diverso relieve en las que se encuentran potenciales sustancias extracelulares poliméricas (flechas) (Figura 82B). La morfología de la superficie señala una alteración gradual de la superficie debido a las diferentes altitudes que se presentan sobre la superficie, encontrando la formación de diferentes planos sobrepuestos uno sobre otro con formas rectangulares en los bordes expuestos (Figura 82C y 82D), así como la generación de orificios circulares en los que el proceso de oxidación podría haberse localizado (Figura 82C) tal como se observa en las diferentes fotomicrografías que componen la Figura 80.



**Figura 82.** Desarrollo de clivaje en pirita correspondiente a la sección media de la columna de biolixiviación 4. A) localización de partículas de pirita en la matriz de silicatos. B) Desarrollo de clivaje en un solo plano en pirita, en donde se observa la presencia de agrupaciones de sustancias extracelulares poliméricas (flechas). C) Las formaciones laminares sobre puestas entre y orificios circulares sobre estos debido a la potencial oxidación localizada de la superficie. D) Clivaje generado por el proceso de oxidación de la pirita en la que se observan formaciones rectangulares sobrepuestas a 2,500x.

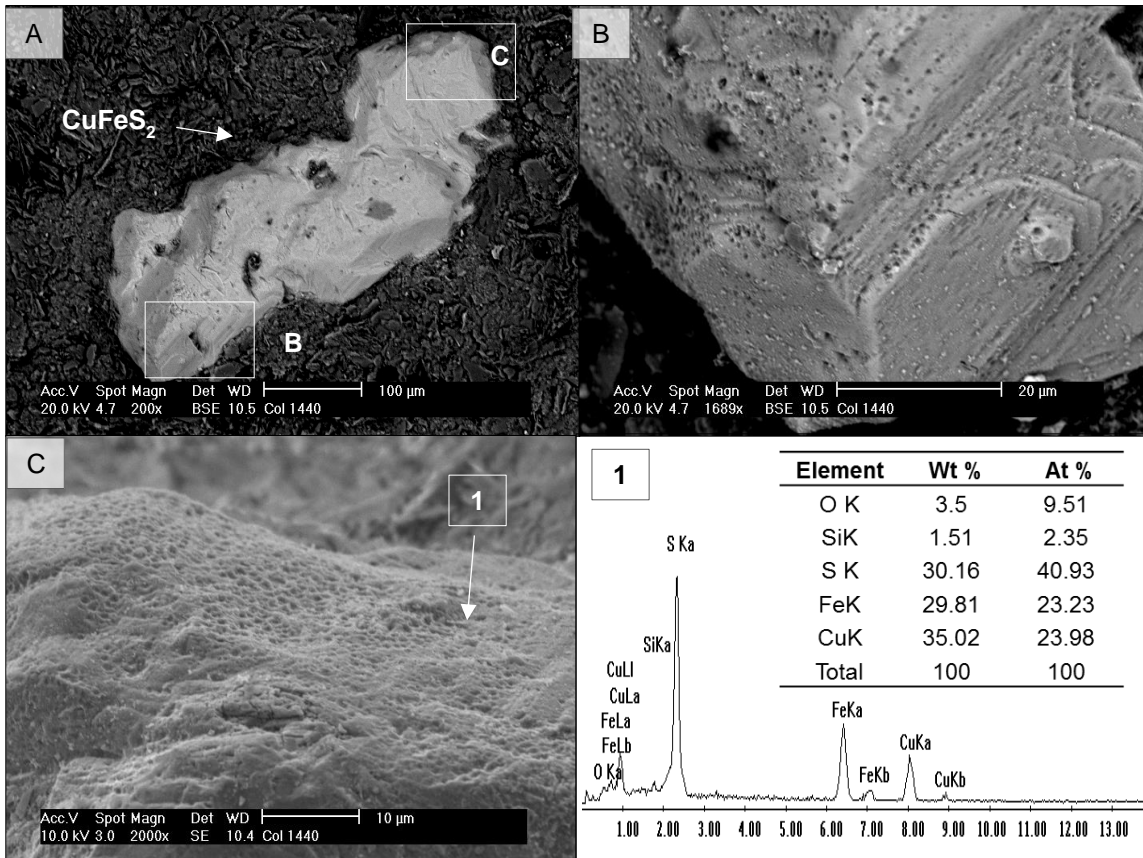
La alteración de la pirita en las restantes columnas continuó ocurriendo, principalmente en las secciones inferiores. En la columna 1 se presentó la formación de diferentes capas de alteración de óxidos de hierro sobre y junto a zonas de clivaje que comenzaban a desarrollarse. Ambas superficies muestran una textura irregular en la que parecen depositarse partículas minerales que les confieren un aspecto rugoso, que a diferencia de las anteriores capas de alteración de óxidos de hierro, en el nivel 40-50m del terrero 1320 estas no mostraron los mismos precipitados coloidales, presentando partículas con menores dimensiones y un grosor por debajo de 1  $\mu\text{m}$ . En estas el contenido de azufre disminuyó (a 35 % Wt) con respecto a aquel contenido en pirita, mientras que el hierro aumento (56.36% Wt), incorporando Oxígeno (4.03% Wt) y menores cantidades de Al y Si. La formación de clivaje presentó un patrón octaédrico específico, encontrando diversas etapas de su generación en la Figura 83B y 83C, al observar formaciones triangulares con distintas dimensiones, sobre las cuales se observa la generación y desprendimiento de la anterior formación de óxidos de hierro. En esta zona (Figura 83C) la superficie también se mostró alterada, presentando la incorporación de oxígeno y la misma disminución de azufre en su estructura, aunque en este caso no se encontraron microorganismos en la zona, tal como ocurrió para el mismo patrón de alteración en los terreros.

La formación de *pits* también ocurrió en partículas de calcopirita, encontrando una superficie con patrones circulares que indica una superficie potencialmente alterada por las condiciones de acidez generadas debido a la acción microbiana y la solución lixivante. Estas características sólo fueron desplegadas en esta partícula, ya que en otras columnas no se observaron cambios morfológicos y químicos similares, coincidiendo en las características morfológicas presentadas por la partícula de calcopirita en el nivel 0-10m del terrero 1320, donde también se encontraban microorganismos en este nivel de profundidad.



**Figura 83.** Partícula de pirita alterada en la sección final de la columna de biolixiviación 1. A) Formación de pirita alterada. B) Confluencia de distintas formaciones de alteración sobre la superficie. C) Aspecto de la superficie de pirita donde se observa la formación de clivaje. 6,400x. D) Capas de alteración de óxido de hierro sobre zona de clivaje en pirita.

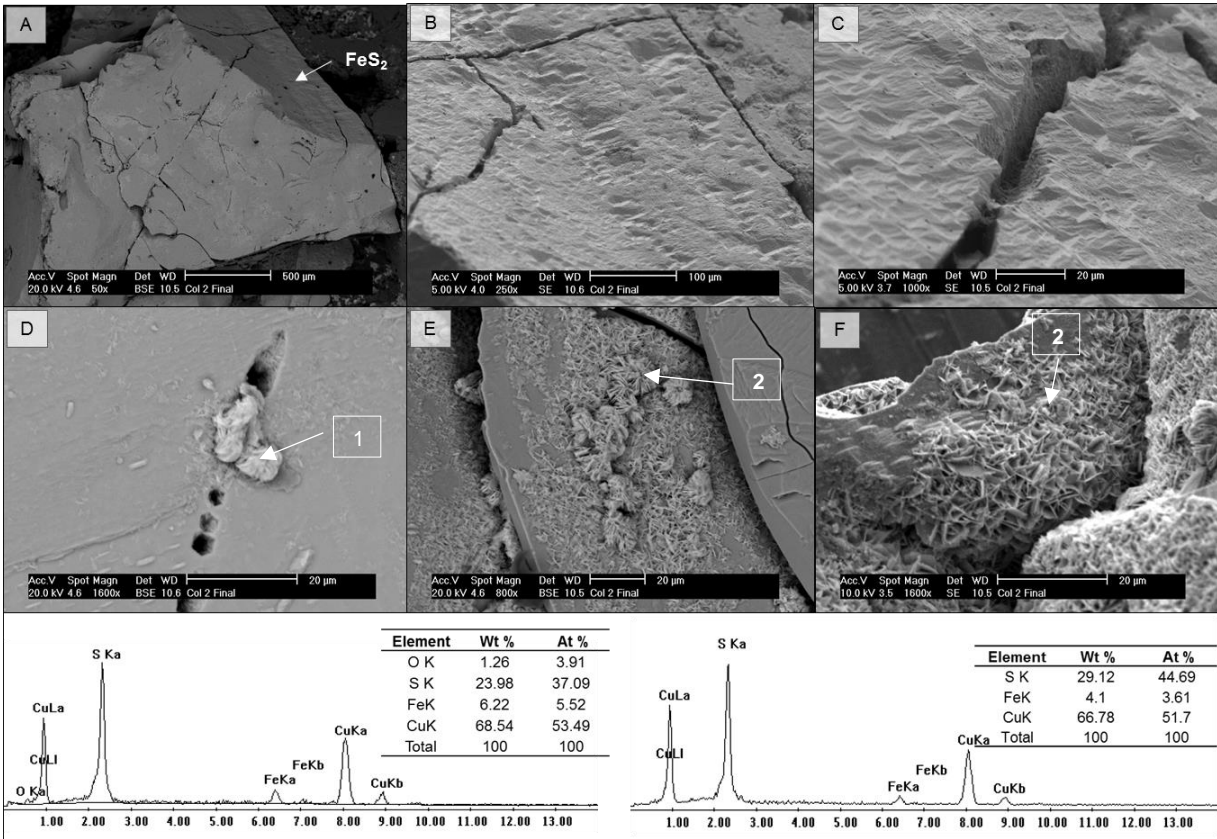




**Figura 84.** Alteración morfológica de la superficie de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en la sección final de la columna de biolixiviación 1.

Por último, la sección final de la columna 2 mostro partículas de pirita en las que se encontraron superficies alteradas y con fracturas sobre las cuales se presentaron precipitados de sulfuros de cobre de cuya composición se asemeja a aquella de la covelita ( $\text{CuS}$ ) y que ocupó extensiones cercanas a los  $100\ \mu\text{m}$  a través de la partícula señalada en la Figura 84. Al mismo tiempo se encontraron *pits* hexagonales y canales sobre la superficie debido a la oxidación de la pirita, los cuales sirvieron como punto de acumulación de los precipitados, así como los bordes de la partícula donde los precipitados exhiben un hábito cristalino lenticular que al acumularse asemeja a una formación de rosa el desierto.

Así, las secciones superiores de las columnas no mostraron las mismas características que las partículas de sulfuros en las secciones finales, señalando así una diferencia en las condiciones presentes dentro de la columna, posiblemente atribuidas a las condiciones puntuales registradas en cada una de estas.



**Figura 85.** Formación de sulfuros de cobre sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) alterada en la sección final de la columna de biolixiviación 2. A – C) Aspecto de la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en la que se observa la fractura de la partícula y el desgaste de la misma, manteniendo un relieve irregular. D) Precipitados de sulfuros cobre sobre *pits* desarrollados en pirita. E - F) Recubrimiento de pirita por precipitados laminares de cobre de similar composición a covelita ( $\text{CuS}$ ), se observa la acumulación, formando estructuras de mayor tamaño.

#### 4.1.3. Identificación de las fases minerales mayoritarias de terreros y columnas de biolixiviación por difracción de rayos X

La caracterización mineralógica de las muestras minerales se complementó mediante el análisis por difracción de rayos X de 3 diferentes muestras de los terreros de biolixiviación y 2 de columnas. Debido a que el material de los tres terreros y columnas de biolixiviación provienen del mismo yacimiento, es probable que la matriz mineral en la que se encontraron asociadas las partículas de sulfuros sea hasta cierto grado repetitiva en los diferentes niveles examinados. Tomando esto en consideración, se realizó el análisis de ciertos puntos en los terreros y columnas que presentaron características interesantes en cuanto al proceso de oxidación y transformación de las fases minerales, así como su asociación con actividad microbiana durante su caracterización por MEB-EDS. De esta manera a continuación se señalan las fases minerales mayoritarias identificadas en la tabla 6, donde además se añaden algunas otras como calcopirita, rosickyita y azufre elemental, esfalerita y rutilo; que, debido a su abundancia en la muestra analizada, fueron detectables.

**Tabla 6.** Fases minerales mayoritarias encontradas en terreros y columnas de biolixiviación

Fase mineral	Fórmula
<b>Cuarzo</b>	SiO <sub>2</sub>
<b>Illita</b>	(K,H <sub>3</sub> O)Al <sub>2</sub> Si <sub>3</sub> AlO <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>
<b>Albita - Sanidina potásica</b>	(Na,K)(Si <sub>3</sub> Al)O <sub>8</sub>
<b>Ortoclasa</b>	K(Al,Fe)Si <sub>3</sub> O <sub>8</sub>
<b>Moscovita</b>	(H,K)AlSiO <sub>4</sub>
<b>Moscovita – 3T</b>	(K,Na)(Al,Mg,Fe) <sub>2</sub> (Si <sub>3.1</sub> Al <sub>0.9</sub> )O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub>
<b>Moscovita – 2M1</b>	(K,Al <sub>2</sub> )(Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub>
<b>Clinocloro-1MIIb</b>	(Mg,Al,Fe) <sub>6</sub> (Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub>
<b>Clinocloro-1MIIb ferroan</b>	(Mg,Fe) <sub>6</sub> (Si,Al) <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>8</sub>
<b>Piropo de calcio</b>	(Mg <sub>0.742</sub> Ca <sub>0.258</sub> ) <sub>3</sub> (Al <sub>2</sub> (SiO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
<b>Kaolinita</b>	Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub>
<b>Rutilo</b>	TiO <sub>2</sub>
<b>Esfalerita</b>	(Zn <sub>0.73</sub> ,Fe <sub>0.27</sub> )S
<b>Pirita</b>	FeS <sub>2</sub>
<b>Calcopirita</b>	CuFeS <sub>2</sub>

**Tabla 6 (continuación).** Fases minerales mayoritarias encontradas en terreros y columnas de biolixiviación

Fase mineral	Fórmula
Rosickyita	S
Azufre	S <sup>0</sup>

Quizá uno de los aspectos más interesantes y de mayor relevancia tras el análisis de las muestras, fue la detección de azufre elemental. La formación de azufre se presentó en el nivel 10-20 del terrero 1320 (7% Wt), coincidiendo con el principal desarrollo de colonias microbianas sobre la superficie de distintas partículas de pirita y calcopirita en los terreros, encontrando agrupaciones desde 40 a 95 microorganismos en el caso de la calcopirita. También presente en la sección final de la columna 4 (3% Wt), la formación de azufre elemental ocurre donde la pirita presentó un avanzado estado de alteración asociado a la actividad microbiana. Al desarrollar amplias zonas de clivaje en pirita (Figuras 80 y 81); y donde, además, se encontró la presencia de microorganismos asociados a estos en su superficie (Figura 80H), así como la notable presencia de calcopirita (24 Wt%). El azufre es un producto secundario en el proceso de oxidación de sulfuros como la pirita y calcopirita, el cual representaría un indicativo del proceso de oxidación bacteriana pero también de cierta inconveniencia, debido a que la formación de azufre puede desencadenar en la pasivación de la superficie de los sulfuros de interés, impidiendo así el continuo transporte de oxígeno y hierro a la superficie, e incluso la adhesión de los microorganismos y por consecuencia la continua oxidación y liberación de cobre y de Fe(II) al medio. A pesar de esto, durante la observación mediante MEB-EDS no se observó la formación de ninguna capa pasivante de azufre sobre los sulfuros en estos niveles, en incluso en la muestra 60-70 m del terrero 1320 donde se presentaron también precipitados de azufre elemental. Por lo anterior, es posible que el azufre se haya encontrado solamente como agregados o cristales libres, que se depositaron sobre la matriz de silicatos, tal y como se observa en las Figuras 47 y 50, y seguramente en la sección final de la columna 4. Las agrupaciones laminares de azufre en la Figura 26, corresponderían a la fase de azufre identificada como



rosickyita, la cual presentó un 7% Wt de la muestra, mientras que en la columna 4 se presentó en un 3% Wt.

Los difractogramas obtenidos para cada una de las muestras se anexan a continuación, señalando las especies identificadas y los porcentajes asociadas a cada fase mineral tras realizar la semi cuantificación de estas en cada una de las muestras.

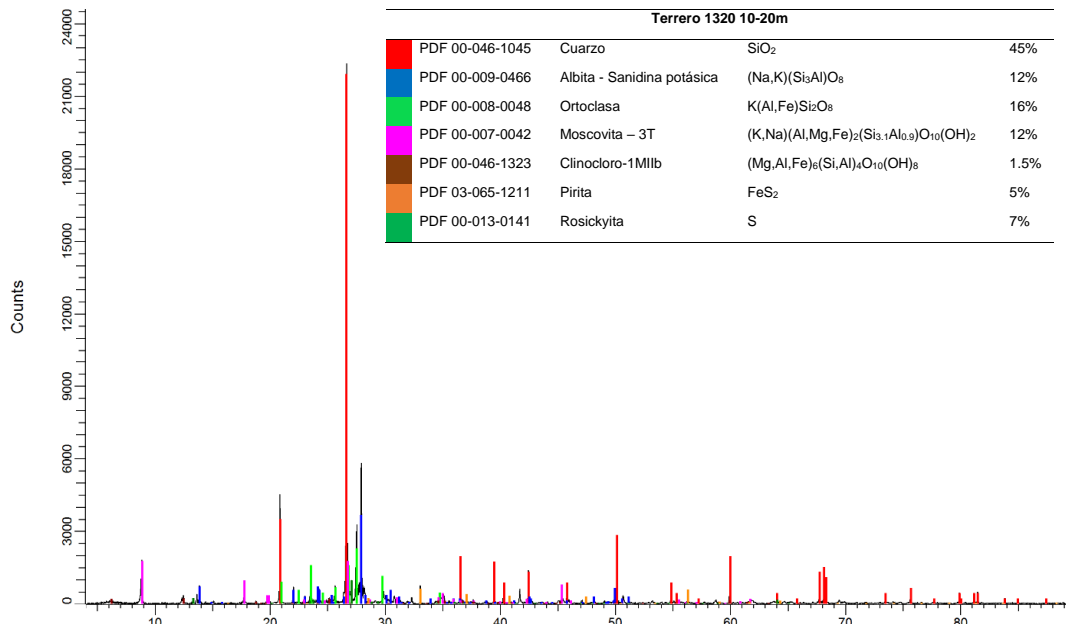


Figura 86. Difractograma correspondiente a la muestra 10-20 m del terrero 1320.

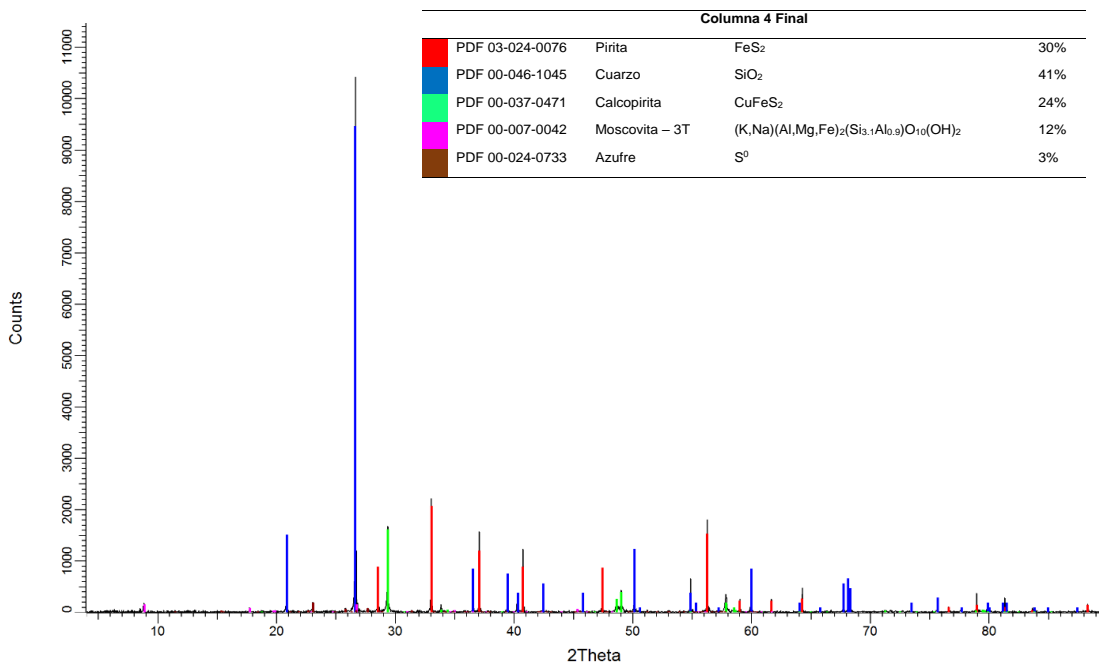


Figura 87. Difractograma correspondiente a la sección final de la columna 4.

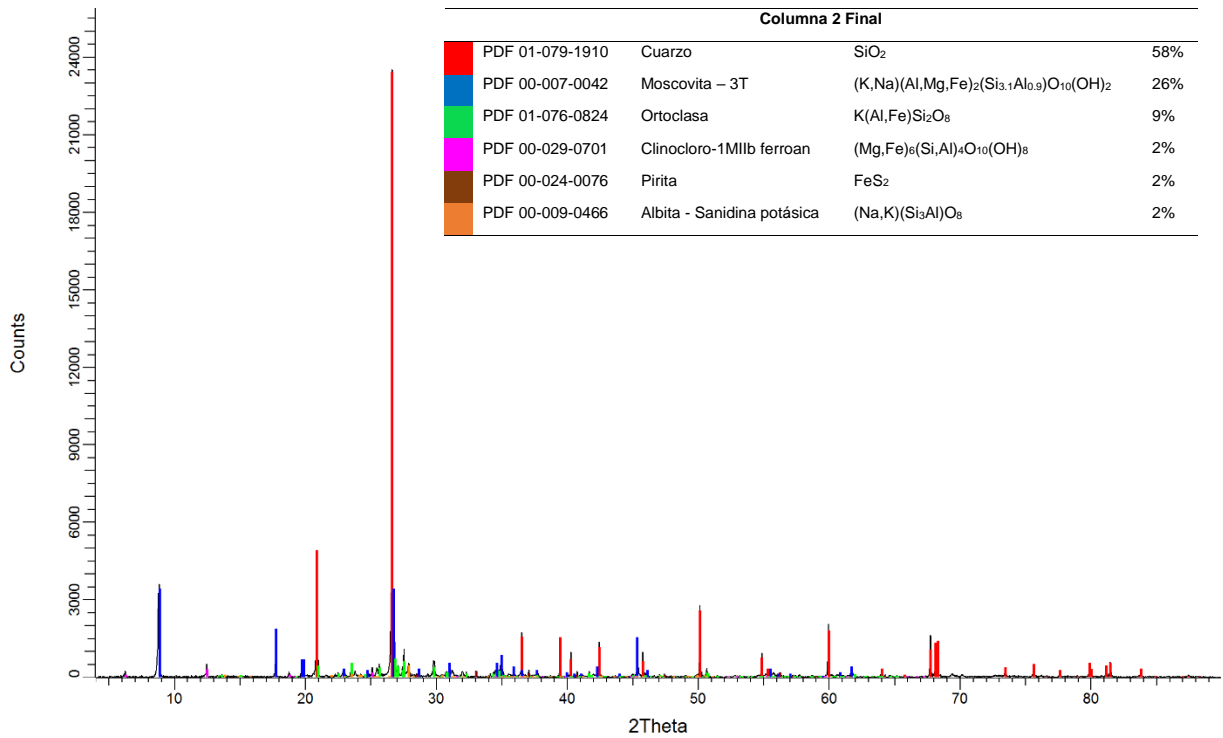


Figura 88. Difractograma correspondiente la sección final de la columna 2.

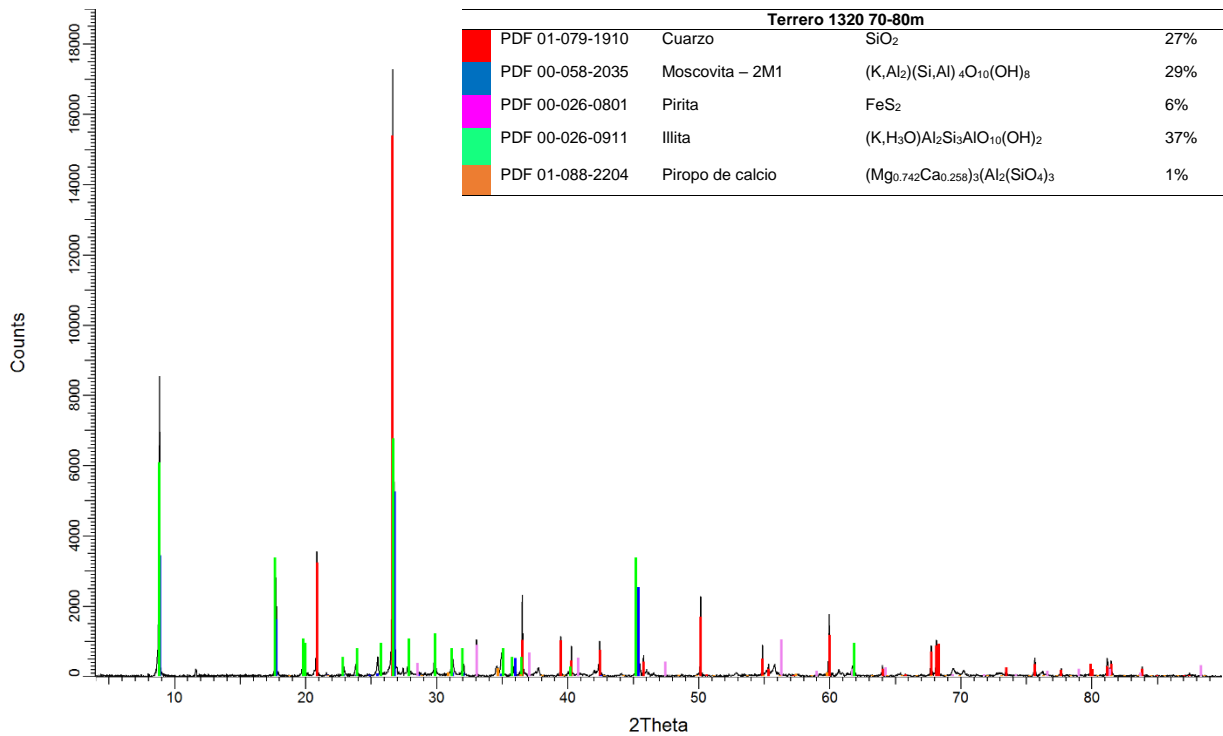
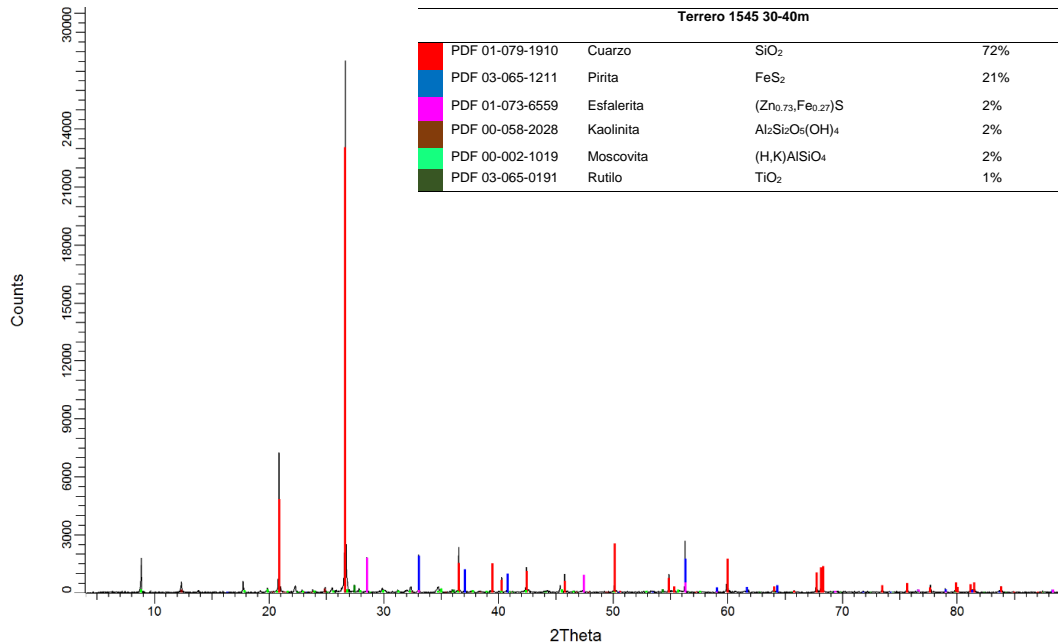


Figura 89. Difractograma correspondiente al nivel 70-80 m del terrero 1320.



**Figura 90.** Difractograma correspondiente al nivel 30-40 m del terrero 1545.

El principal constituyente de las muestras fue el cuarzo (SiO<sub>2</sub>) (27 – 72 %), seguido de los diferentes silicatos que se señalan en la tabla 6, como moscovita (29 – 2 %), illita (37 %) y ortoclasa (16 – 9%), siendo estas últimas las que se presentaron con mayor abundancia cada vez que fueron detectadas acompañando al cuarzo. Además, fue posible identificar así distintas variaciones en cuanto a estas, tal y como se señalan en la tabla 6, indicando mediante su fórmula, que elementos incorporan a su estructura. El principal sulfuro identificado fue la pirita, la cual se encontró en un máximo porcentaje de 30% Wt en la columna 4F, mientras que el menor contenido se presentó en la sección final de la columna 2 con 2% Wt. Además, también se identificó a calcopirita en un 24% en la Columna 4F y por último a esfalerita [(Zn, Fe) S] (2%) en la muestra T 1545 30-40m, así como rutilo (TiO<sub>2</sub>) (1%) en esta misma. De esta manera el análisis por DRX permitió determinar que las muestras presentan una composición similar, al detectar como componentes principales a los silicatos mencionados, además de señalar que la pirita es el sulfuro de mayor abundancia con respecto a otras fases de sulfuros, tal y como fue observado mediante MEB.

## **4.2. Presencia de microorganismos en la superficie mineral de sulfuros**

Una amplio número de familias de microorganismos interactúan con metales y minerales en ambientes naturales y sintéticos, alterando su estado físico y forma química (Gadd, 2010). Las características que presentan y la versatilidad de su metabolismo, les permiten obtener energía a partir de un amplio número de sustratos, ya sean compuestos inorgánicos u orgánicos. En el caso de los metales, la acción microbiana influye en su especiación, así como en la formación, disolución o deterioro de minerales impactando su movilidad en la biosfera; siendo de gran importancia en determinados ciclos biogeoquímicos de elementos que se encuentran en suelo, cuerpos minerales o formando parte de biomasa.

Sus características fisiológicas y metabólicas (mecanismos de transformación mineral), incluso les permiten ser considerados como un agente en procesos de extracción de metales a nivel industrial. En estos, uno de los factores de mayor relevancia para el proceso de oxidación y la consecuente disolución mineral que llevan a cabo, es el contacto de los microorganismos con las partículas minerales de interés. Su importancia radica en la cercanía al sustrato necesario para las distintas familias de microorganismos procariontes (bacterias y archeas), la producción de EPS, su asociación con otros microorganismos del medio y la consecuente formación de biopelícula. Es así que un mejor entendimiento del proceso de biolixiviación implica investigar la adhesión o contacto de los microorganismos al sustrato mineral de interés y la formación de biopelícula (Dockrey et al., 2014).

La interacción bacteria-mineral, ha sido evaluada anteriormente bajo múltiples condiciones en laboratorio (Edwards et al., 2000; Kinzler et al., 2003; Rodríguez et al., 2003; Lara et al., 2010; Florian, 2012; Africa et al., 2013; Zhao et al., 2013; Noel, 2014; Zhang et al., 2014; Li y Sand, 2017), sin embargo, su estudio en una operación a nivel industrial no ha sido totalmente abordado. En una operación de biolixiviación de estas condiciones (biolixiviación en montones y residuo minero metalúrgicos), un amplio número de factores determinan la

interacción de los microorganismos con las fases sólidas minerales, presentándose condiciones potencialmente distintas a aquellos recreados en laboratorio debido a la heterogeneidad en condiciones fisicoquímicas de una operación a gran escala, ya que los microorganismos interactúan con una matriz mineral compleja tanto en composición como en morfología. Bajo este escenario, el estudio de muestras minerales provenientes de una operación de biolixiviación de terreros para la extracción de cobre, permitirá estudiar la interacción física y el comportamiento que los microorganismos presentan de forma *in situ* con las partículas minerales en una de las principales variantes operacionales en la extracción de cobre.

Una efectiva adhesión y colonización de la superficie mineral de sulfuros por los microorganismos es un factor crítico para su proliferación y una eficiente disolución mineral (Africa et al., 2013). Es así que es importante comprender este proceso y el destino de los microorganismos dentro de una operación de biolixiviación, lo cual impactará en su desarrollo general. Para identificar la presencia y la potencial interacción física que los microorganismos pueden mantener con distintas fases de sulfuros que componen las muestras de terreros y columnas de biolixiviación de La Caridad, en el presente trabajo de investigación se obtuvieron muestras minerales directamente de una operación de biolixiviación de terreros de baja ley de cobre, donde se examinó la superficie de las distintas partículas de sulfuros y mineral de ganga que las conformaban en busca de microorganismos acidófilos. El estudio consistió en inspeccionar partículas minerales de tres depósitos de terreros a diferentes profundidades mediante Microscopía Electrónica de barrido (MEB) y en conjunto con EDS realizar análisis químicos puntuales de la superficie en la cual se encontraron. De esta manera, se examinaron cada uno de los niveles de profundidad señalados en la tabla 4, a intervalos de 10 metros de tres terreros de biolixiviación, identificados con las claves T -1320, T-1420 y T-1545. De la misma forma, y para evaluar potenciales cambios en cuanto a la interacción de los microorganismos al encontrarse en un ambiente con mayor control, se analizaron muestras de columnas de biolixiviación a nivel laboratorio de tres metros de alto, las cuales fueron divididas en dos secciones de

un metro y medio de longitud. Bajo este escenario, se identificará la interacción de los microorganismos con sulfuros en una matriz mineral compleja, en donde se encuentran distintas fases minerales adicionalmente a los sulfuros metálicos. Además, debido a la preparación previa para muestras biológicas, en este caso microorganismos sobre muestras minerales, y el uso de MEB en conjunto, se podrá observar tridimensionalmente las estructuras bacterianas, así como aquellas características que desplieguen las fases minerales de interés sobre las cuales estén posicionadas. Cabe destacar que, a diferencia de otros estudios, la identificación y observación de los microorganismos se realizó sin ningún método de tinción celular que permitiera su localización rápidamente, sino que en este caso su búsqueda se basó en la exploración y análisis minucioso de las partículas de interés. De esta forma, se pretende no alterar o intervenir aún más en el medio explorado y obtener información que refleje las condiciones *in situ* en las que se encontraron los microorganismos.

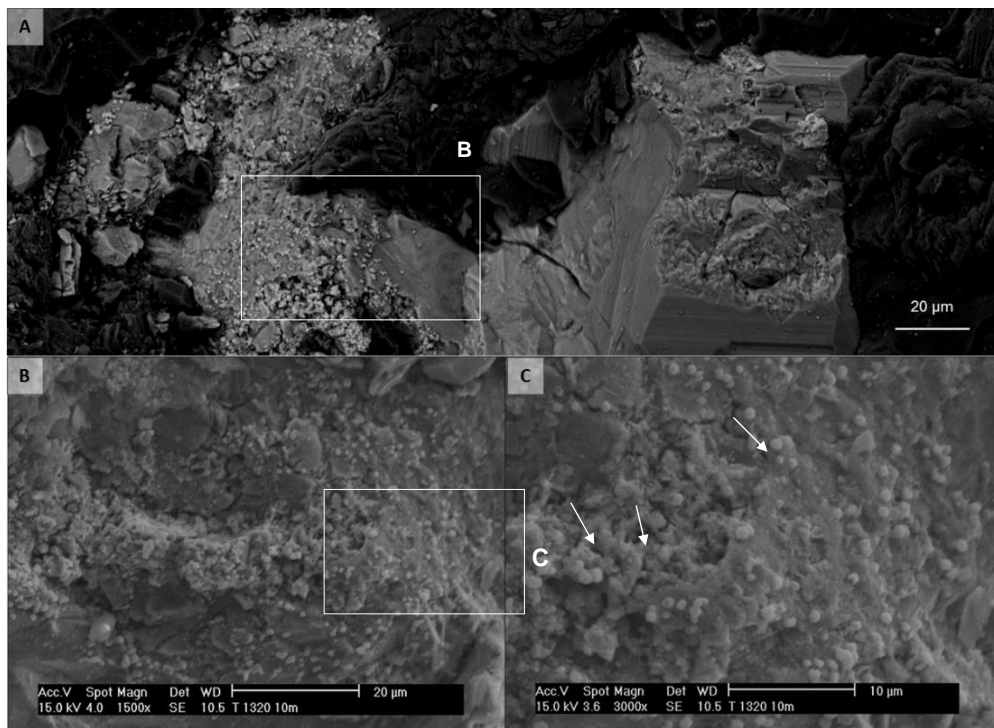
#### **4.2.1 Adhesión y contacto de microorganismos sobre partículas de pirita (FeS<sub>2</sub>)**

La interacción de los microorganismos con sulfuros metálicos ocurre en una matriz mineral compleja tanto en terreros como columnas, donde se encuentran distintas fases minerales asociadas a los sulfuros metálicos; como los microorganismos entrarían en contacto con un gran número de partículas a través de los niveles de profundidad, en este trabajo se describe su interacción con las partículas de sulfuros, reportando los hallazgos efectuados por fase mineral o de acuerdo al componente mayoritario de estas con respecto a la muestra y al nivel de profundidad en el que se encuentren.

#### 4.2.1.1 Terrero 1320 (T – 1320)

Debido a las características del yacimiento mineral del que provienen (pórfido cuprífero), las muestras minerales de los terreros presentan una mayor abundancia de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) con respecto a otros sulfuros metálicos, lo que representa una mayor posibilidad para que las bacterias se adhieran a este tipo de partículas, ya que constituye una mayor superficie disponible para su adhesión y colonización con respecto a otras fases minerales.

Las partículas de pirita fueron abundantes en los tres terreros de biolixiviación, así como en las columnas a través de las diferentes secciones o niveles de profundidad. Algunas de las fotomicrografías más representativas de la interacción de microorganismos con pirita en los terreros de biolixiviación se presentan en las siguientes figuras, donde en cada imagen se señalan las condiciones especiales de operación del MEB (distancia de trabajo, spot size, voltaje de aceleración, magnificaciones y escala) que permitieron la observación de los microorganismos en contacto con la superficie mineral.

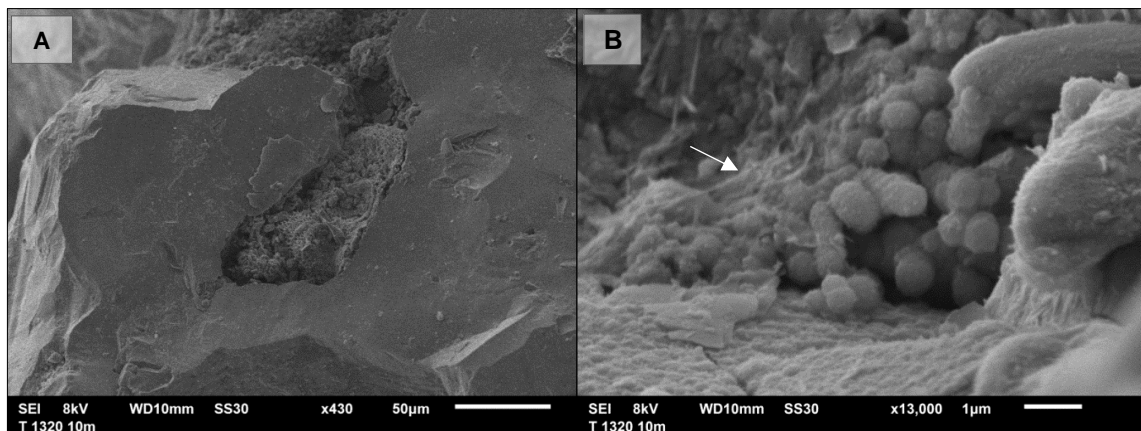


**Figura 91.** Fotomicrografías de partícula de Pirita  $\text{FeS}_2$  con un evidente estado de alteración en el terrero T – 1320. B) y C) Acercamiento en la zona izquierda de la partícula donde se puede apreciar microorganismos con una morfología cocoide



En el caso del terrero 1320 (T-1320) se encontró evidencia de actividad microbiana a través del contacto de microorganismos con partículas de pirita en los primeros metros de profundidad. La **Figura 92** muestra una partícula de pirita dentro de los diez primeros metros de profundidad del terrero 1320 con un visible estado de alteración, en la que se distingue la presencia de microorganismos con una morfología cocoide de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estos se ubican principalmente a la izquierda de la partícula, donde los microorganismos se presentan sobre una capa de alteración de la propia pirita, sin excretar EPS o presentar una asociación por dicho medio. A pesar de no evidenciar la producción de EPS a 3000 X, algunas de estas células se encuentran dividiéndose o replicándose, tal como se señala con flechas en la Figura 92C. La distribución de los organismos cocoides sobre la partícula no es uniforme, sin presentarse en aquellas zonas en la que la pirita no muestra signos de alteración en su superficie.

A la misma profundidad, en una segunda muestra se identificó la presencia de microorganismos esta vez posicionados en defectos de la superficie de pirita como oquedades o zonas con desarrollo de clivaje.



**Figura 92.** Colonia de microorganismos dentro de una oquedad de la superficie de pirita a 10 metros de profundidad del Terrero 1320. A) Oquedad en la superficie de pirita ocupada por una colonia de microorganismos. 430x. B) Amplificación de la primera imagen a 13,000x, se muestran microorganismos adheridos a la superficie mineral; se observa el despliegue de EPS sobre la superficie de pirita, así como replicación de los organismos cocoides, lo que indica actividad metabólica.

La población microbiana en los terreros de biolixiviación y columnas, consiste en diferentes clases de microorganismos, difiriendo en características morfológicas, metabólicas y condiciones aptas de desarrollo (Tabla 3). A pesar de estas diferencias, en la literatura se ha remarcado la importancia de su interacción para el proceso de oxidación mineral, observando convivencia de los microorganismos en estudios a nivel laboratorio (Florian, 2012; Noël, 2014) . En la **Figura 93A** se encuentra una colonia de microorganismos ubicada en una partícula de pirita, apreciando la integración de diferentes clases de microorganismos ubicados en el mismo sitio de la superficie mineral; siendo posible distinguirlos por su morfología bacilar y cocoide. Los microorganismos se encuentran ocupando una oquedad de la pirita de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de longitud, sin apreciar su presencia en la superficie regular en los alrededores de esta zona. Un acercamiento a la zona mencionada (**Figura 93B**) permite observar a mayor detalle la convivencia entre los microorganismos, además de la presencia de EPS o polímeros desplegados sobre la superficie mineral y sobre los mismos microorganismos con morfología cocoide.

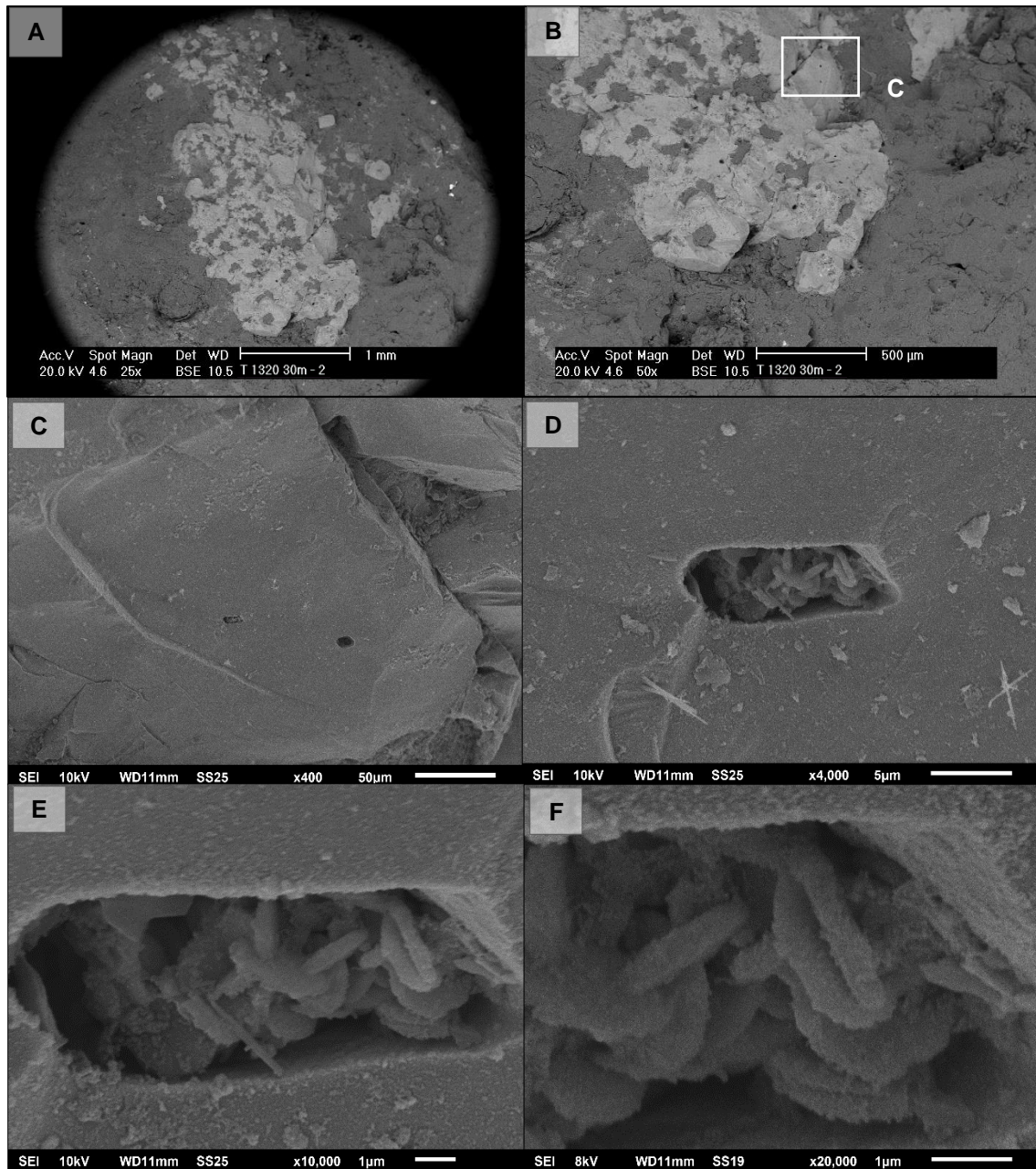
Es posible observar un mayor número de células cocoides unidas entre sí junto a los bacilos en la derecha de la imagen, donde también se encuentran embebidos en polímeros, lo que no permite distinguirlos individualmente (flecha). Debido a la interacción de los diferentes tipos de microorganismos, esta imagen coadyuva a aseverar una posible relación sinérgica entre los organismos bacterianos presentes en el medio lixivante, situación de gran importancia en una operación de biolixiviación debido a las diferentes capacidades metabólicas que poseen y que se complementan durante el proceso de oxidación mineral. Además, los organismos cocoides se encuentran atravesando un proceso de replicación celular, al observar signos de su división en el centro de la fotomicrografía; lo cual indica que en este punto ocurría actividad metabólica previo al momento en que los microorganismos fueron sometidos al proceso de preparación para su observación por MEB.

A mayor profundidad dentro del terrero, la **Figura 94** presenta una partícula de pirita en el nivel de 30 m, en donde se encontraron microorganismos con una morfología bacilar y pleomórfica a los encontrados en niveles anteriores. De manera general, la partícula de pirita no presenta una avanzada alteración morfológica en su superficie (Figura 5.3 A y B), ya que sólo exhibe desarrollo de clivaje o *pits* de corrosión aislados en los extremos de la partícula. La **Figura 94C** muestra dos orificios con estas características, aislados en una zona regular de la superficie de pirita. Dentro de uno de los orificios con forma alargada y redondeada en sus extremos (*Rod shaped pits*) y de 13  $\mu\text{m}$  de largo por 5  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 94D, 94E y 94F), se observan microorganismos bacilares con 1  $\mu\text{m}$  de longitud adheridos entre sí y a la fase sólida mineral. Cabe destacar que este tipo de patrones de alteración están relacionados con la presencia y oxidación directa de los microorganismos sobre la superficie mineral, según se aprecia en su estructura, lo cual es semejante a aquella que es provocada por algunos microorganismos (Edwards et al., 2000; Edwards et al., 2001). En este caso, el encontrar un conjunto de bacterias dentro de dichos patrones de forma *in situ* en los terreros de biolixiviación refuerza dicha teoría. No obstante, tal y como lo menciona Pisapia et al. (2008), el desarrollo de *pits* con mayores dimensiones y con mayor profundidad no puede atribuirse a sólo una célula microbiana, por lo que lo observado en la Figura 80 puede tratarse de sitios donde la oxidación bacteriana ha sido continua y conjunta por un mayor número de microorganismos. Además, ya que en el orificio cercano no se encontraron microorganismos, es posible que estos puedan posicionarse y/o desprenderse de dichas formaciones en determinada instancia, tal como lo propuso Edwards et al. (2001).

Por otra parte, cerca de los microorganismos encontrados en esta muestra se presentaron tres formaciones de potencial origen microbiano sobre la superficie de pirita, ya que su morfología discrepaba con las fases minerales observadas previamente; por lo que se observaron a mayor detalle para corroborar si podría atribuírseles este origen. La **Figura 95** indica su ubicación sobre la pirita; distinguiéndose por una tonalidad oscura al observar la muestra mediante electrones retro dispersados (BSE).

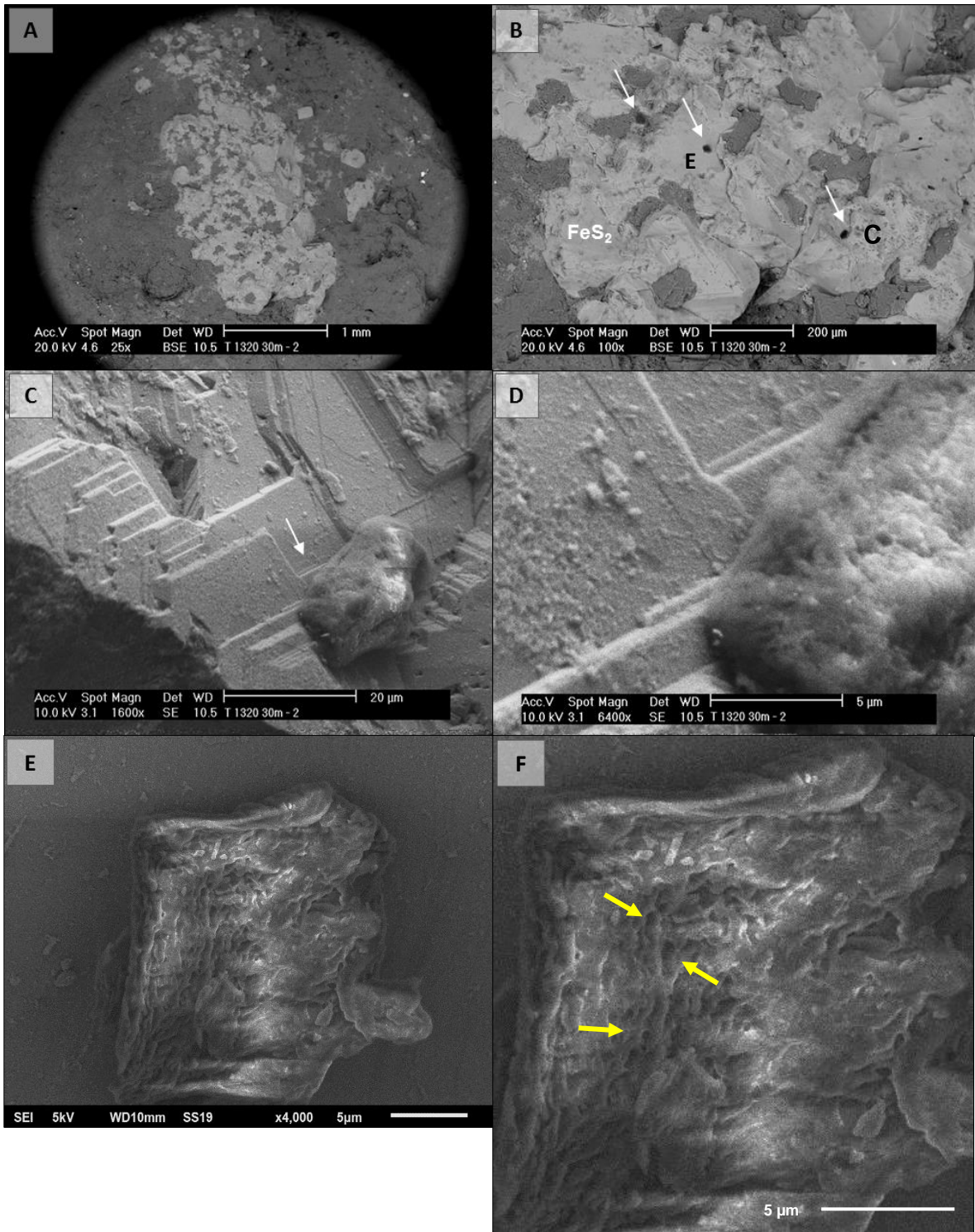
A 1600x magnificaciones, en la **Figura 95C** se observa una de las potenciales estructuras microbianas posicionada sobre una zona de amplio desarrollo de clivaje. A 6400x (Figura 95D) se observa a mayor detalle; identificando una estructura sólida no uniforme, con un relieve irregular y bordes redondeados; presentando cerca de 20  $\mu\text{m}$  de espesor, por lo que capas de exopolímeros podrían conformarla. Debido a estas características podría tratarse de una biopelícula en estado de madurez, en el que varios microorganismos pueden encontrarse embebidos en una matriz de polímeros muy desarrollada (Donlan, 2002). Además, en su estructura se observan varios orificios, los cuales podrían tratarse de canales de comunicación, característicos de una biopelícula con un avanzado desarrollo. Los canales de comunicación en una biopelícula son aquellas zonas en las que debido a su estructura se permite el flujo de la solución del medio en el que se encuentren, y, por lo tanto, nutrientes y oxígeno son transportados a través del área que ocupa la biopelícula, permitiendo que estos difundan hacia el espacio donde las células se encuentran (Donlan, 2002).

En la siguiente fotomicrografía (Figura 95E) se observa una segunda estructura de polímeros, la cual mantiene una morfología superficial similar a la anterior. Debido a esta estructura sólida, también podría considerarse como un biopelícula maduro, en donde se aprecia la integración y superposición de diferentes capas de polímeros; entre las que se despliegan posibles canales de comunicación sobre la mayoría de su superficie (flechas amarillas) (Figura 95F).



**Figura 93.** Partícula de Pirita ( $\text{FeS}_2$ ) a 30 metros de profundidad en el Terrero T -1320. A) y B) vista general de la pirita a 25x y 50 x; C) Presencia de microorganismos posicionados dentro de un orificio en superficie de pirita. D) Se aprecia la interacción de microorganismos con una misma morfología bacilar. Se observan precipitados esféricos sobre la superficie de las células bacterianas.

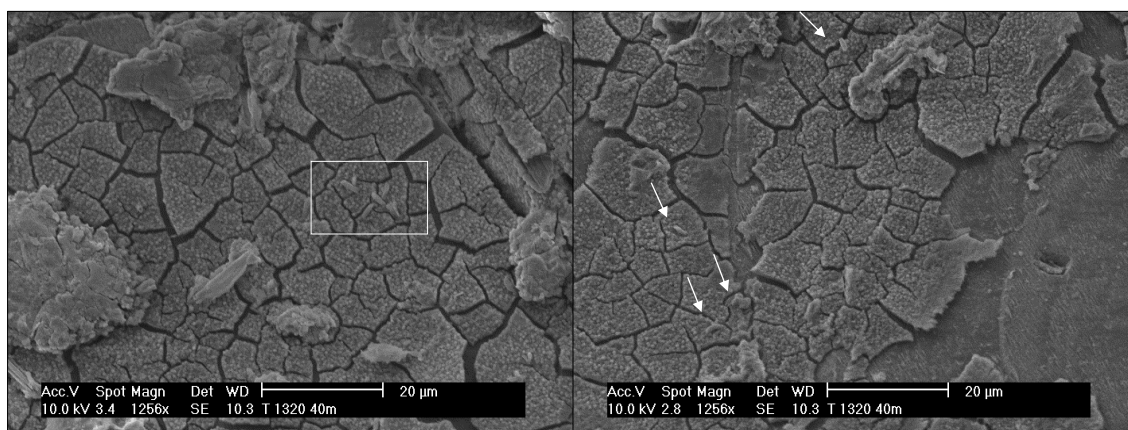




**Figura 94.** Polímeros extracelulares posicionados sobre la superficie de pirita en el terrero T-1320 a 30 m de profundidad. A) Vista general de pirita a magnificación de 25x. B) Matriz de pirita señalando la presencia de diferentes formaciones de polímeros. C y D) Magnificaciones a 1,600x y 6,400x de la matriz de polímeros posicionada sobre zona de clivaje. E) Biofilm maduro sobre superficie regular de pirita. F) Acercamiento de la superficie del biofilm, se señalan algunos de los canales de comunicación que presenta.

A 40 metros de profundidad se encontró un gran desarrollo de capas de oxidación sobre la superficie de pirita, la cual conformaba la mayoría de la muestra, tal y como se mencionó anteriormente (Figura 40). La superficie de pirita se encontró alterada tanto morfológica como químicamente, en la que se encuentran capas de oxidación comprendidas de óxidos de hierro, así como partículas coloidales de sílice que se observan adheridas o depositadas sobre estas. La **Figura 96** presenta dos zonas de la muestra en donde se aprecian las características morfológicas de la capa de alteración sobre la pirita, aunado a las formas bacilares que difieren de la textura de la superficie.

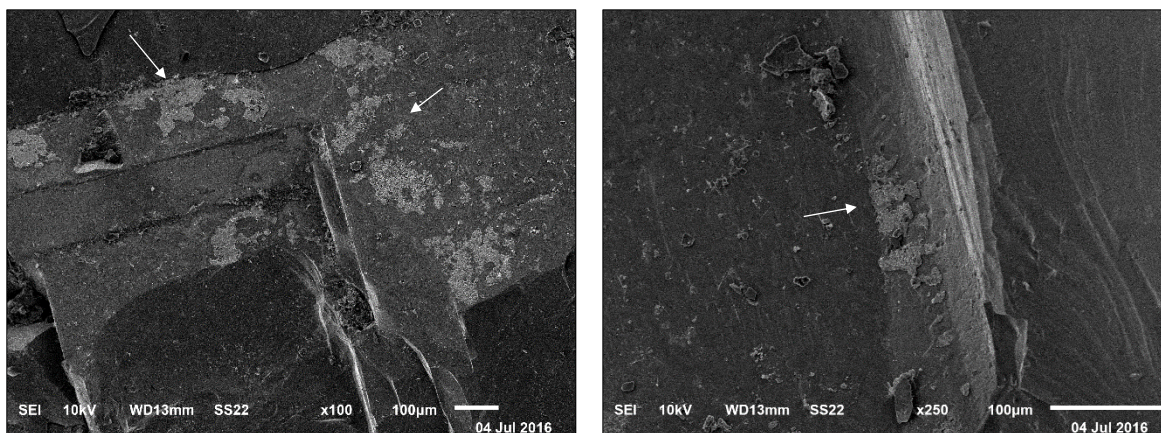
A diferencia de los niveles superficiales, las partículas de pirita atraviesan condiciones distintas, así como los microorganismos, que se encuentran aún más aislados que los observados anteriormente, ya que en la **Figura 96A**, sólo se observan 6 bacilos adheridos a la capa de oxidación de la pirita, mientras que la Figura 96B muestra bacilos individuales separados por micrómetros de distancia (señalados con flechas). La distribución de los microorganismos no despliega un patrón en especial, ya que se encuentran sobre fracturas, bordes y en el centro de los fragmentos que componen la capa de alteración. Contrastantemente, es importante destacar que su presencia no se registró en aquellas zonas cercanas de pirita sin alterar. Por lo anterior es posible que una vez que ha sucedido la transformación química de la superficie y la capa de alteración se desprende, los microorganismos adheridos a esta regresan a la solución del medio.



**Figura 95.** Microorganismos posicionados sobre una capa de oxidación desarrollada sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el terrero 1320 en el nivel 40-50m de profundidad.

#### 4.2.1.2 Terrero 1440 (T-1440)

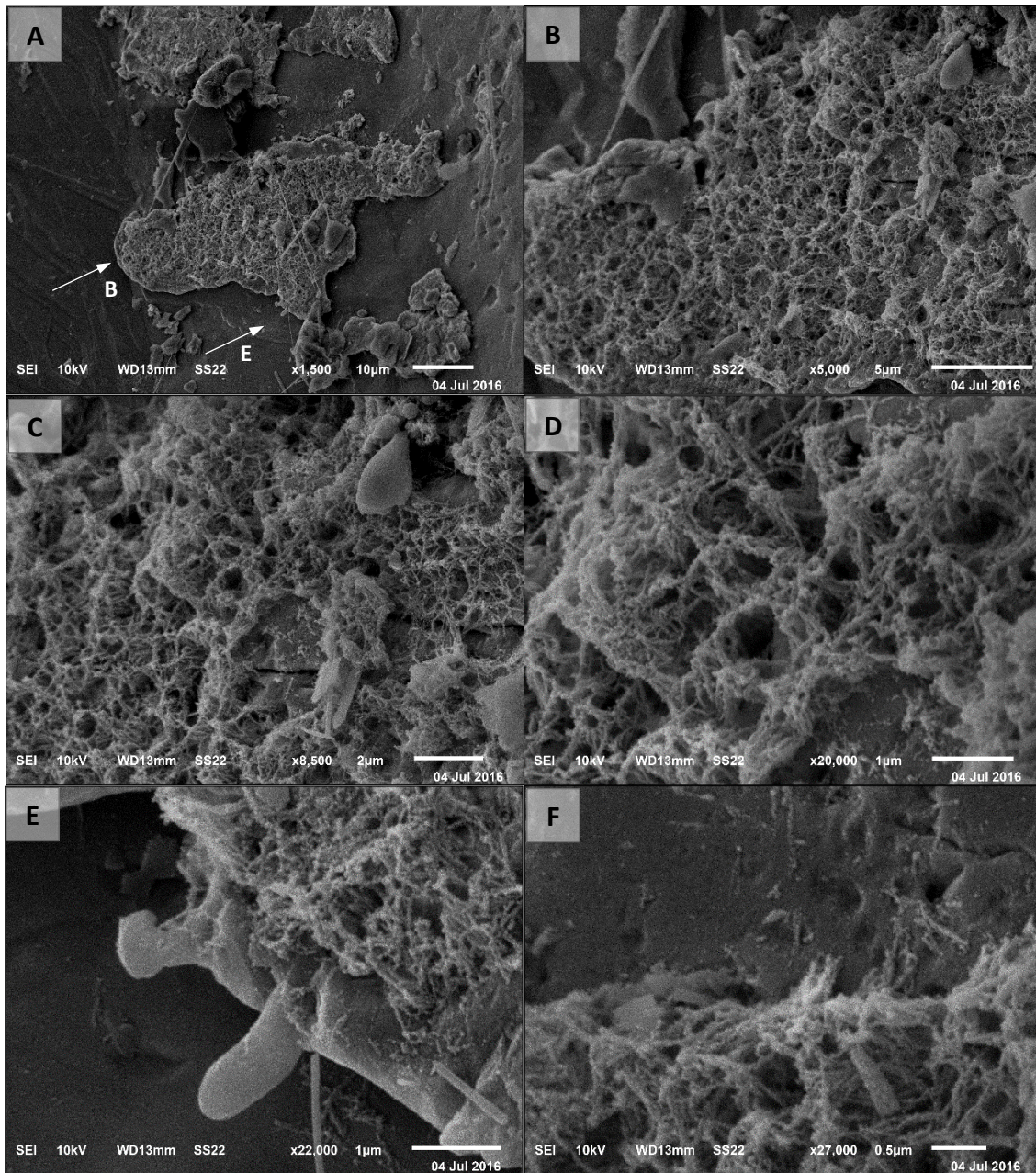
En los primeros diez metros del terrero 1440 se apreció como las partículas de pirita que conformaban las muestras minerales no presentaron notorios signos de alteración química, morfológica o de desarrollo de clivaje en la mayoría de su superficie. Contrastantemente, se pudo apreciar una mayor presencia de microorganismos y desarrollo de biopelícula sobre la superficie de distintos puntos de las muestras evaluadas en el nivel 0-10 metros. En este caso, el desarrollo de biopelícula se pudo apreciar sobre zonas con un relieve regular de la superficie mineral, recubriéndola parcialmente como se ilustra en la Figura 97.



**Figura 96.** Desarrollo de biopelícula sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 0 – 10 metros del Terrero 1440.

En la **Figura 97** se observa biopelícula desarrollada sobre la superficie de pirita en distintos puntos, los cuales incluso resaltan en tonalidad al ser observadas mediante el modo de electrones secundarios al MEB. Uno de los hallazgos más importantes en este punto fue el observar la morfología que la biopelícula desplegaba en los terreros de biolixiviación, ya que en otros niveles no se había encontrado tan claramente su desarrollo. El desarrollo de biopelícula se observó sobre superficies planas de la pirita, sin encontrar un avanzado desarrollo de clivaje o *pits* atribuidos a las condiciones ácidas de la operación, pues únicamente se apreciaron cerca de fracturas sobre la partícula mineral. La morfología de la biopelícula fue asimétrica, presentándose en áreas de diferentes dimensiones, abarcando incluso más de 100  $\mu\text{m}$  de longitud en las más extensas.

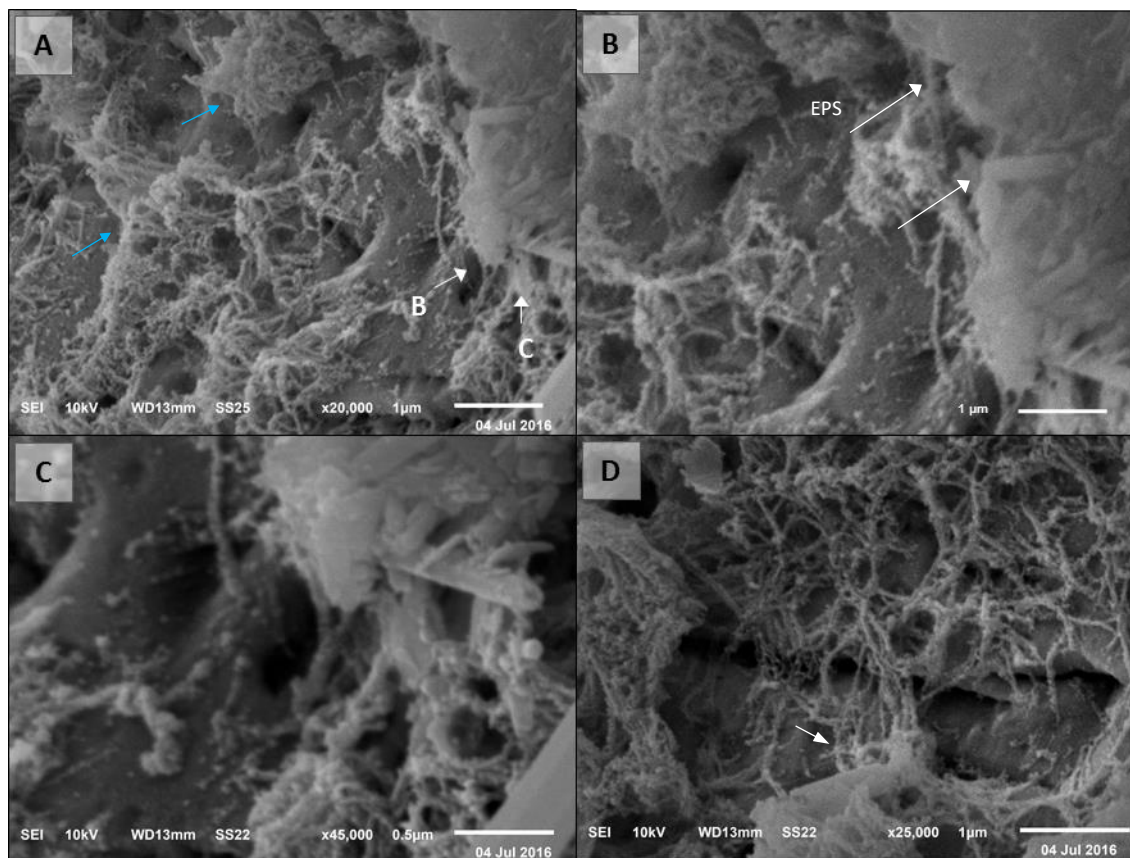




**Figura 97.** Biopelícula desarrollada sobre Pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el nivel 0-10 m en el terrero T – 1440. A) Aspecto de diferentes estructuras de biofilm a una magnificación de 1,500x. B y C) Características de la estructura de biopelícula a 5,000x y 8,500x, respectivamente. La biopelícula se compone de estructuras en forma de filamentos que se extienden a través de la superficie, convergiendo y dando paso a la formación de estructuras con mayores dimensiones conformadas por los filamentos de EPS, así como fragmentos de EPS de apariencia sólida. E) Amplificación cercana a los bordes de la biopelícula donde se observa un bacilo de aproximadamente  $1\mu\text{m}$  en los bordes. F) Apariencia de la estructura de EPS que conforma el biofilm comparada a la superficie de pirita.

La **Figura 98** muestra una de las primeras biopelículas observadas a grandes magnificaciones, la cual se extiende por cerca de 60  $\mu\text{m}$  de longitud sobre lo que aparenta ser una capa de oxidación o precipitado sobre la pirita (Figura 98 A). La biopelícula muestra una cobertura parcial de la superficie, ya que se aprecia la base en la que está posicionado al observarlo con mayor detalle a 5,000 y 8,500 magnificaciones (**Figuras 98B y 98C**), respectivamente). Además, estas imágenes permiten apreciar las características morfológicas de la biopelícula, el cual se encuentra conformado en su mayoría por diferentes estructuras de sustancias extracelulares poliméricas que presentan la forma de filamentos o fibras que se extienden sobre la superficie mineral observada; además de detectar la presencia de estructuras con aspecto más compactado posicionadas sobre estas en determinados puntos.

La estructura de la biopelícula asemeja una red formada por los filamentos mencionados, los cuales se entrelazan entre sí bajo una configuración determinada, extendiéndose a través de la superficie en forma tridimensional mostrando cierto espesor (Figura 98C). Al entrelazarse forman estructuras de mayor dimensión y complejidad, que parecen dar paso a arreglos con mayor solidez debido a su unión; presentando un patrón definido de orificios redondeados a lo largo de esta (Figura 98D). Un punto de acumulación de EPS y por lo tanto un ejemplo de la unión de las fibras de polímeros se observa en las **Figuras 98E y 98F**. En la primera imagen se puede apreciar un bacilo adherido a uno de los bordes de la capa de alteración sobre la cual se desarrolla la biopelícula; mientras que, por otro lado, la última fotomicrografía presenta la distinción entre la superficie mineral sin su recubrimiento y la zona que presenta EPS.

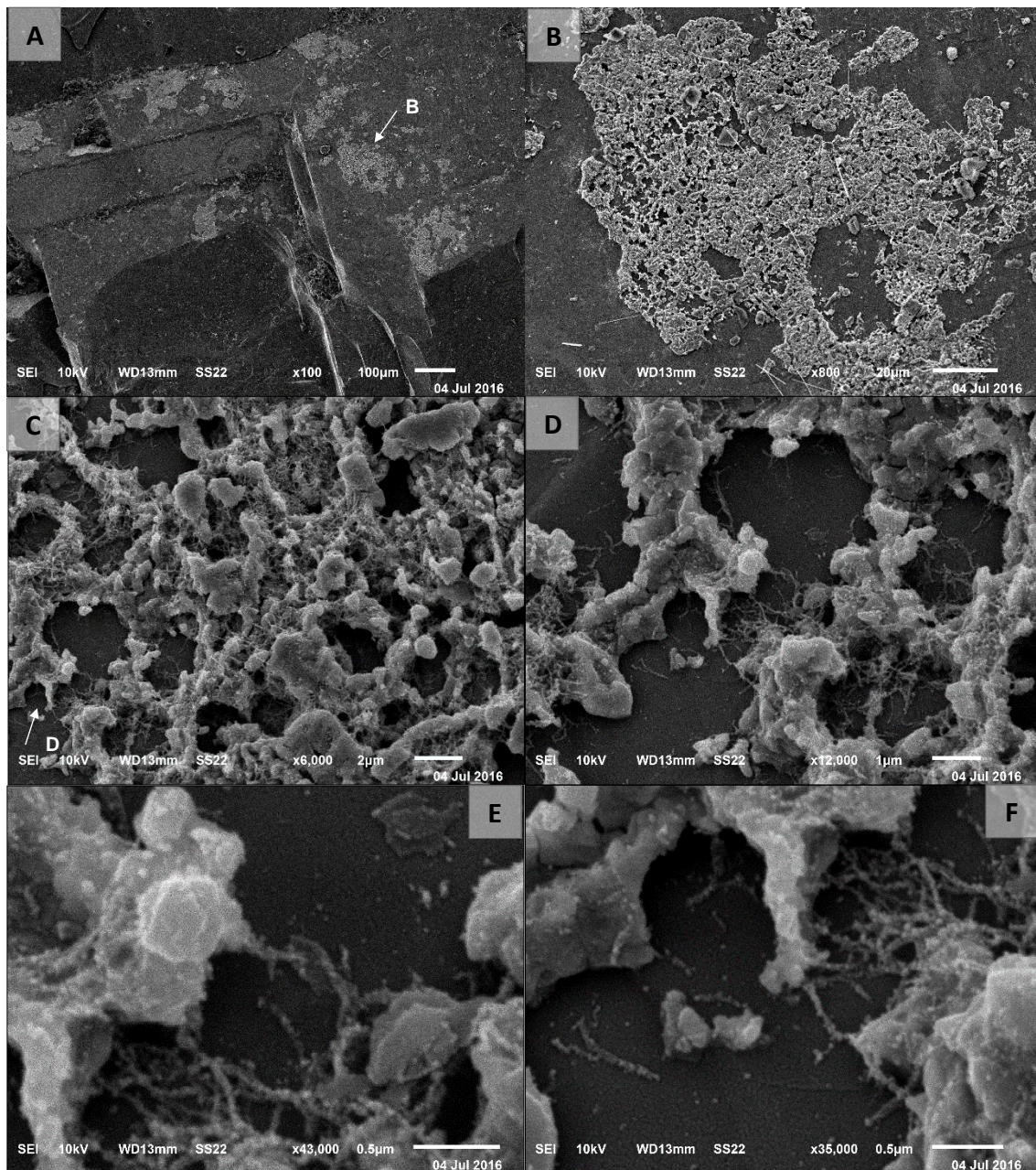


**Figura 98.** Microorganismos embebidos en una matriz de exopolisacáridos dentro del biofilm desplegado sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ). B) Acercamiento a la zona donde microorganismos se encuentran embebidos. C) Borde de la matriz de exopolisacáridos, se observan microorganismos. D) Despliegue de filamentos presumiblemente de polímeros sobre pirita.

En la **Figura 99 B** se presenta un acercamiento a una zona de la biopelícula de la figura anterior, en donde se apreciaba una estructura sólida compactada a menores magnificaciones. Al observar con mayor detalle, se advierte una matriz de polímeros en la que se encuentran embebidos diferentes microorganismos con una morfología bacilar. Dentro de la matriz de polímeros (EPS) se aprecia su distribución, encontrándose alineados unos junto a otros, o sobrepuestos sobre sí mismos en determinadas zonas, unidos por sustancias extracelulares poliméricas (EPS). En los bordes de dicha estructura (Figura 99C) se aprecia con mayor detalle algunos de los microorganismos que forman parte de la biopelícula, los cuales no están recubiertos totalmente por la matriz de polímeros. Adicionalmente, en las diferentes zonas de la biopelícula que ilustra la Figura 99C y 99D, se observa el despliegue de fibras o filamentos desde la matriz de EPS y los microorganismos que



la integran hacia sus alrededores sobre la superficie mineral. Lo anterior coadyuva a aseverar su naturaleza como polímeros; dando formación a estructuras con mayores dimensiones y morfología peculiar al entrelazarse (flechas azules); desencadenando en el desarrollo de capas de polímeros y finalmente en la biopelícula que recubre la superficie de pirita.



**Figura 99.** Biopelícula desarrollada sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el terrero 1440 en el nivel 0 – 10 m de profundidad.

La **Figura 100A** muestra siete distintos puntos de formación de biopelícula, encontrándose cerca de líneas de fractura o en los bordes de la partícula se aprecia una superficie mineral continua en donde están ubicadas, careciendo tanto de alteraciones morfológicas como químico mineralógicas. Al acercarse a una de las biopelículas, en la **Figura 100B** se aprecia una morfología asimétrica, expandiéndose de forma irregular por cerca de 100  $\mu\text{m}$  directamente sobre la superficie mineral. Esta incluye ramificaciones y espacios dentro de la formación, por lo que es posible identificar aquellas zonas de la superficie de pirita no ocupadas.

A mayor magnificación (6,000x), en la **Figura 100C** se aprecia con sumo detalle las características de la biopelícula. En esta, se identifica como se despliegan las sustancias extracelulares poliméricas que la conforman y adoptan distintas configuraciones. Las matrices de polímeros mantienen diferentes espesores en el orden de micrómetros, encontrándose interconectadas entre sí estableciendo estructuras alargadas en forma de túbulos; o bien, matrices de EPS en forma esférica o apariencia trapezoide con aspecto sólido, tal y como los que se presentan en la biopelícula de la Figura 97; de 1 a 3  $\mu\text{m}$  con bordes redondeados, y que se posicionan sobre una capa base inicial de polímeros generada sobre la pirita.

La **Figura 100D** presenta un acercamiento a una zona parcialmente recubierta por la biopelícula. En esta, es posible detectar la configuración de las matrices y unidades de exopolímeros que cubren la superficie, observando dos diferentes clases de arreglo: la primera se trata de aquellos EPS con un grosor aproximado a 1  $\mu\text{m}$ ; la segunda, filamentos segregados desde la matriz de polímeros que se extienden inmediatamente sobre la superficie por 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  a partir de donde son generados. Estas estructuras del orden de nanómetros se observan con mayor detalle en las **Figuras 100 E y 100 F**, en donde se aprecia su contacto directo con la pirita y como es que parecieran interconectar ciertas zonas de la biopelícula al entrelazarse una con otra y formar puentes que comunican cada

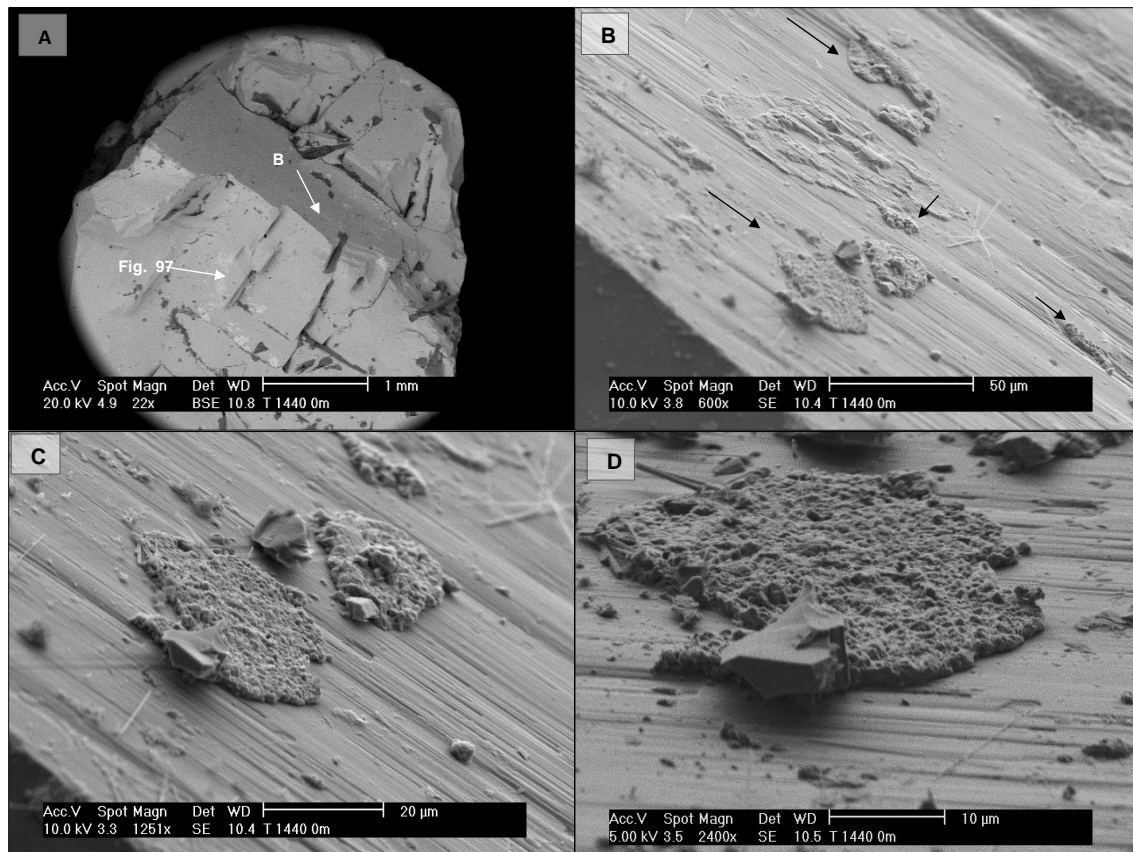
una de las matrices de polímeros; tanto a nivel de la superficie como sobre la misma matriz de polisacáridos.

El encontrar nuevamente los filamentos desplegados en la segunda biopelícula, reafirma que estos son producidos por los microorganismos. Adicionalmente, este tipo de estructuras se asemejan a aquellas señaladas por Williams, et al., (2015), quién las señala como evidencia de actividad biológica y como pueden encontrarse recubiertas por precipitados coloidales de oxi-hidróxidos de hierro, aspecto que coincide al observar su morfología en ciertos puntos de los polímeros encontrados, donde pareciera que ciertas esferas se agregan sobre su superficie. Una observación importante es el patrón que siguen cada una de las biopelículas al desplegarse sobre la superficie; su expansión se presenta con ciertas bifurcaciones y por consiguiente un patrón de espacios redondeados en donde no recubren la superficie mineral, tal y como se observa claramente en la biopelícula de la Figura 100. Aunado a lo anterior, las capas de polímeros presentan distintas morfologías en toda la biopelícula, observando túbulos y matrices de polímeros en forma de esferas o estructuras asimétricas con diferentes dimensiones; las cuales se unen entre ellas como se aprecia en las Figura 100C y 100E. Estas características permiten también que dentro de las mismas matrices de polímeros en los diferentes niveles que las componen se presente el mismo patrón de espacios vacíos y redondeados tal y como se observó en las biopelículas anteriores.

La **Figura 101** muestra un nuevo punto de desarrollo de biopelícula en el nivel 0 – 10 m, en el que, a diferencia de los anteriores, las estructuras microbianas se ubican sobre una zona con cierto grado de inclinación; lo cual permite divisar desde otra perspectiva su estructura. Su ubicación sobre la superficie de la muestra se señala en la **Figura 101A**, donde se presenta de manera general la morfología que mantiene. La **Figura 101 B** permite distinguir una superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) con temprano desarrollo de clivaje, donde se posicionan cinco pequeñas agrupaciones microbianas (flechas). Tres de estas biopelículas con forma alargada siguen algunas líneas de clivaje, los cuales se indica mediante flechas rojas. Gracias al relieve uniforme de la superficie, las características topográficas mostradas por las biopelículas, como su extensión y grosor se observa claramente en la **Figura 101C**.



Extendiéndose por cerca de 20  $\mu\text{m}$ , se presentan en un solo plano, formando una monocapa sobre la pirita, manteniendo un espesor aproximado a 2.8  $\mu\text{m}$  en sus bordes, lo que pudo conocerse al observarla lateralmente en la **Figura 101D**. En las mismas fotomicrografías, se encuentran dos fragmentos minerales de sílice junto a las dos biopelículas, cuya estructura y aspecto regular difiere totalmente de estos, contrastando y reafirmando las diferencias en cuanto a las partículas minerales, y sustentando el hallazgo de las diferentes biopelículas hasta ahora mencionadas.

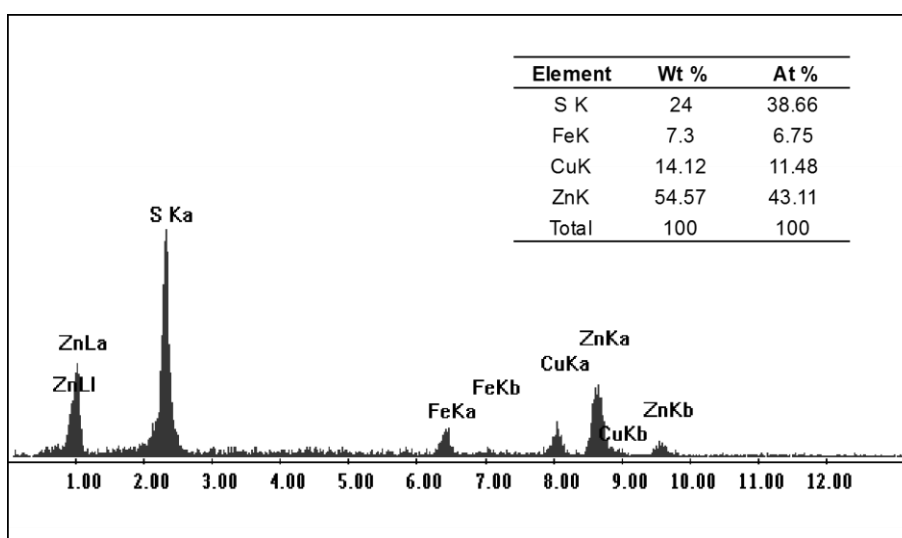


**Figura 100.** Desarrollo de Biopelícula sobre la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el terrero 1440 en el nivel 0 -10 m de profundidad. A) Vista general de la partícula de pirita y ubicación de las anteriores formaciones de biopelícula señaladas en la Figura 97. B) Biopelículas sobre la superficie en forma de monocapa que mantienen distintas extensiones y espesor. C) Características de la superficie de pirita a 1,251x donde confluyen dos formaciones de biopelícula en forma de monocapa D) Aspecto de la biopelícula a 2,400x donde se observa el conjunto de polímeros y las notables diferencias morfológicas con respecto a la superficie mineral y fragmentos minerales dispersos sobre esta. La biopelícula mantiene un espesor cercano a los 2.8  $\mu\text{m}$ .



Con base en las diferentes etapas de formación de biopelícula reportadas en la literatura, tanto para minerales (Jerez, 2009) como en otras superficies sólidas (Flemming et al., 2016), las biopelículas que se encontraron en este nivel de profundidad asemejan una etapa temprana en su desarrollo ya que estas se despliegan en forma similar a una monocapa con composición heterogénea de sustancias extracelulares poliméricas (en base a su morfología) y microorganismos con morfología bacilar embebidos en diferentes puntos de la matriz polimérica.

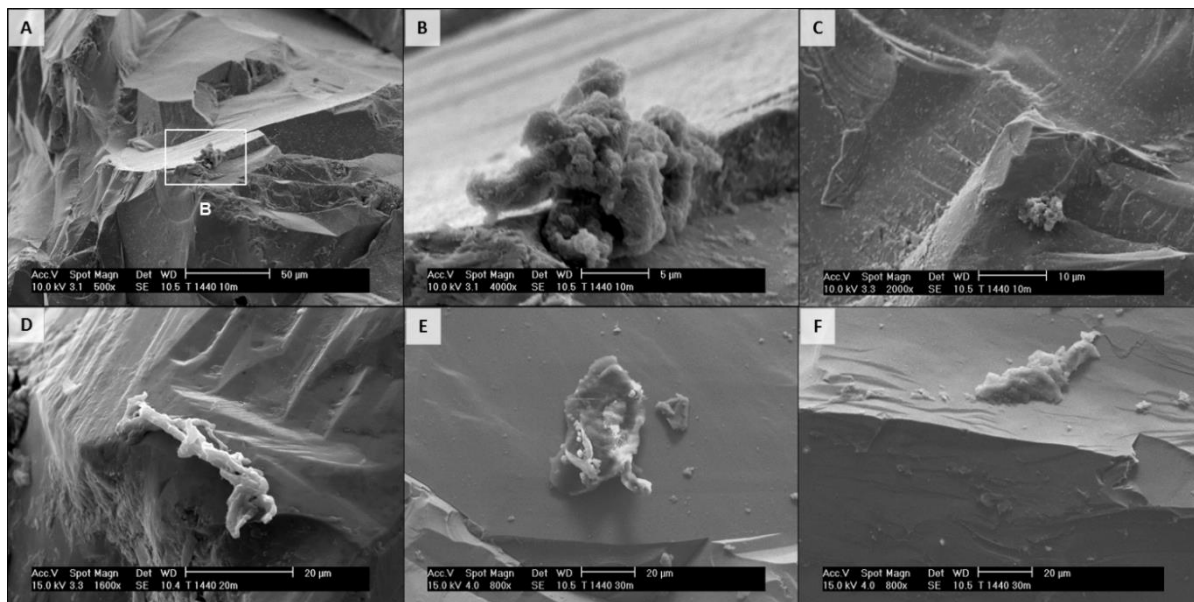
Las biopelículas se observaron aisladas una de otras, ocupando zonas de la superficie mineral de 10 a 40  $\mu\text{m}$  de extremo a extremo en las más pequeñas y hasta 100  $\mu\text{m}$  en su mayor despliegue. Aunado a lo anterior, durante la caracterización mineralógica de las muestras por MEB-EDS, en este nivel de profundidad se identificó la asociación de diferentes elementos a la estructura de la biopelícula que se observa en las Figuras 98, 99, 100 y 101. De acuerdo a Flemming et al., (2016), una de las características de las biopelículas es su capacidad para incorporar en su estructura diferentes elementos presentes en el medio, mencionando Cu, Zn, Fe y Ca para algunos microorganismos. En aquellos localizados en el nivel de 0-10 m del terrero 1440 se encontró que incorporaban Cu y Zn, y posiblemente hierro con base al análisis químico puntal realizado por EDS.



**Figura 101.** Espectro EDS de la superficie de biofilms ubicados sobre la superficie de pirita en el nivel 0-10 m de profundidad del terrero 1440.

Un espectro representativo de las características mencionadas se anexa en la Figura 102.

Posterior al nivel 0 a 10 m en este terrero, no fue posible encontrar el mismo grado de desarrollo de biopelícula en la superficie de Pirita. No obstante, tras examinar cada una de las muestras en busca de microorganismos fue posible identificar ciertas formaciones microbianas aisladas a mayor profundidad en el terrero, posicionándose sobre distintas zonas en partículas de esta fase mineral, y cuyas características pueden observarse a continuación en la **Figura 103**.



**Figura 102.** Biopelícula y polímeros de diferente configuración posicionados sobre partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) a distintas profundidades en el Terrero 1440.

En primera instancia, la **Figura 103A** presenta la fotomicrografía de una partícula de  $\text{FeS}_2$  con signos de alteración morfológica en el nivel 10 - 20 m de profundidad en el terrero. En este se siguió observando el desarrollo de diversas fracturas y líneas de clivaje características de dicha fase mineral, aun así, manteniendo áreas de la superficie con un relieve uniforme. En el centro de la fotomicrografía, justo en uno de los bordes de fractura, se ubica una matriz de exopolímeros de 15  $\mu\text{m}$  de longitud adherida a la superficie. A 4,000x (Figura 103B) se aprecia cómo es que se despliega por varios micrómetros hacia arriba de la superficie, entrando en contacto con la pirita sólo en la mitad de su estructura. Esta

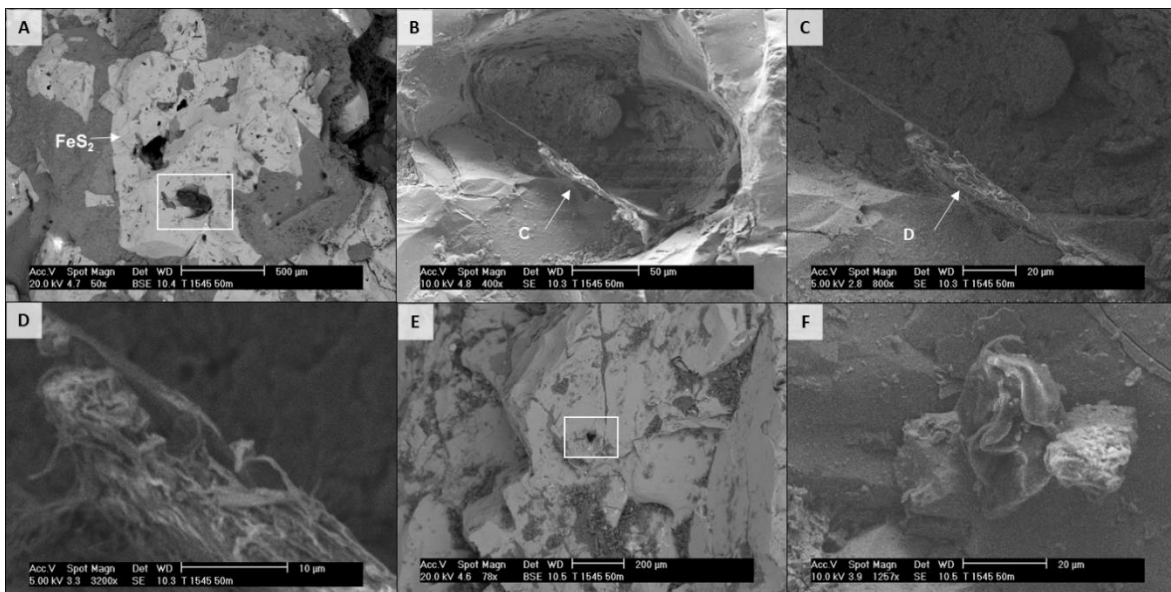
formación de polímeros presenta ramificaciones, las cuales presentan una forma alargada y curva, por lo que es posible mencionar una potencial presencia de bacilos embebidos en estos. A algunos micrómetros de distancia (**Figura 103C**), en una partícula diferente de FeS<sub>2</sub> se ubica una nueva estructura de exopolímeros. Esta, con similar morfología a la anterior, se encuentra adherida en una superficie con cierto grado de inclinación y ubicada sobre líneas de clivaje.

Al descender, en el nivel 20 – 30 m de profundidad se encontró la presencia de biopelícula con una configuración no observada anteriormente (**Figura 103D**). Sobre el borde de una partícula de FeS<sub>2</sub> con un avanzado desarrollo de clivaje, se despliega una estructura tubular compacta por cerca de 30 µm; en donde a la mitad de la estructura se aprecia una bifurcación que se expande y termina en un punto de acumulación de EPS en uno de sus extremos. El grosor que mantiene es de aproximadamente 2 µm en el centro, mientras que aquellos polímeros desplegados hacia la superficie disminuyen en grosor. Esta diferencia en dimensiones permitiría mencionar la posibilidad de que se encuentren microorganismos bacilares embebidos en el centro de la formación.

A los 30 metros de profundidad (30 – 40 m) fue posible apreciar un nuevo desarrollo de capas de polímeros sobre pirita. Con una apariencia sólida compacta a bajas magnificaciones, la estructura que se observa en la **Figura 103E** difiere en rasgos morfológicos a aquellos niveles superficiales, al presentarse como una capa de polímeros con bordes redondeados y una extensión de 20 µm, no totalmente adherida al mineral. Cercano a este punto, en la misma muestra se encontró un nuevo conjunto de sustancias extracelulares poliméricas de similares dimensiones (**Figura 103 F**). A diferencia de la anterior, a pesar de que se percibe como un sólido compacto en su conjunto, a mayores magnificaciones se aprecian estructuras alargadas posicionadas unas sobre otras, por lo que podría tratarse de microorganismos que han segregado EPS hacia sus alrededores.

## Terrero 1545 (T – 1545)

A diferencia de los otros dos terreros, la presencia de comunidades de microorganismos sobre partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ), se presentó solamente en uno de los niveles evaluados, siendo los últimos diez metros del terrero, a los 50 – 60 m de profundidad. Esto difiere a lo observado en los otros terreros, donde se encontró un mayor número de microorganismos y desarrollo de biopelícula en los primeros metros de profundidad, cercanos a la superficie del talud. Las fotomicrografías en la **Figura 104** señalan los hallazgos efectuados en el nivel 50 – 60 m, en donde se observaron diferencias en cuanto al desarrollo de biopelícula.



**Figura 103.** Biopelícula desarrollada en diferentes puntos de la superficie de partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en el Terrero 1545 a 50 m de profundidad. A) Partícula de pirita asociada a  $\text{SiO}_2$ , se señala la ubicación de estructuras microbianas sobre la superficie. B) Orificio en la superficie mineral en donde se desarrolla un biofilm. C y D) Estructura de los polímeros que conforman el biofilm. E) Ubicación de una nueva biopelícula sobre una superficie mineral. F) Aspecto del conjunto de polímeros, se aprecia dos texturas en ésta.

La primera fotomicrografía permite observar una de las dos muestras examinadas para este nivel; mediante BSE se observan partículas de  $\text{FeS}_2$  en una matriz de silicatos. Sobre la pirita se observan áreas con una tonalidad oscura, donde al visualizar la superficie mediante electrones secundarios se encuentra un orificio, señalado en la **Figura 104B**. Al acercarse gradualmente, a 400x se puede distinguir el desarrollo de una biopelícula, el cual recubre parcialmente las paredes y el fondo de dicha irregularidad en la pirita. De manera similar a las colonias microbianas anteriormente descritas, este parece mantener cierta asimetría, presentando bifurcaciones y orificios redondeados dentro de la matriz de polímeros que lo componen. No sólo se despliega en un solo plano, ya que en el centro se observa una formación esférica (flecha), se extiende por las paredes del orificio y en forma contraria a estas, desde su base crece una capa de polímeros indicada en la Figura 104C, la cual incluso conecta los dos extremos del orificio en donde se encuentra. La **Figura 104D** presenta una fotomicrografía a 3,200x de este último aspecto, en donde se logra apreciar su morfología, conformada por diferentes fibras de polímeros que se encuentran unidas y sobrepuestas entre sí, dando como resultado una formación de mayor solidez. En sus extremos se observa la naturaleza de los polímeros que lo conforman, en donde a diferencia de aquellos anteriormente descritos, estas no se expresan solamente de forma filiforme, ya que se observa su generación en forma de franjas y planos alargados.

En contraste, cerca de este punto se puede apreciar el desarrollo de una nueva estructura microbiana sobre una superficie regular de la pirita (**Figura 104E**). A una magnificación de 1250x se observa nuevamente una estructura de aspecto sólido compacto, la cual presenta dos texturas distintas. Con una textura un poco más uniforme en el centro, se observan capas de polímeros posicionadas sobre sí, desplegando hacia sus alrededores filamentos. Formando parte de la misma estructura, la mitad de la biopelícula encuentra un relieve menos uniforme, en forma similar a una esfera se aprecia una textura rugosa y lo que parecieran varios orificios o canales de comunicación en la matriz de EPS.

### 4.2.1.3 Columnas de biolixiviación

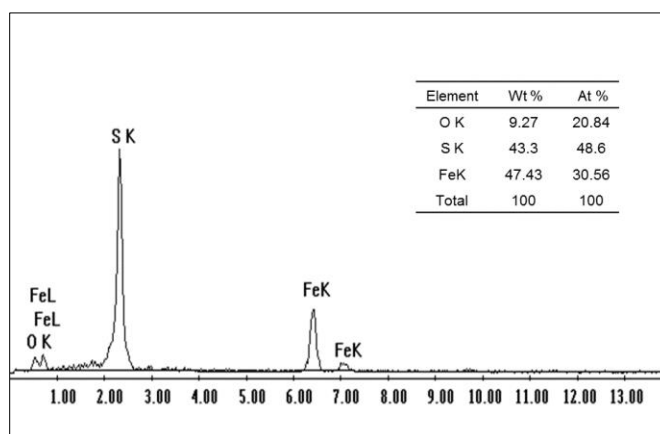
Posterior a la caracterización mineralógica y observación de microorganismos sobre pirita en las muestras de terreros, se procedió a examinar aquellas muestras correspondientes a las columnas de biolixiviación. Cabe recordar que estas se encontraron conformadas por el mismo material que componía el terrero de biolixiviación 1440. En este apartado se señalarán aquellas características que manifiestan las partículas en las que se encontraron microorganismos y biopelículas a través de los diferentes niveles evaluados.

La **Figura 104** presenta una de las partículas de pirita que conformaron parte del nivel final de la columna 1, en donde se identificó la confluencia de diferentes estructuras de origen microbiano a pocos micrómetros de distancia. En una primera fotomicrografía se indica la ubicación de la zona de interés dentro de la muestra (**Figura 104A**); a 1000x se puede apreciar la superficie de pirita relativamente regular, en donde se observan algunos rasgos de interés sobre la superficie (**Figura 104B**).

En un principio, al acercarse a la superficie a una magnificación de 2,700x (Figura 104C) se aprecia el desarrollo de biopelícula, cuya morfología es similar a aquellos encontrados en el terrero 1320 a 30 m de profundidad. Posicionados cerca al borde de una fractura, este conjunto de polímeros muestra un relieve irregular, manteniendo bordes redondeados y un grosor cercano a los 10  $\mu\text{m}$  en su mayor extensión. Adicionalmente, la imagen nos permite percatarnos de la presencia de una segunda formación de exopolímeros justo a un costado de esta estructura, la cual se presenta con mayor detalle en la Figura 104D. En esta fotomicrografía, podemos observar el despliegue de sustancias extracelulares poliméricas sobre una superficie de pirita alterada morfológicamente. Los polímeros parecen iniciar desde el borde de la fractura mineral, adoptando la forma de filamentos que se posicionan directamente sobre la superficie, siguiendo una línea recta y de forma paralela uno del otro por cerca de 25  $\mu\text{m}$ .

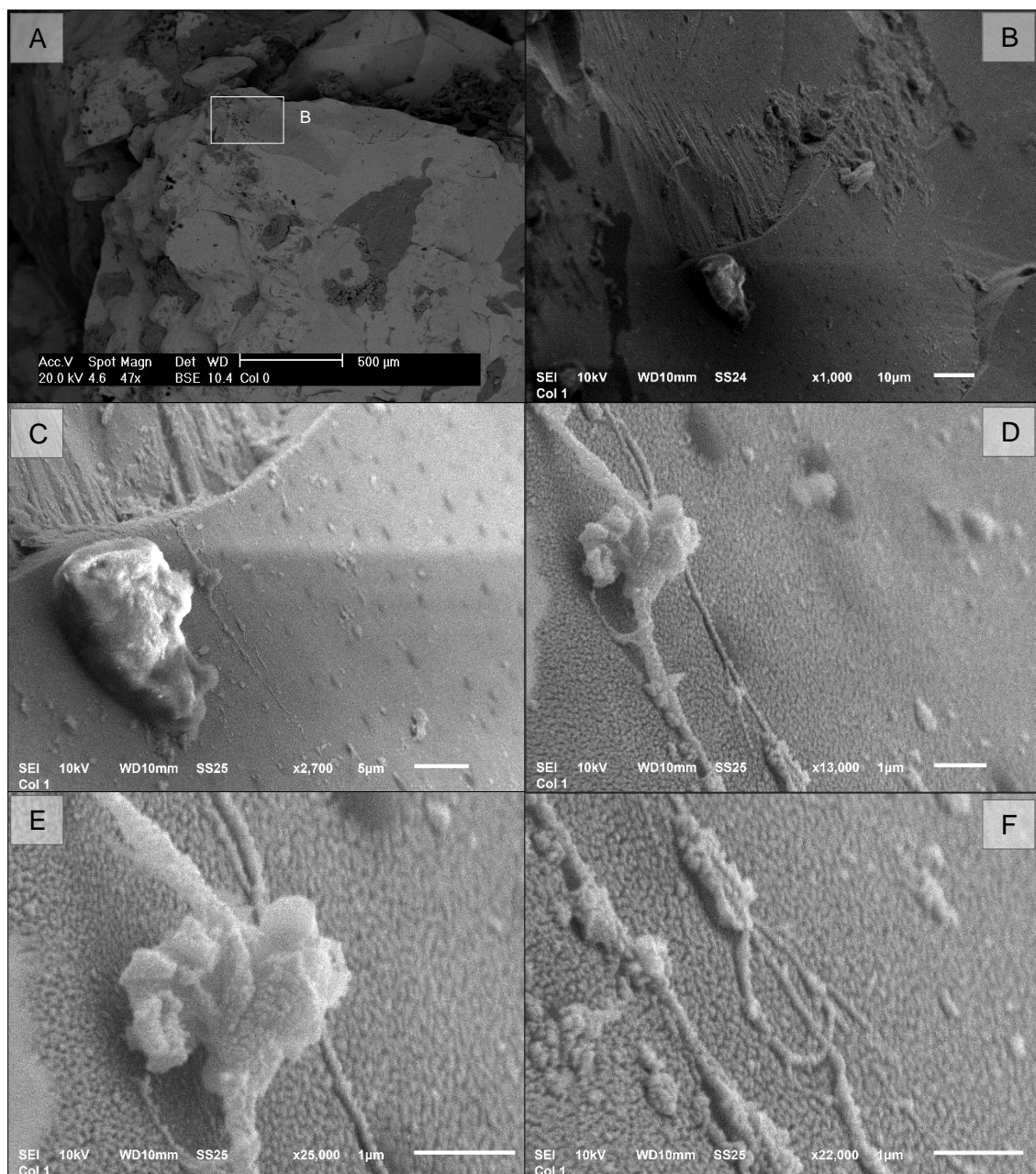
Con diferentes dimensiones, en la **Figura 104E** se aprecia cómo los polímeros con mayor espesor se acumulan en un punto del recorrido y forman una estructura de mayores proporciones para después seguir adheridos a la pirita. En esta fotomicrografía, así como en la **Figura 104F** se observa con mayor cercanía los polímeros; siendo posible detectar a 25,000x y 22,000x cómo estos expresan una textura similar a aquella registrada en la superficie mineral, ya que su superficie se encuentra parcialmente cubierta por el mismo tipo de partículas coloidales observadas en la superficie. En la última fotomicrografía (**Figura 104F**) se aprecia la ramificación de los polímeros a partir de un punto de acumulación, de donde tres filamentos de polímeros se despliegan, lo cual nos permite apreciar una nueva configuración que las sustancias extracelulares poliméricas pueden ir adoptando sobre la superficie mineral.

La pirita exhibe una textura diferente debido al proceso de oxidación por el que atraviesa; el cual se evidencia tras las fotomicrografías obtenidas a grandes magnificaciones en diferentes puntos de la superficie. Al realizar un análisis químico puntual por EDS en esta zona, se observa el cambio en su composición, observando como potenciales productos de alteración óxidos de hierro en su superficie. En la **Figura 103**, se reporta el espectro EDS y la composición obtenida.



**Figura 104.** Espectro EDS de la superficie de pirita que se observa en las fotomicrografías de la Figura 106.





**Figura 105.** Biopelícula y polímeros excretados sobre la superficie de pirita en el nivel final de la Columna 1. A y B) Ubicación general de los polímeros y biopelícula en la muestra. C) Biofilm maduro sobre pirita. D) Filamentos de polímeros adheridos a la superficie mineral. E) Formación de una nueva estructura por los filamentos de polímeros. F) Ramificación de polímeros, también se observa una textura similar sobre los polímeros a aquella en la superficie mineral.

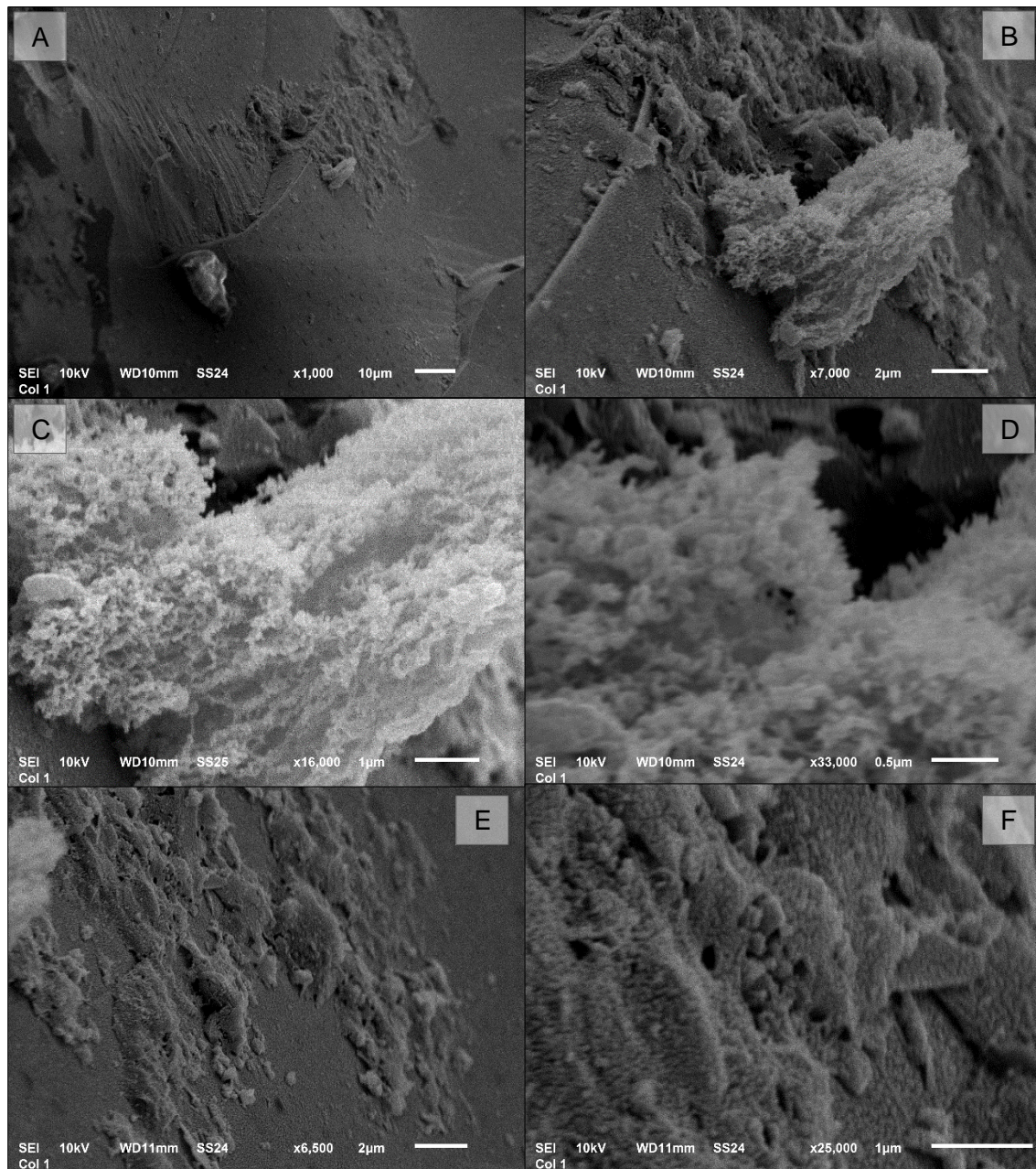
A pocos micrómetros de distancia de las anteriores formaciones de polímeros se encontró un nuevo desarrollo de biopelícula, el cual mantiene una morfología no observada con anterioridad en este trabajo (**Figura 107**). En la **Figura 107B** se señala la zona de interés, en donde las estructuras microbianas se ubican cerca o

incluso sobre una fractura de la pirita. A 7,000x magnificaciones es posible distinguir dos tipos de estructuras, una sobresaliendo de la superficie mineral y otra la cual parece recubrirla. La primera estructura se muestra a detalle en la **Figura 107 C y 107 D** en donde se observa una gran cantidad de sustancias extracelulares poliméricas excretadas. A 16,000x y 33,000x se observa su morfología, en donde pareciera que la biopelícula mantiene un cuerpo central consolidado y sobre su superficie se presenta el despliegue de pequeñas estructuras de polímeros redondeadas y en forma de filamentos. Además, es de particular interés percibir que en ciertas zonas de la biopelícula se manifiesta nuevamente ciertos orificios y bifurcaciones desarrolladas por las EPS tal y como en los anteriores.

Detrás de esta matriz de polímeros, en la **Figura 107E** se encuentran diferentes capas de polímeros posicionadas directamente sobre la superficie de pirita, las cuales pueden estar conformando parte de una biopelícula. Estas mantienen un espesor y morfología determinado en la zona abarcada por la fotomicrografía; que, con mayor detalle, a 25,000x en la Figura 107F, podemos observar la textura que mantienen en su superficie, la cual encuentra una gran similitud a aquella de la superficie mineral en la que se encuentran posicionados. Los polímeros o la biopelícula que se está desarrollando parecen estar recubiertos por diversas partículas sólidas, al igual que los filamentos de polímeros que se reportaron en la Figura 106. Esta situación coincide con las capacidades atribuidas a una matriz de polímeros, en la que procesos de mineralización pueden ocurrir; presentando la deposición de partículas minerales en la superficie de diferentes capas y filamentos de EPS posicionadas sobre la pirita como se observó en esta muestra (Tourney y Ngwenya, 2014). A pesar de encontrarse recubiertos, estos no dejan de exhibir las características morfológicas que los diferencian de una fase sólida mineral.

En la **Figura 107F** se enfoca ciertas capas de polímeros en las que encuentran canales de comunicación, también detectables en otros puntos de la biopelícula en la fotomicrografía anterior. Se observa con mayor detalle su textura; un relieve notable sobre una superficie mineral uniforme, característico de algunas formaciones de polímeros observadas; además, se aprecia su crecimiento en tres

dimensiones, como es que se adhieren a la superficie y una expansión localizada, manteniendo una asimetría en su conjunto al desplegarse en la pirita.



**Figura 106.** Diferentes formaciones de biofilm sobre la superficie de pirita (FeS<sub>2</sub>) en el nivel final de la columna 1. A) y B) Ubicación de dos tipos de biofilm sobre la superficie mineral. C) Biofilm y la presencia de diferentes estructuras de polímeros sobre su superficie. E) Capas de polímeros adheridas a una superficie mineral uniforme. F) Canales de comunicación y apreciación de la textura que mantienen a 25,000x.

#### 4.2.2 Adhesión y contacto de microorganismos sobre sulfuros de cobre

El proceso de biolixiviación tiene como finalidad liberar y recuperar la mayor cantidad de cobre contenido en los terreros a partir de la oxidación y disolución de los diferentes sulfuros primarios y secundarios de cobre que la integran, por lo que las acciones ejercidas o influenciadas por los microorganismos requiere estudiar como ocurre la adhesión, colonización y desarrollo de biopelícula a través de la superficie de estas fases minerales. El hallazgo y caracterización de las fases minerales de interés presentó una mayor complejidad debido al bajo contenido de cobre en los terreros (%Cu = 0.19), por lo que el detectar e identificar partículas de sulfuros de cobre requirió de una búsqueda exhaustiva a través de los diferentes niveles de profundidad, así como en las muestras correspondientes a columnas de biolixiviación.

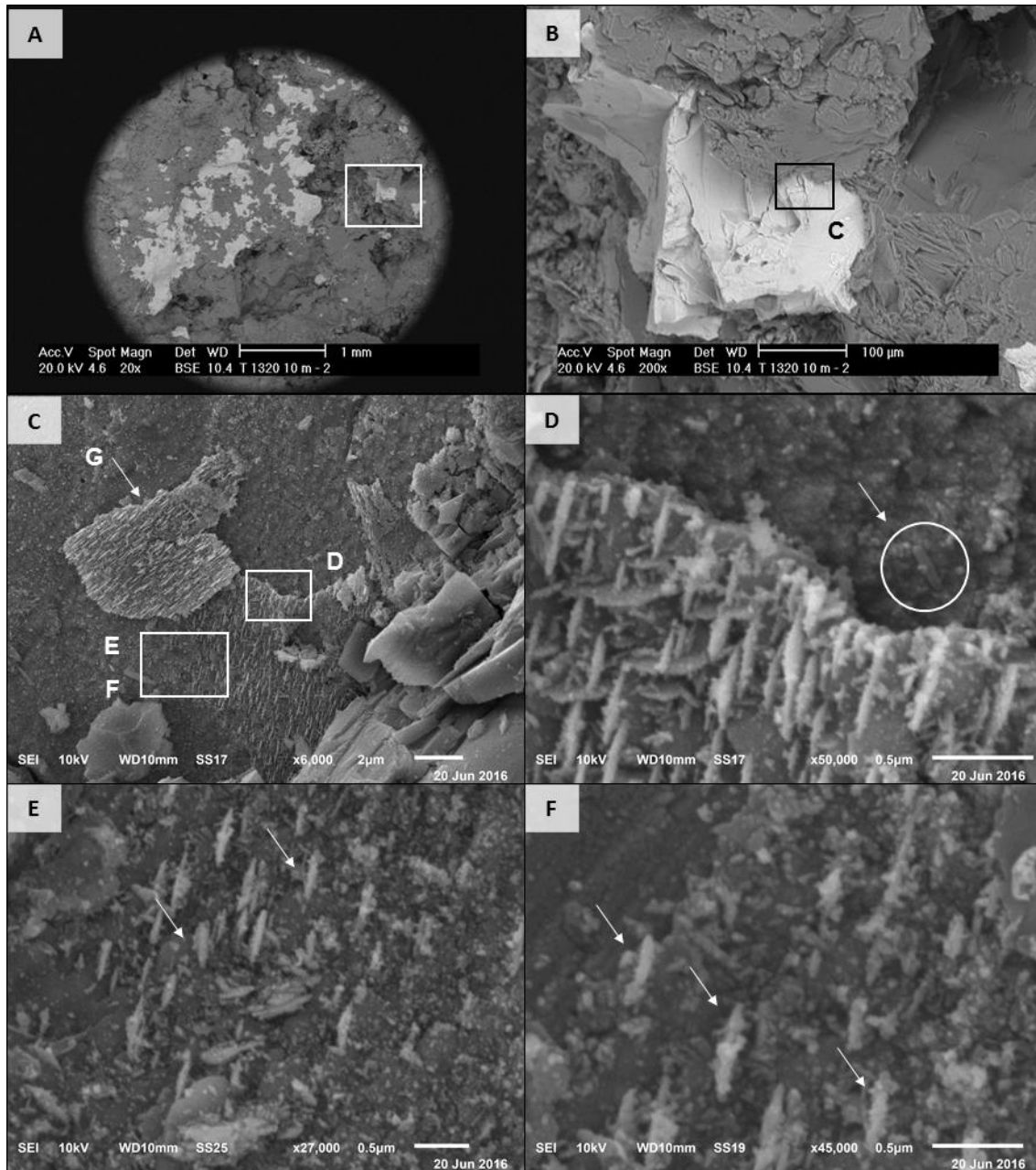
Los primeros microorganismos se encontraron en los niveles cercanos a la superficie del terrero 1320, tal y como sucedió para las partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) previamente descritas. En el nivel 10 – 20 m de profundidad se localizaron organismos bacilares posicionados sobre una partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) de 200  $\mu\text{m}$  de longitud, señalada en la **Figura 108**. En esta, los microorganismos se presentaron preferencialmente aislados uno de otro, separados por varios micrómetros de distancia en algunos casos y sobre zonas de la superficie mineral con distintas clases de textura. Su localización, así como las características morfológicas de la calcopirita se señalan en las fotomicrografías de las **Figuras 108A a 108C**, en donde se acerca gradualmente a los puntos de interés. Posicionados sobre dos zonas con distinto grado de alteración morfológica y mineralógica, en la **Figura 108D** se encuentra adherido un primer bacilo con una longitud por debajo a los 0.5  $\mu\text{m}$  (recuadro) en la superficie inmediata a una capa de oxidación contigua. Esta capa presenta la formación de laminillas orientadas en la misma dirección y posicionadas de forma paralela una a otra, y es donde se posicionan algunos otros microorganismos, los cuales mantienen la morfología y dimensiones similares al anterior (**Figura 108E y 108F**), diferenciándose de las estructuras minerales con forma laminar.

Por encima de estos a aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , se examina una nueva capa de oxidación (**Figura 109G**) que parece haberse desprendido de la superficie y que presenta una mayor alteración debido a formación de laminillas que cubren la totalidad del plano, posicionándose de forma perpendicular y paralela a la superficie. Inmersos entre el gran número de estructuras laminares que la conforman, la misma clase de microorganismos se posicionan sobre el centro o en los bordes de algunas de estas laminillas (señalados con círculos) (**Figura 109H**), siendo difícil detectarlos por las pequeñas dimensiones que presentan. La calcopirita con este tipo de textura también presentó un cambio en su composición con respecto a aquella con un menor grado de alteración tal y como se indica en el análisis por EDS (**Figura 109I**), presentando una disminución de 15.6% Wt en el contenido de azufre y un aumento de 8.38% Wt en cuanto al cobre respecto al contenido normal de calcopirita, además de presentar la incorporación de oxígeno tal y como se señala en la **Tabla 7**. De esta forma podemos observar que los microorganismos se ubicaron sobre dos zonas con distintas características texturales de la calcopirita, encontrando una relación de su presencia con aquellas que han sufrido cambios químico-mineralógicos, y por consiguiente morfológicos.

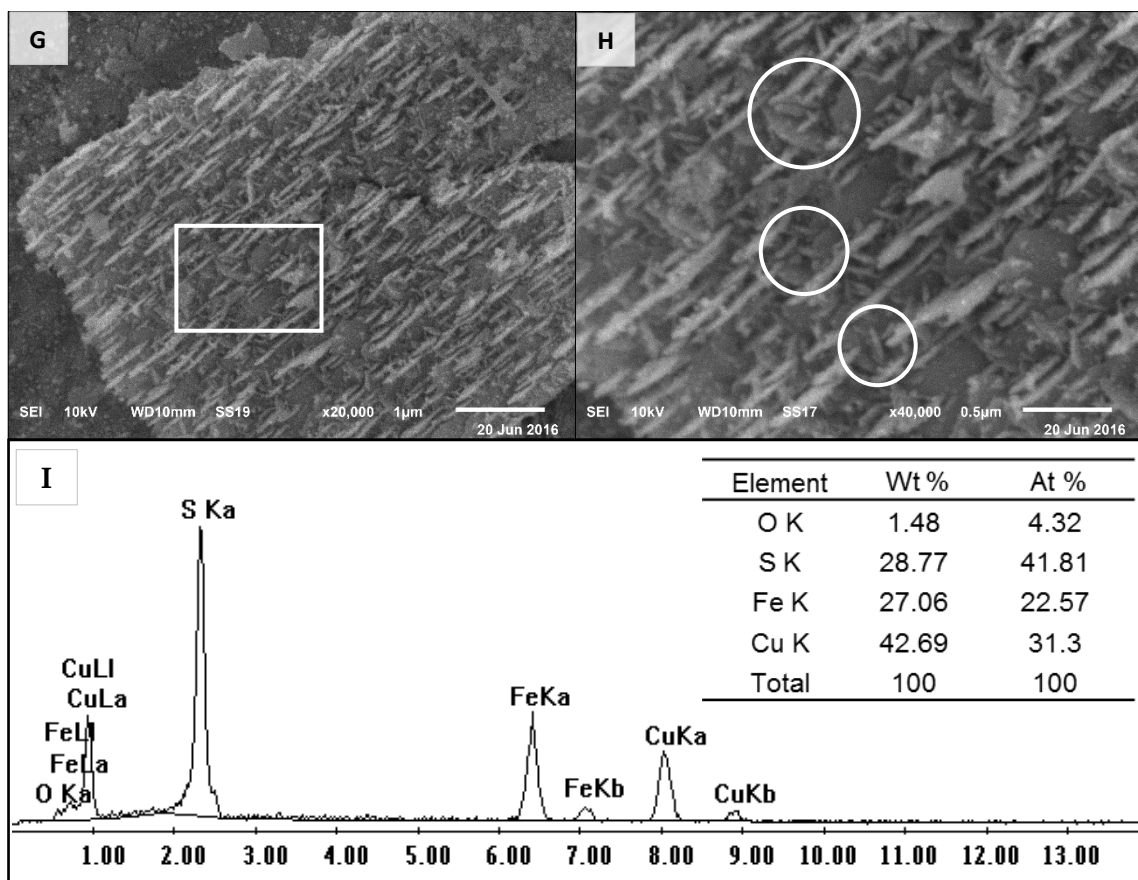
**Tabla 7.** Análisis químico puntual por EDS de dos superficies con diferentes grados de alteración morfológica señaladas en las Figuras 108 y 109.

Elemento	Punto 1	Punto 2
	At %	
O K	-	4.32
S K	49.54	41.81
Fe K	21.59	22.57
Cu K	28.88	31.3
Total	100	100





**Figura 107.** Ubicación de microorganismos sobre partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20m del terrero 1320. A y B) Ubicación de la partícula de interés en la muestra y zona donde se localizan los microorganismos. C) Zona de interés debido a la presencia de microorganismos en diferentes puntos, se aprecia la formación de capas de alteración. D) Primer organismo bacilar adherido a la superficie, se observan diferencias texturales de dos zonas de la superficie. E y F) Presencia de otros organismos bacilares dentro de la muestra (señalados por flechas).



**Figura 108.** Ubicación de microorganismos sobre partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20m del terrero 1320 (Continuación). G) Capa de oxidación aparentemente desprendida de la superficie de calcopirita, se observa una amplia formación de laminillas confiriéndole una textura característica. H) Ubicación de diferentes microorganismos bacilares sobre y los bordes de laminillas desarrolladas en la superficie. I) Espectro EDS y análisis químico puntual correspondiente a la zona de oxidación donde se forman láminas sobre la superficie.

Además de estos organismos, en la misma muestra se observaron otros notables aspectos en cuanto a la interacción, contacto y adhesión de microorganismos sobre otras partículas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) los cuales se encontraron relacionados con el proceso de oxidación y formación de productos secundarios sobre su superficie. Es importante señalar que la calcopirita cuenta con una determinada morfología y composición, la cual fue variable en distintos puntos de la muestra debido a la formación de estos productos y al proceso de oxidación que experimenta.



La **Figura 110** presenta algunas de las partículas analizadas, comparando aquellas que no presentan cambios químico mineralógicos con respecto a las que si lo exhiben. La primera fotomicrografía (**Figura 110A**) corresponde a calcopirita sin alterar en el centro de la muestra, tal y como se comprueba por su textura y mediante el análisis químico puntual por EDS señalado en el recuadro número Desplazándose hacia la izquierda de la muestra, en la fotomicrografía **110B** se observan 10 partículas de diferentes dimensiones asociadas a la matriz de silicatos, sobre las que se presenta la formación de productos minerales secundarios. Estos se encuentran formando capas que recubren parcialmente la superficie de calcopirita, sufriendo fracturas que dan paso a la formación de fragmentos asimétricos que se están desprendiendo de la superficie en ciertas zonas, como se señala en las **Figuras 110C y 110D**.

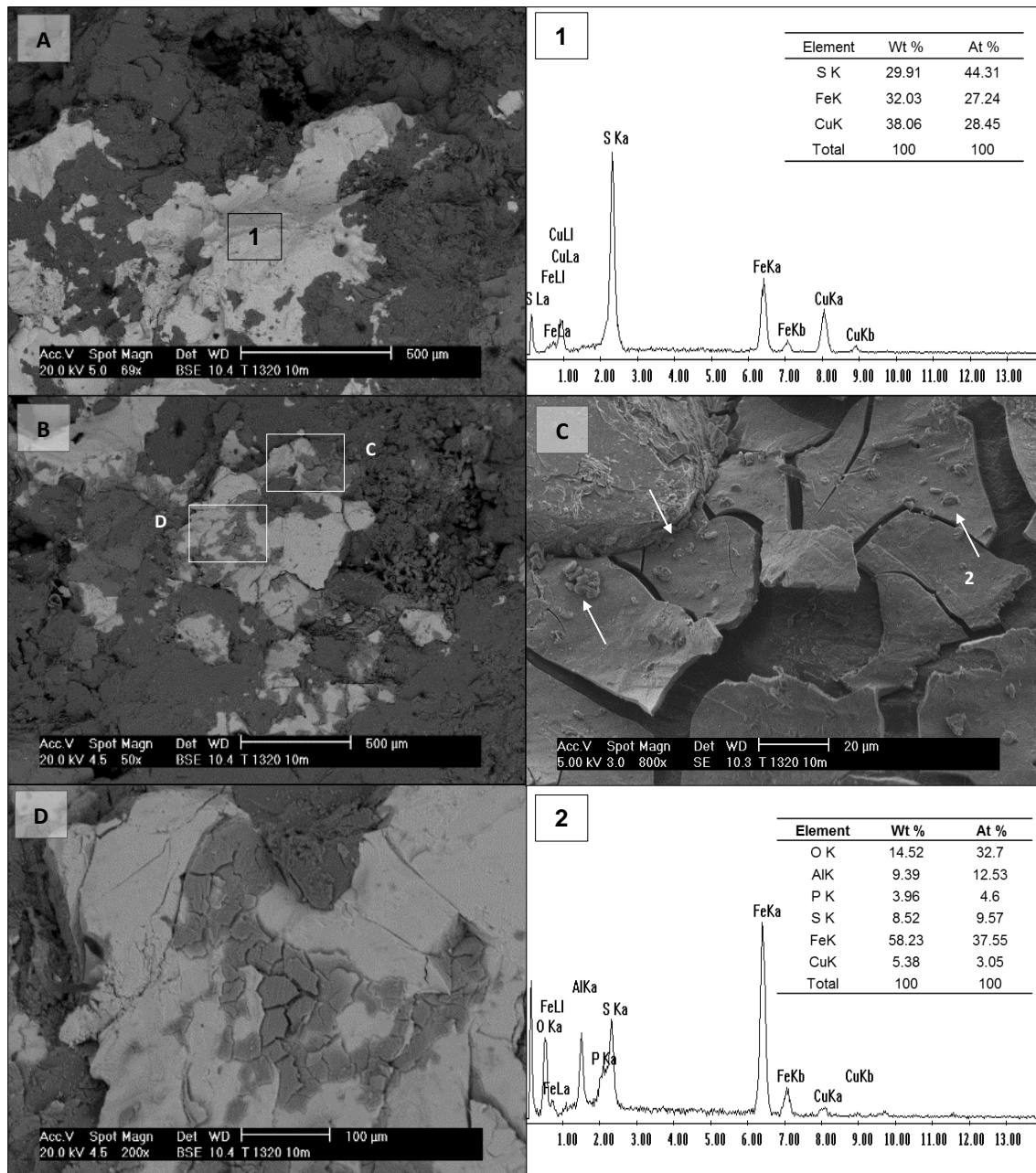
De composición variable a través de estas y otras partículas en la muestra, las capas de alteración se componen principalmente de hierro (Fe), azufre (S), cobre (Cu), aluminio (Al), oxígeno (O), y en ocasiones fósforo (P) y silicio (Si) en un bajo porcentaje. La **Tabla 8** señala el rango, mediana, media y desviación estándar de los elementos detectados por EDS en base a los análisis químicos puntuales efectuados en costras o capas de alteración formadas sobre partículas de calcopirita en este nivel. En cuanto a las diferentes etapas en la formación y desarrollo de las capas de alteración sobre la superficie de calcopirita, se encontraron variables y amplios rangos de composición de algunos elementos; de forma general, en la mayoría de las partículas se presenta un enriquecimiento en hierro ( $29.35 \pm 7.67$  %Wt) y oxígeno ( $33.81 \pm 10.87$ %Wt), mientras que la presencia de cobre y azufre disminuyó notablemente con respecto a la composición de la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ). El cobre se encontró en un rango de 1.46% a 20.16%Wt en las capas de alteración, con una mediana 3.11%Wt y composición promedio de 7.54%Wt, este se encontró principalmente en bajos porcentajes, e incluso ausente en dos ocasiones. Para el caso del azufre también se apreció una disminución, con una media de 17.65%, mediana de 11.76% y un rango de 8.86 a 40.17%Wt, mientras que los otros elementos detectados como Al, P y Si mostraron una menor desviación estándar con una media de 9.18%Wt, 4.32%Wt y 2.09%Wt, respectivamente.

Dichos porcentajes indicarían la formación de precipitados relacionados al grupo de la alunita ( $AB_3(XO_4)_2(OH)_6$ ), donde A representa cationes como:  $Na^+$ , U, K,  $Ag^+$ ,  $NH_4$ ,  $Pb^{2+}$ , Ca, Ba y Sr mientras que el sitio B está ocupado por cationes tales como Al, Fe, Cu y Zn.  $XO_4$  en el que P o S, o incluso As forman los siguientes aniones  $PO_4$ ,  $SO_4$  y  $AsO_4$ , que también podrían ser reemplazados por  $CO_3^{2-}$ ,  $SbO_4^{3-}$ ,  $CrO_4^{2-}$  y por  $SiO_4^{2-}$  (Dill, 2001;Córdoba et al., 2008).

La posible composición para este grupo de minerales corresponde con los diferentes elementos encontrados en los productos desarrollados sobre la superficie de calcopirita, por lo que de esta forma se podría mencionar la formación de jarositas, así como hidroxisulfatos e hidroxifosfatos férricos, además de aluminio fosfatos. De forma puntual y para ejemplificar lo anterior, en el caso de la capa de oxidación en la **Figura 110C** se presenta un enriquecimiento en hierro (37.55%Wt) con respecto al contenido exhibido por la calcopirita ( $CuFeS_2$ ), mientras que el cobre y azufre disminuyen hasta un 3.05% y 9.57% respectivamente, tal y como se señala en el espectro número 2 de la figura en cuestión.

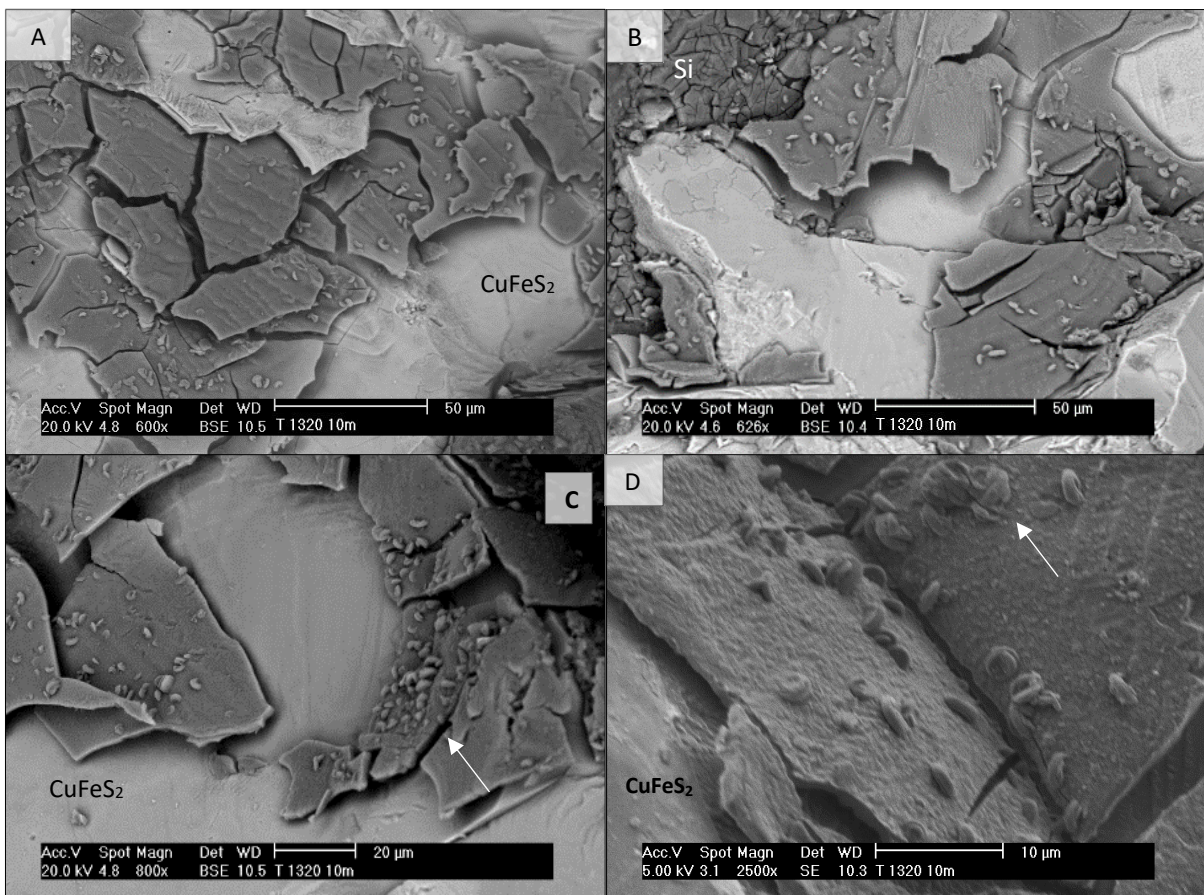
**Tabla 8.** Elementos detectados en capas de oxidación o alteración sobre la superficie de diferentes partículas de calcopirita (% Wt).

Elemento	Rango	Mediana	Media $\pm$ DE	n
<b>S</b>	8.86 - 40.17	11.76	17.65 $\pm$ 11.05	10
<b>Fe</b>	19.91 - 41.88	26.99	29.35 $\pm$ 7.67	10
<b>Cu</b>	1.46 - 20.61	3.13	7.54 $\pm$ 7.09	8
<b>O</b>	13.88 - 48.48	32.70	33.81 $\pm$ 10.87	10
<b>Al</b>	2.77 - 12.60	9.57	9.18 $\pm$ 3.41	10
<b>P</b>	3.20 - 5.51	4.33	4.32 $\pm$ 0.71	6
<b>Si</b>	1.83 - 2.45	1.98	2.09 $\pm$ 0.26	3



**Figura 109.** Aspecto y composición de partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) con diferente grado de alteración en el nivel 10 – 20 m del terrero 1320. A) Calcopirita sin alterar, mostrando una composición y textura característica de esta fase mineral, el espectro EDS correspondiente se señala con el número 1). B) Distintas partículas de calcopirita asociadas a la matriz de silicatos; en estas se presenta la formación de productos minerales secundarios sobre su superficie. C) Capas de oxidación desprendiéndose de la superficie, sobre estas se observa la presencia de organismos microbianos. D) Centro de la partícula con mayores dimensiones de la fotomicrografía C), se observa la ubicación y desarrollo de capas de oxidación sobre esta. 2) Espectro EDS de la composición de los productos secundarios en forma de capas señalados en las anteriores dos fotomicrografías.

La formación de productos secundarios sobre la calcopirita puede ejercer un efecto pasivante sobre esta, siendo de gran importancia señalar que es sobre este tipo de superficie donde se encontraron diversos organismos microbianos. En la figura anterior no se observan claramente, pero algunos indicios se perciben en la fotomicrografía **110 C** (flechas) con diferentes estructuras bacilares, mismas que se observaron en otras partículas de calcopirita, como los siguientes cuatro puntos de interés en la **Figura 111**.



**Figura 110.** Capas de oxidación colonizadas por microorganismos en cuatro partículas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 10 – 20 m del terrero 1320. A) Formación de capas de oxidación en el centro de calcopirita, se observa su desprendimiento y la presencia de 75 microorganismos distribuidos sobre estas; no todos los fragmentos presentan el contacto de microorganismos; B) C) Fragmentos de la capa de oxidación en donde se posicionan un total de 95 microorganismos, conjuntándose preferentemente cerca de los bordes o fracturas de las capas de oxidación en la derecha de la fotomicrografía. D) Cerca de 40 microorganismos se posicionan sobre fragmentos paralelos y perpendiculares a la superficie, a 2500x se aprecia la asociación de los microorganismos en unidades conformados entre 2 a 7 organismos. En las 4 fotomicrografías se observa que los microorganismos no se encuentran adheridos a la superficie de calcopirita.

Las fotomicrografías de la **Figura 111** nos permiten diferenciar entre distintas capas de alteración u oxidación desarrolladas sobre calcopirita en las que se observan diversas formas bacilares que sobresalen en su superficie, y que aparentemente se distribuyen sólo en estos productos secundarios, ya que sobre la calcopirita contigua o por debajo de los fragmentos identificados como capas de oxidación no se presentan las mismas formas bacilares, además de no atravesar el mismo grado de alteración químico mineralógico. Una cobertura parcial ocurre en los cuatro puntos señalados, así como una tendencia a posicionarse sobre o cerca de las líneas de fractura y bordes de los fragmentos minerales. En la fotomicrografía **111A**, cerca de 75 microorganismos se encuentran en contacto con los diferentes fragmentos que se desprenden de la superficie de calcopirita, mientras que para las capas de oxidación de la **Figura 111B** disminuyen a 40 elementos. La **Figura 111C** es donde se encuentra un mayor número de microorganismos, al observar un total de 94 en la zona que abarca la fotomicrografía, observando el agrupamiento de un gran número de células microbianas preferentemente a la derecha de la imagen en una misma zona (flecha). Por último, a mayores magnificaciones (2500x) la **Figura 111D** señala cerca de 40 microorganismos posicionados sobre dos capas de oxidación, una de ellas posicionada de forma perpendicular con respecto a la otra, por lo que los microorganismos deben de encontrarse adheridos de alguna forma a la superficie al no haberse desprendido de ella. Además, en el centro podemos observar como los microorganismos se alinean uno tras otro en línea recta y como es que parecen desarrollar una mayor estructura al encontrarse unidos entre sí en el margen superior de la fotomicrografía (flecha).

Al examinar mediante electrones secundarios cada una de estas superficies es cuando se confirmó la presencia de microorganismos, permitiendo identificar sus características morfológicas, así como la forma en que interactúan entre sí y con la calcopirita. De esta forma, las siguientes figuras presentan con mayor detalle a los diferentes organismos posicionados sobre calcopirita, incorporando algunas zonas de interés señaladas previamente en la **Figura 111** así como otros puntos dentro de la muestra. La partícula en la **Figura 111B** se observa con detenimiento en la **Figura 112**, donde se indica su ubicación dentro de la muestra (**Figura 112A**) para

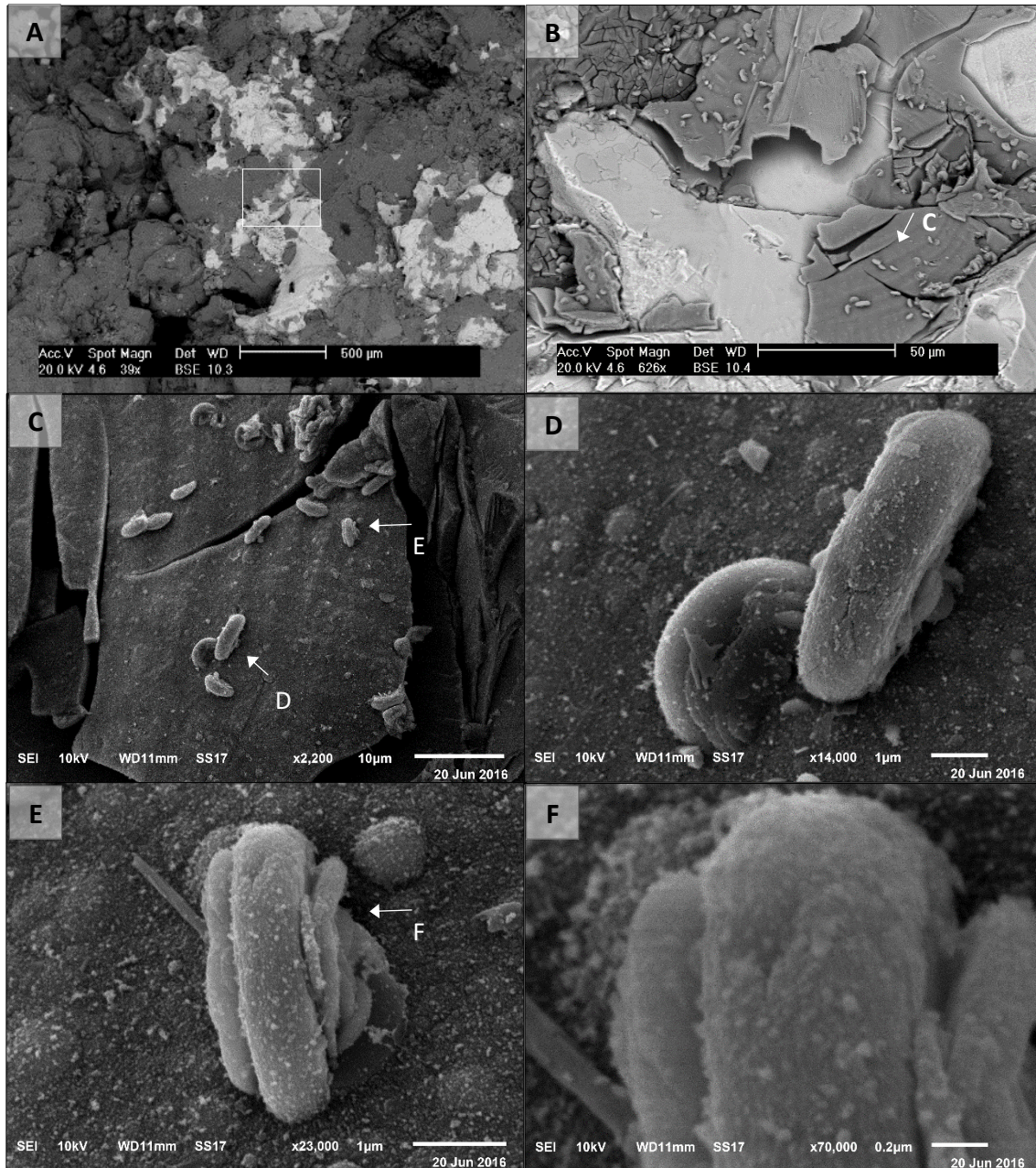
después acercarse gradualmente a la zona de interés, en donde cerca de 15 microorganismos de morfología bacilar se distribuyen sobre una capa de oxidación posicionada inmediatamente sobre la superficie de calcopirita (**Figura 112C**). Los bacilos presentan una longitud de 1 a 3  $\mu\text{m}$  y tienden a posicionarse cerca o sobre las bordes de las fracturas que se desarrollan, encontrándose principalmente aislados uno de otros.

A diferencia de los microorganismos anteriormente observados, estos se posicionan de diferentes formas sobre la capa de oxidación, al hacer contacto con la superficie en los extremos como en el centro de su estructura, desarrollando en ocasiones una curvatura o incluso una forma más redondeada. Es en la **Figura 112D** donde a una magnificación de 14,000x se aprecia con detalle las características de dos bacilos en contacto directo con la superficie mineral. Es posible observar su superficie, la cual mantiene un relieve regular, y como es que sobre la pared celular de los microorganismos sobresalen partículas muy finas (del orden de nanómetros) adheridas sobre estos, presumiblemente de polímeros segregados por los mismos bacilos; a la izquierda de la fotomicrografía un segundo bacilo forma una curvatura al encontrarse adherido a la capa de oxidación, en donde el espacio cóncavo formado entre la célula y la superficie se encuentra ocupado por lo que podría señalarse como sustancias extracelulares poliméricas (EPS) que unen al bacilo a la superficie.

En la **Figura 112E** un tercer microorganismo se encuentra adherido cerca al borde de la capa de oxidación, en el que, a una magnificación de 23,000x se observan nuevas características como la generación de filamentos o fibras de polímeros, que se posicionan tanto en forma paralela como perpendicular a sus costados, sobreponiéndose uno sobre otro desde la superficie y que mantienen un espesor entre 0.1  $\mu\text{m}$  a 0.2  $\mu\text{m}$  aproximadamente. Esta característica, se asocia con el bacilo de la figura anterior, en donde se aprecia el inicio de la producción de este tipo de polímeros en su costado cerca de la superficie. Al acercarse aún más a este último bacilo (70,000x) se continúa observando la presencia de partículas sobre la pared celular, así como en las fibras de polímeros a sus costados, presentando una



textura similar a aquellos polímeros posicionados sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en la Figura 98), donde partículas minerales se encontraban depositadas o recubriéndolas parcialmente.

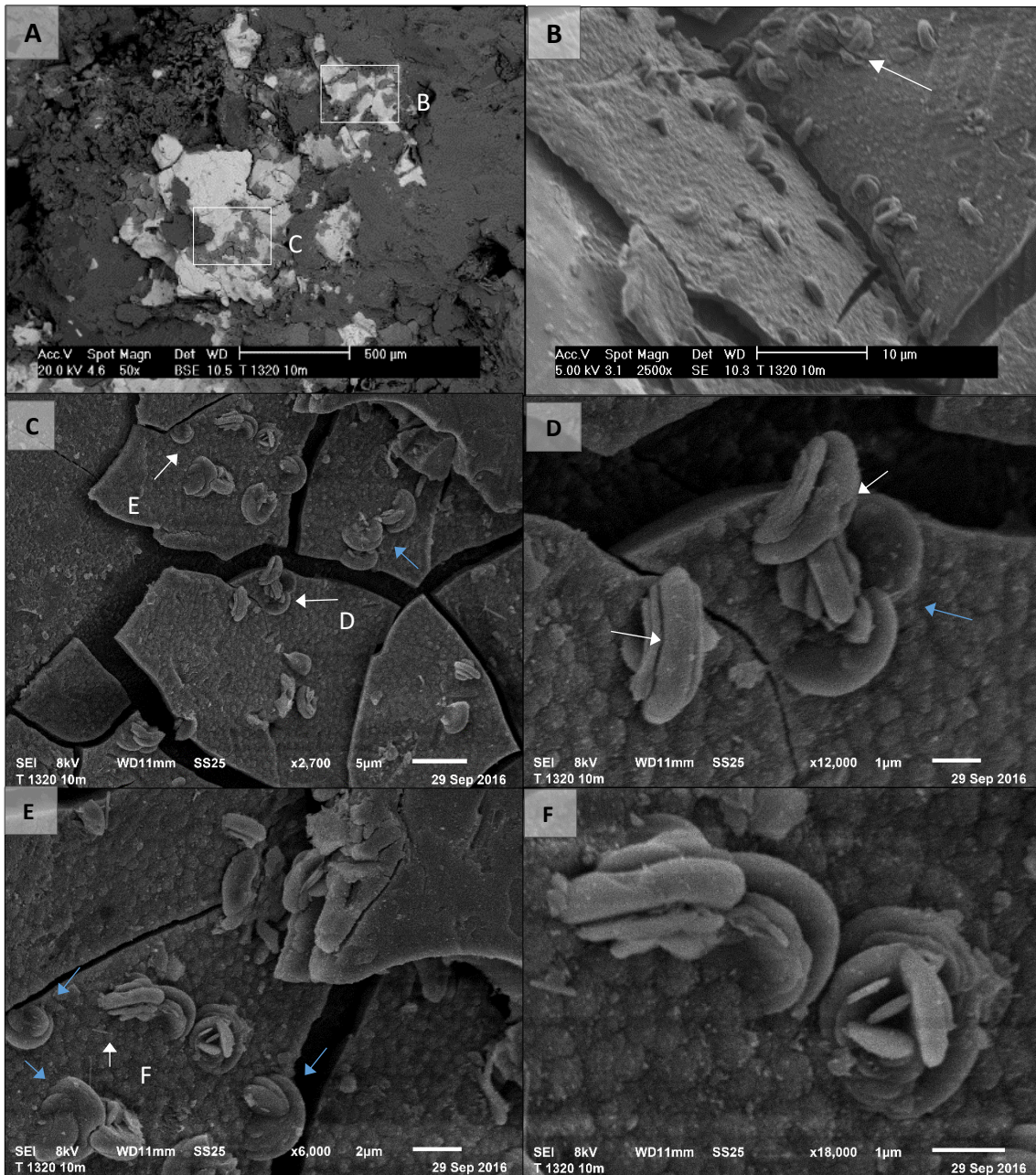


**Figura 111.** Distribución y adhesión de diferentes bacilos sobre una capa de oxidación desarrolla sobre calcopirita. A y B) Localización de capas de alteración en la calcopirita y la presencia de microorganismos. C) Distribución de los microorganismos sobre la superficie. D) Dos bacilos de diferente dimensión adheridos a la superficie por medio de EPS. E) Bacilo cercano al borde de la capa de oxidación en el que se observa el desarrollo de filamentos de polímeros a sus costados. F) Superficie del bacilo y fibras de polímeros en donde se observa el posicionamiento de posibles partículas minerales.



A pesar de que no es posible determinar la naturaleza de estas partículas mediante EDS, en base a la manera en que se presentan sobre los microorganismos, estas coinciden con lo descrito por Jones y Renaut (2007) así como por Williams et al., (2015), quienes señalan la posibilidad para que diferentes partículas nanométricas de óxido de hierro se depositen sobre la membrana celular externa de microorganismos con capacidades ferro oxidantes.

La misma clase de bacterias se encontraron colonizando otros puntos de la muestra, formando nuevas agrupaciones que se señalan en la **Figura 113**, donde se encuentran en contacto con una capa de oxidación dividida en fragmentos asimétricos que se desprenden de la superficie. Formando agrupaciones de entre 2 a 7 elementos, los bacilos se ubican preferentemente hacia los bordes y fracturas de la capa de oxidación tal y como se observa en la Figura 113C. A 12,000x en la Figura 113D se encuentra la agrupación de cuatro organismos microbianos uno cerca del otro mientras se adhieren a la superficie cerca al borde de la capa de oxidación. Uno de estos hace contacto con el costado de la capa de productos secundarios que se han formado, y que cuenta con un espesor aproximado a 2  $\mu\text{m}$  con base en las dimensiones de estas bacterias. Al observar con detenimiento cada uno de estos bacilos, en dos de ellos se distingue el desarrollo de una partición en su centro (señalada con flecha), identificando así la separación de dos bacilos de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$  de longitud. Esta bipartición evidencia el proceso de **fisión binaria** que estaría atravesando la bacteria, proceso por el cual los organismos procariontes se dividen y multiplican (Ehrlich, 2015), comprobando que las estructuras bacilares hasta ahora observadas son organismos bacterianos, entre los cuales algunos se encontraban metabólicamente activos al replicarse, explicando así las grandes dimensiones que presentan. También, es posible que ciertos organismos de grandes dimensiones sean microorganismos termófilos previamente reportados en los terreros, o incluso ser efecto del sustrato de crecimiento, ya que dependiendo de las condiciones para su desarrollo los microorganismos de una misma familia pueden presentar diferencias en su tamaño o incluso en la cantidad y producción de EPS, tal y como lo han señalado Sand y Gehrke (2006).

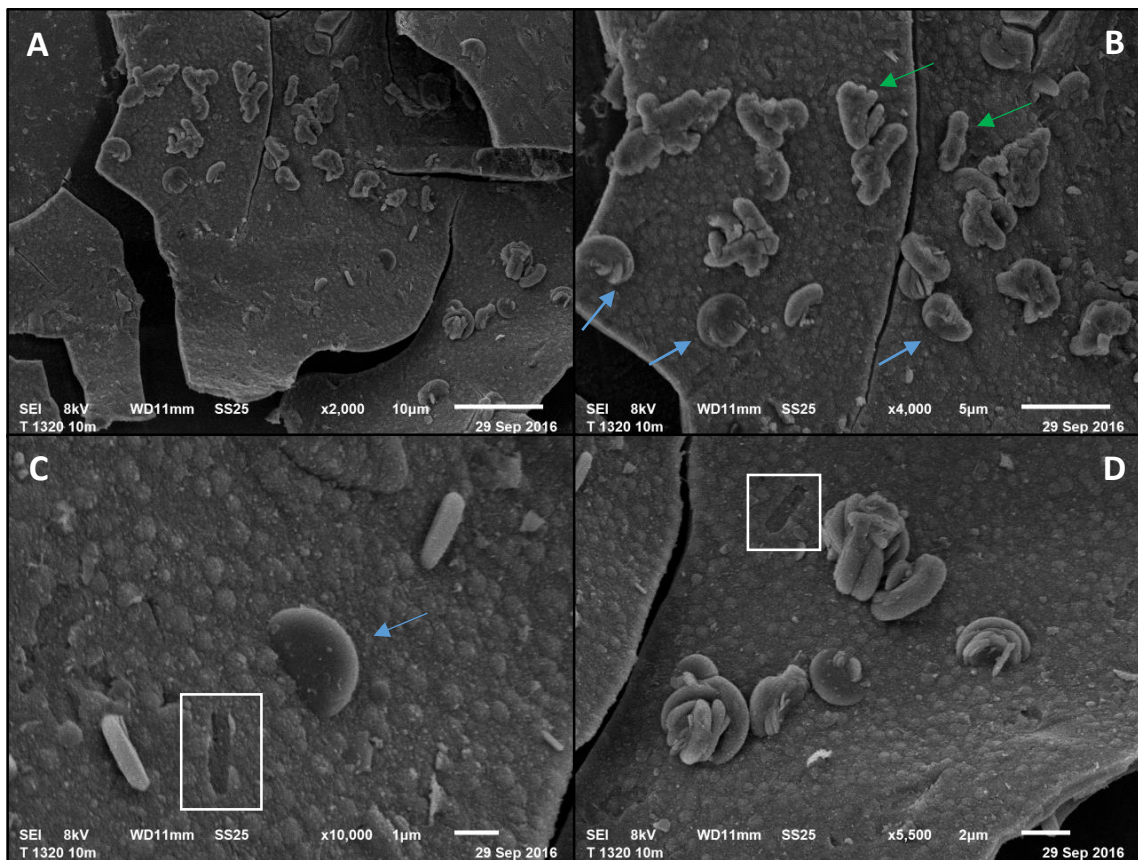


**Figura 112.** Características de los microorganismos adheridos en diferentes fragmentos de la capa de oxidación desarrollada sobre calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ). A) Ubicación de las partículas de interés dentro de la muestra, los recuadros blancos denotan las zonas de interés. B) Referencia de la ubicación de una de las partículas descritas en la figura 111. C) Ubicación de microorganismos sobre diferentes fragmentos de la capa de oxidación. Se observa los diferentes tipos de agrupaciones y morfologías de estos. D) Agrupación de bacilos cercana al borde de un fragmento de la capa de oxidación, se denota los puntos en lo que se observa su replicación (fisión binaria). E) Diferencias entre agrupaciones sobre la superficie, se observa la adhesión de los microorganismos por medio de sustancias extracelulares poliméricas a la superficie y su recubrimiento por estas mismas. F) Agrupación de distintos bacilos en la superficie.

Las siguientes fotomicrografías (**Figura 113E** y **113F**) presentan la colonización y asociación entre los microorganismos en un segundo punto de la zona, encontrándolos alineados uno junto a otro a través de la superficie, asociados por EPS y un mayor número de bacilos adheridos a la superficie mineral por medio de dicha matriz de polímeros. Lo anterior se evidencia debido a la particular morfología que despliegan, ya que los microorganismos mantienen estructuras en forma de media luna o semiesfera que sobresalen de la superficie, difiriendo incluso en dimensiones cuando los microorganismos se posicionan sobre la superficie sin generar polímeros o asociarse unos con otros. Las diferentes configuraciones serían atribuidas a la generación y despliegue de sustancias extracelulares por parte de los microorganismos al recubrirse en esta matriz, permitiéndoles adherirse a la superficie y recubrir la zona donde entran en contacto con las fases minerales. Los organismos que presentan esta formación se señalan en la figura mediante flechas azules, así como para los microorganismos que presentan las mismas características en las figuras anteriores **113D** y **113C**.

En la **Figura 114** se presentan diferentes asociaciones y tipos de microorganismos sobre la misma superficie que se ha estado examinando. El mismo comportamiento en cuanto a la distribución y colonización en la superficie sigue ocurriendo, no obstante, la agrupación de los organismos y su morfología en la **Figura 114B** difiere a las anteriores ya que en cada célula microbiana se distingue la producción de sustancias extracelulares poliméricas sobre su superficie o hacia la superficie mineral, manteniendo una textura rugosa y distinta a aquella presentada por anteriores especímenes. El diferente recubrimiento de los bacilos y producción de EPS se observa en la **Figura 114B**; al permitir la formación de estructuras redondeadas (flecha azul), presentándose sobre la pared celular de la bacteria (flecha verde), expandiéndose para unir dos o más microorganismos dando paso a estructuras de mayores dimensiones, o presentando una conexión de los bacilos con la superficie, tal como se observa en esta fotomicrografía y en la parte central de la siguiente **Figura 114C** (flecha azul).

Además, en esta última figura se encontró la inclusión de una nueva clase de microorganismos en la superficie, a pocos micrómetros de distancia de los anteriores. Estos bacilos exhiben dimensiones distintas, presentan una longitud de  $2\ \mu\text{m}$  y cerca de  $0.5\ \mu\text{m}$  de espesor, y al parecer no producen la misma cantidad de EPS en relación a los bacilos anteriormente mencionados. La importancia de esta fotomicrografía, así como aquella en la **Figura 114D** no sólo radica en señalar su presencia, sino en presentar pruebas sobre la acción localizada del proceso de oxidación bacteriana que realizan estos últimos microorganismos sobre la superficie mineral.

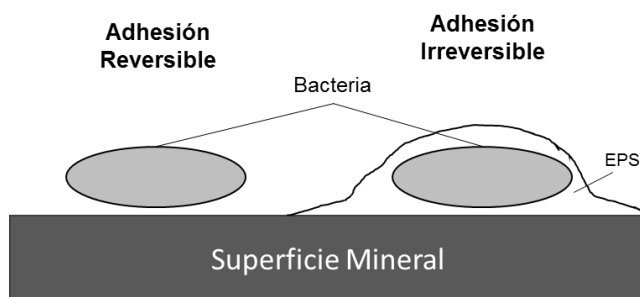


**Figura 113.** Distinta clase de microorganismos en contacto con las capas de oxidación en la calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ). A) Ubicación de los microorganismos. B) Desarrollo de distintas texturas y asociaciones de microorganismos debido a la producción de sustancias extracelulares poliméricas. C) Nuevos microorganismos posicionados sobre la capa de oxidación, se señala los puntos en donde ocurrió la acción oxidativa de estos microorganismos (recuadro) D) Asociación de microorganismos formando grupos de distintas dimensiones, se observa la adhesión de los microorganismos por la generación de EPS.



En las anteriores fotomicrografías se observó el contacto directo de los microorganismos; posicionados sobre distintos puntos de la superficie, adheridos por sustancias extracelulares a esta o formando micro colonias en la calcopirita, sin embargo, a pesar de lo anterior y de posicionarse sobre una superficie que atraviesa cambios en su composición, no se había encontrado indicativos sobre una posible oxidación y disolución localizada en la superficie ejercida por los microorganismos. Es en la Figura 114C y 114D donde se forman dos concavidades en la superficie que mantienen la misma morfología bacilar y dimensiones de los últimos microorganismos descritos (recuadros), presentando cierta profundidad y una textura distinta a donde se encuentran. Esta formación y su desarrollo sería atribuido a la acción oxidativa que los microorganismos previamente adheridos llevaron a cabo, ya que como se ha señalado en la literatura, al entrar en contacto con la superficie mineral y desplegar sustancias extracelulares poliméricas (EPS) ocurre la creación de una interface entre la bacteria y la superficie mineral (**Figura 115**), en donde sucede el proceso de oxidación por parte de complejos de óxido de hierro (III) asociados a la capa de polímeros o como parte de las sustancias extracelulares poliméricas (EPS) que mantienen (Vera et al., 2013).

De esta forma también es posible mencionar que la adhesión de ciertos bacilos no ocurrió de forma irreversible, separándose de la superficie debido a que se encuentran produciendo EPS (**Figura 115**); encontrando una nueva evidencia en cuanto a la acción de los microorganismos en la oxidación y disolución de los sulfuros, donde seguramente podríamos esperar que bajo otros organismos que se encuentran adheridos mediante EPS se observen formaciones similares aún más desarrolladas con respecto a esta.



**Figura 114.** Contacto reversible e irreversible de células microbianas al encontrarse en contacto con la superficie mineral de sulfuros (modificado de Li et al., 2013).

A pesar de no identificar el desarrollo de biopelícula en las diferentes capas de alteración, se observó que la mayoría de los microorganismos en distintos puntos de la superficie tienden a encontrarse interactuando unos con otros, formando estructuras de mayores dimensiones y complejidad, siendo posible considerarlas como micro colonias, una etapa en la formación de biopelícula (Monds y O'Toole, 2009). Además, en cuanto a su distribución sobre la superficie es importante mencionar que los diferentes microorganismos no se encontraron colonizando superficies frescas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) cuya morfología y composición se encontraba sin alterar, ya que su presencia apenas sería incipiente; sin embargo, sí destaca la presencia de estos en superficies con notable alteración en donde se observan capas de productos minerales secundarios formadas sobre la superficie de la calcopirita por la acción de estos microorganismos.

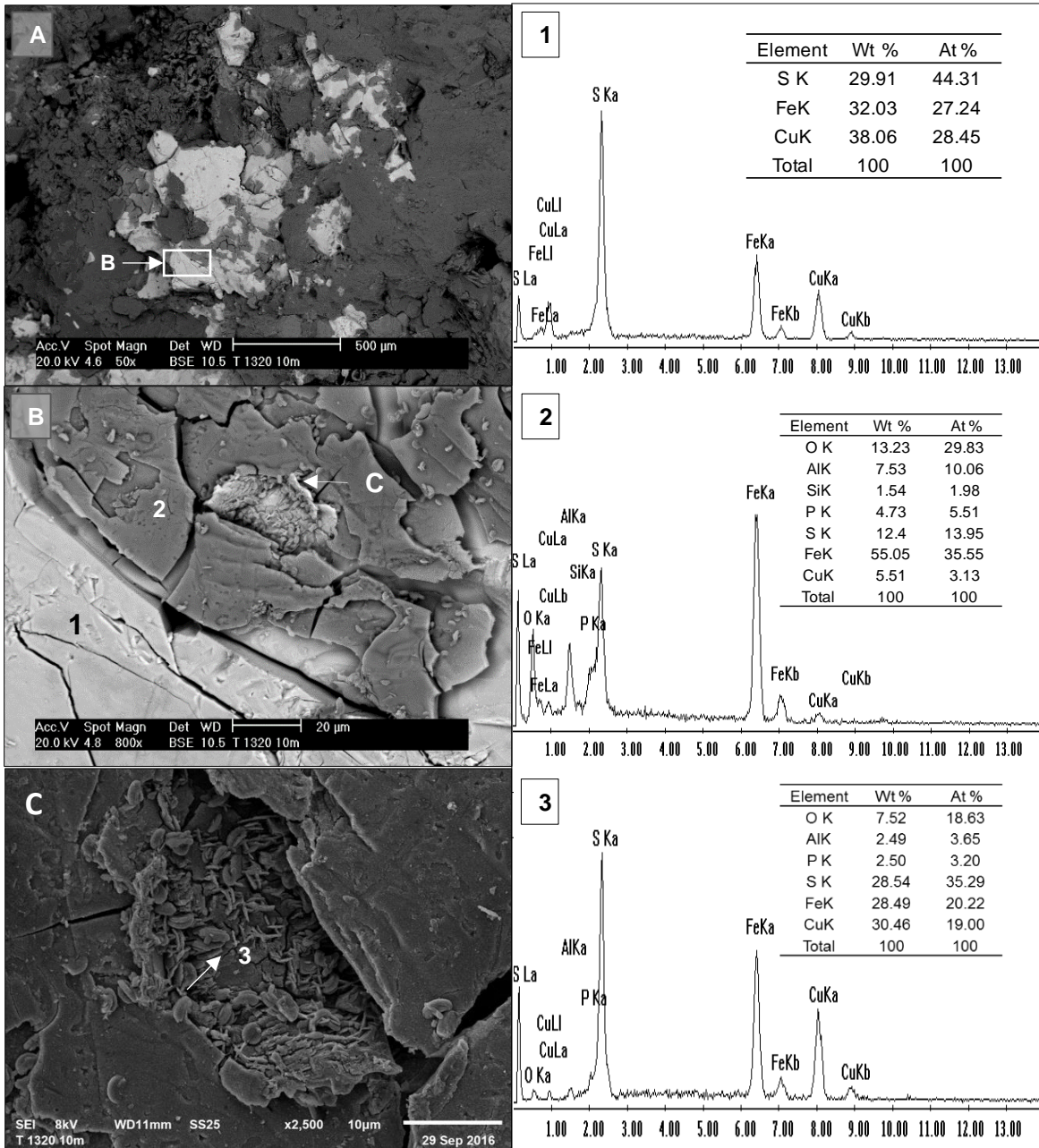
Lo anterior se remarca aún más con las fotomicrografías y espectros EDS de la **Figura 116**, en donde los microorganismos fueron encontrados en un único sitio de la superficie de calcopirita distinto a las capas de alteración anteriormente discutidas. La **Figura 116A** señala la partícula donde se encontraron, mientras que la **Figura 116B** muestra su ubicación, distinguiendo la superficie de calcopirita sin alterar (1) y los productos minerales secundarios (2) alrededor de la zona de interés (3), que presenta una textura (**Figura 116C**) y composición distinta a las fases contiguas tal como se aprecia tras realizar los análisis químicos puntuales realizados por EDS. Con base a su composición se puede señalar como un punto intermedio en la transformación de la superficie de calcopirita con respecto a las capas de oxidación sobre esta; ya que incorpora los mismos elementos como Al, P y O en menor proporción, manteniendo una relación de Cu, Fe y S más cercana a aquella de la calcopirita, al disminuir a 19%, 20.22% y 35.29% respectivamente; mientras que los productos a su alrededor presentaron un enriquecimiento de hierro (35.55%) y un menor contenido de Cu (3.19%) y S (13.95%), tal y como se señala en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Análisis químico puntual realizado en la superficie de calcopirita señalada en la figura 116B, se presenta una comparación de la composición de la superficie con distintos grados de alteración.

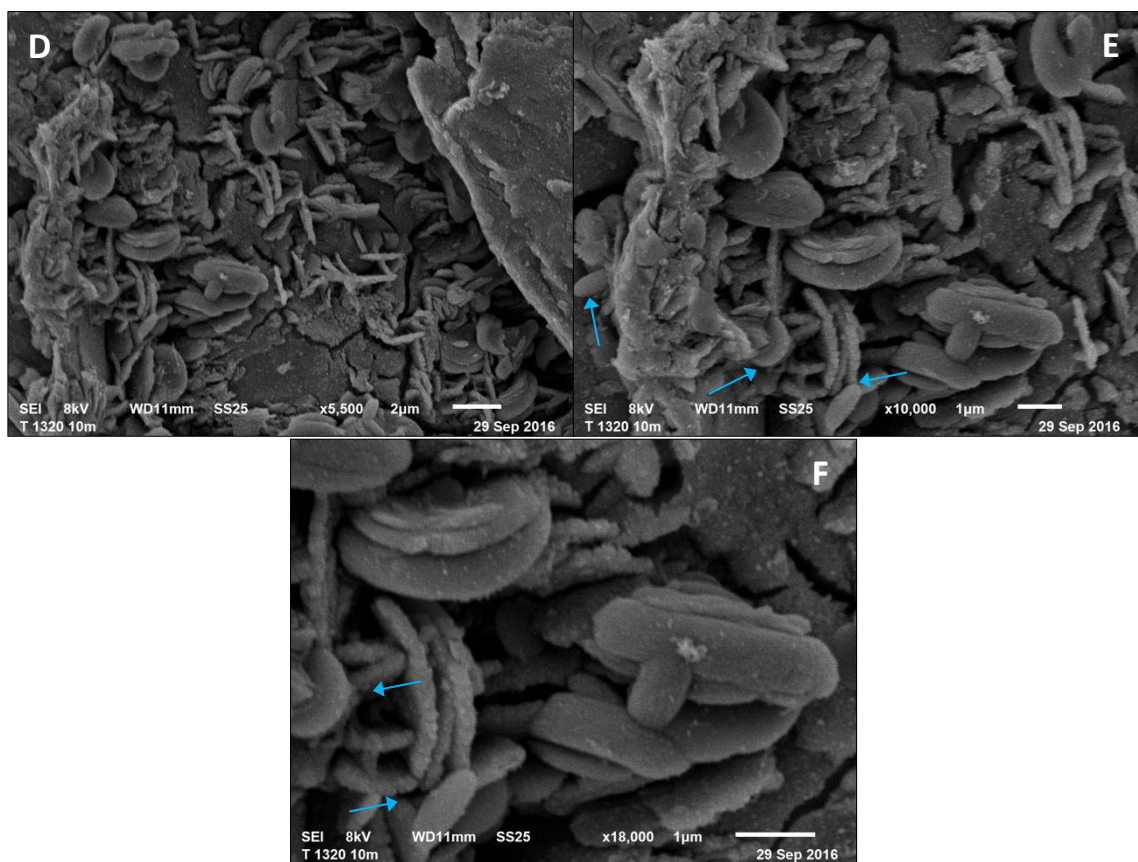
Element	Punto 1 (CuFeS <sub>2</sub> )	Punto 2	Punto 3 (Microorganismos)
	At %		
O K	-	29.83	18.63
AlK	-	10.06	3.65
SiK	-	1.98	-
P K	-	5.51	3.20
S K	44.31	13.95	35.29
FeK	27.24	35.55	20.22
CuK	28.45	3.13	19.00
Total	100	100	100

La distribución de los microorganismos en este punto se observa con mayor claridad en las Figuras **116C**, **116D**, **116E** y **116F**, en donde cerca de 30 bacilos de 1 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud se posicionan en una superficie fracturada, sobre o entre laminillas posicionadas de forma perpendicular a esta; y cuyas características son distintas a una superficie relativamente regular en los alrededores. Acercándose gradualmente, la **Figura 116D** muestra las características morfológicas y distribución de los microorganismos, así como la textura de la superficie mineral. Los microorganismos bacilares se encuentran posicionados preferencialmente sobre las láminas, agrupándose en pequeños grupos, produciendo polímeros hacia sus costados o hacia la superficie como en las figuras anteriores y de esta manera desarrollando estructuras redondeadas o curvas que les permiten interactuar con otros bacilos y/o también para adherirse a la superficie. En la **Figura 116E** se detecta la presencia de dos microorganismos (flechas) cuya morfología es distinta a los demás, presentando una longitud de 1  $\mu\text{m}$  y cerca de 0.3  $\mu\text{m}$  de espesor.





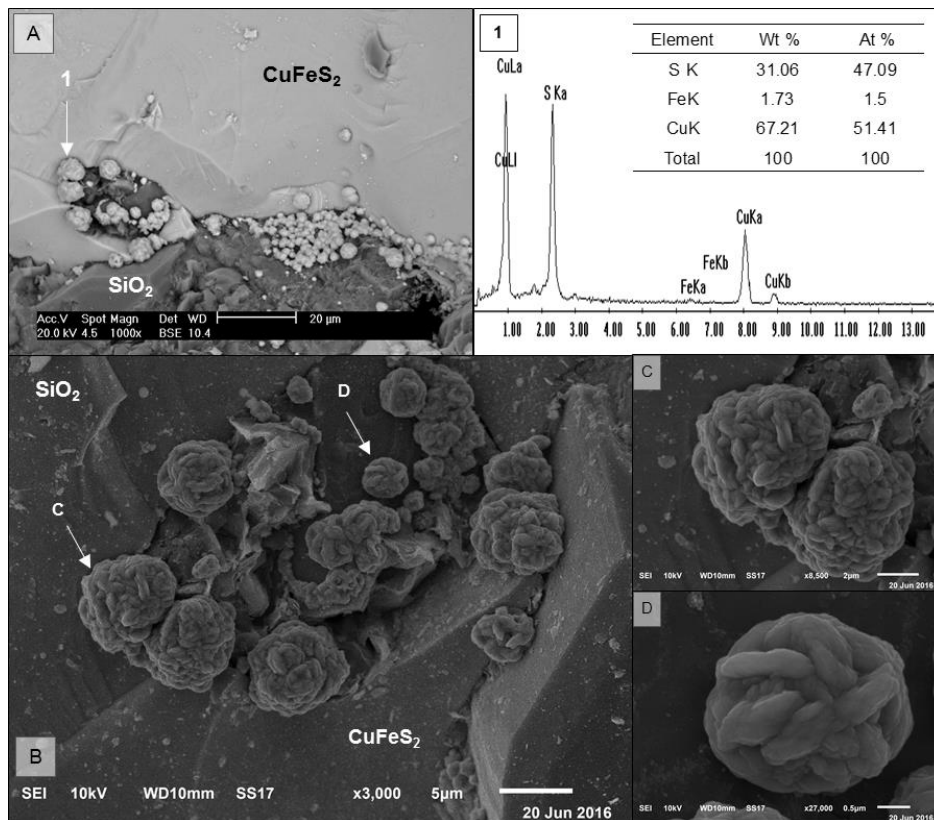
**Figura 115.** Ubicación de microorganismos sobre distintos puntos de alteración en la superficie de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ). A) Ubicación de la partícula de calcopirita en la muestra. B) Diferentes zonas de alteración en donde se encuentran microorganismos, mediante números se señala los puntos donde se realizó el análisis por EDS incluidos en esta figura. C) Zona de alteración donde se ubican los microorganismos, se observa textura distinta con respecto a las capas de oxidación y a la calcopirita sin alterar.



**Figura 116.** Ubicación de microorganismos sobre distintos puntos de alteración en la superficie de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) (Continuación). D) Aspecto de la superficie que sufre un distinto grado de alteración a los productos a su alrededor, se observa la fragmentación de la superficie y formación de laminillas así como la presencia de bacilos distribuidos a través de esta. E) A 10,000x se observa dos tipos de microorganismos posicionados sobre bordes de estructuras laminares y los cambios en la morfología que presentan por la producción de EPS. F) A 18,000x se observa convivencia de las diferentes clases de microorganismos a pocos micrometros de distancia al encontrarse adheridos a la superficie.

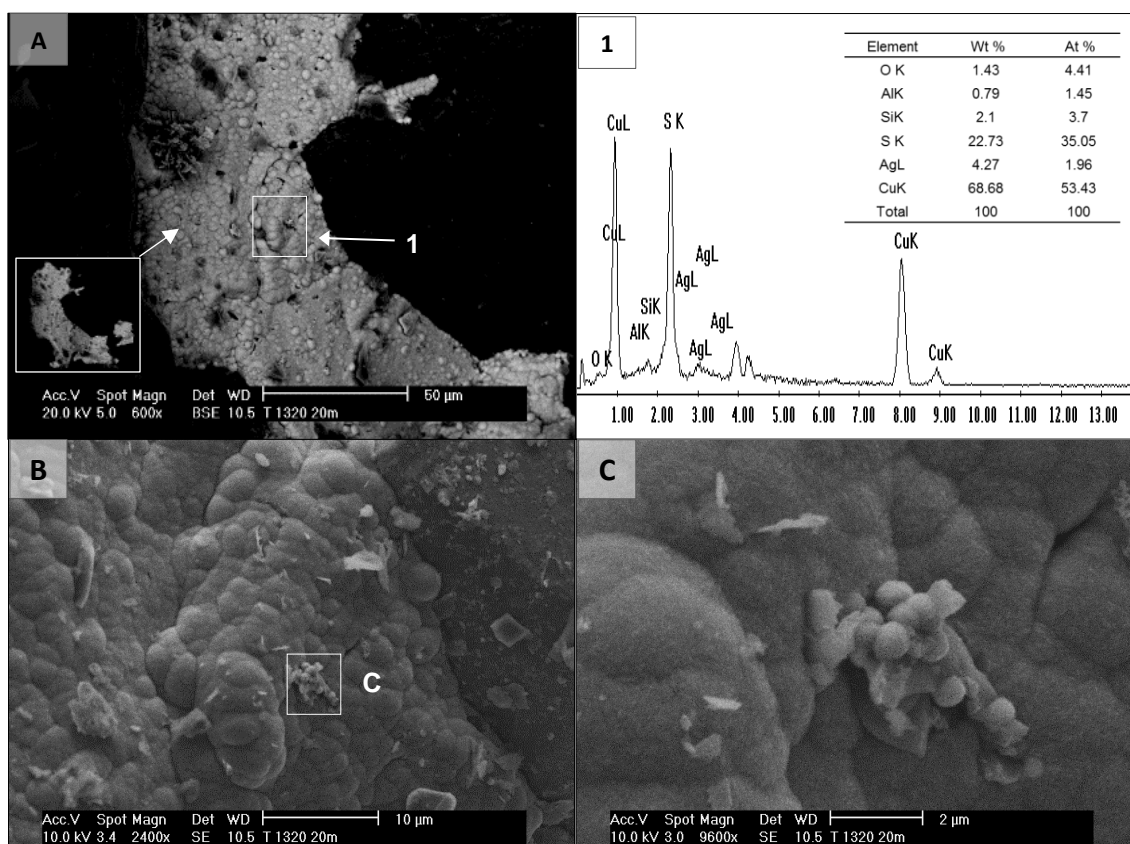
En la última fotomicrografía (**Figura 116F**) se observa con mayor detalle las dos clases de bacilos que interactúan en el mismo sitio a uno o dos micrómetros de entre sí. Se observa la agrupación de 4 bacilos de 3  $\mu\text{m}$  de longitud junto a dos bacilos de 1  $\mu\text{m}$  que se adhieren y posicionan de manera similar en los mismos puntos de la superficie, e incluso en los límites de esta zona de alteración (**Figura 116E**). Incluso, a pesar de tratarse de otra clase de microorganismo, uno de ellos desarrolla una curvatura al adherirse a la superficie mineral, característica que los otros bacilos han presentado en esta zona, así como en otros puntos de la muestra.

En los bordes de una partícula contigua de calcopirita se encontraron precipitados de sulfuros de cobre que mantenían una morfología altamente similar a los organismos bacilares que han estado interaccionando con la superficie mineral. Manteniendo una composición comparable a la covelita (CuS), se encuentran formados por estructuras bacilares entre 0.5 a 2  $\mu\text{m}$  que se conjuntan una sobre otra formando distintas estructuras esferoidales (**Figura 117**). Debido a que estas características corresponderían a los bacilos anteriormente observados, podrían llegar a señalarse como estructuras que influyen su desarrollo en un fenómeno de biomineralización. Además, la superficie de las partículas en la **Figura 117C** asemejan a los rasgos desplegadas por las estructuras de cobre en el nivel 40-50 m de este mismo terrero, donde también se encontraron organismos bacilares sobre pirita; por lo que esto podría indicar que en ambos niveles los organismos bacterianos se encuentran involucrados en su formación.



**Figura 117.** Partículas de CuS esferoidales depositadas sobre calcopirita y cuarzo potencialmente generadas por un proceso de biomineralización en el nivel 10-20 m del terrero 1320. A) Ubicación de las partículas CuS. B) Apariencia de distintas partículas a 3,000x. C y D) Apariencia de la superficie de distintas partículas a 8,500x y 27,000x. Parecen estar conformadas por estructuras bacilares de 1 y 2  $\mu\text{m}$  superpuestas entre sí desarrollando una morfología esferoidal.

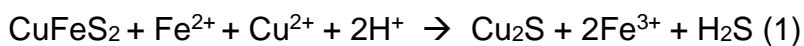
A una mayor profundidad, en el nivel 20 a 30 m se presentó nuevamente el contacto de organismos microbianos sobre una fase mineral de cobre distinta. A diferencia del nivel anterior, organismos cocoides se encontraron adheridos en el centro de una partícula de estromeyerita ( $\text{Cu,Ag}_2\text{S}$ ), cuya morfología y textura se señala en la **Figura 118A**, además de su composición por medio del análisis puntual por EDS número 1. Principalmente conformada por Cu (53.43%) y S (35.05%), se detectó la presencia de plata (Ag) (1.96%) en su estructura indicando una composición semejante a la de estromeyerita ( $\text{Cu,Ag}_2\text{S}$ ) en donde la plata se encuentra en solución sólida. Los microorganismos sobresalen de la superficie al presentar una morfología esférica definida (cocoide) que contrasta con la textura framboidal de la superficie mineral. Estos se encontraron unidos en un pequeño grupo de 6 organismos, sin detectar su presencia en otras zonas cercanas; su morfología y dimensiones coinciden con aquellos microorganismos adheridos a la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) en este mismo terrero ubicados a 10 metros por encima de este nivel (Figura 93).



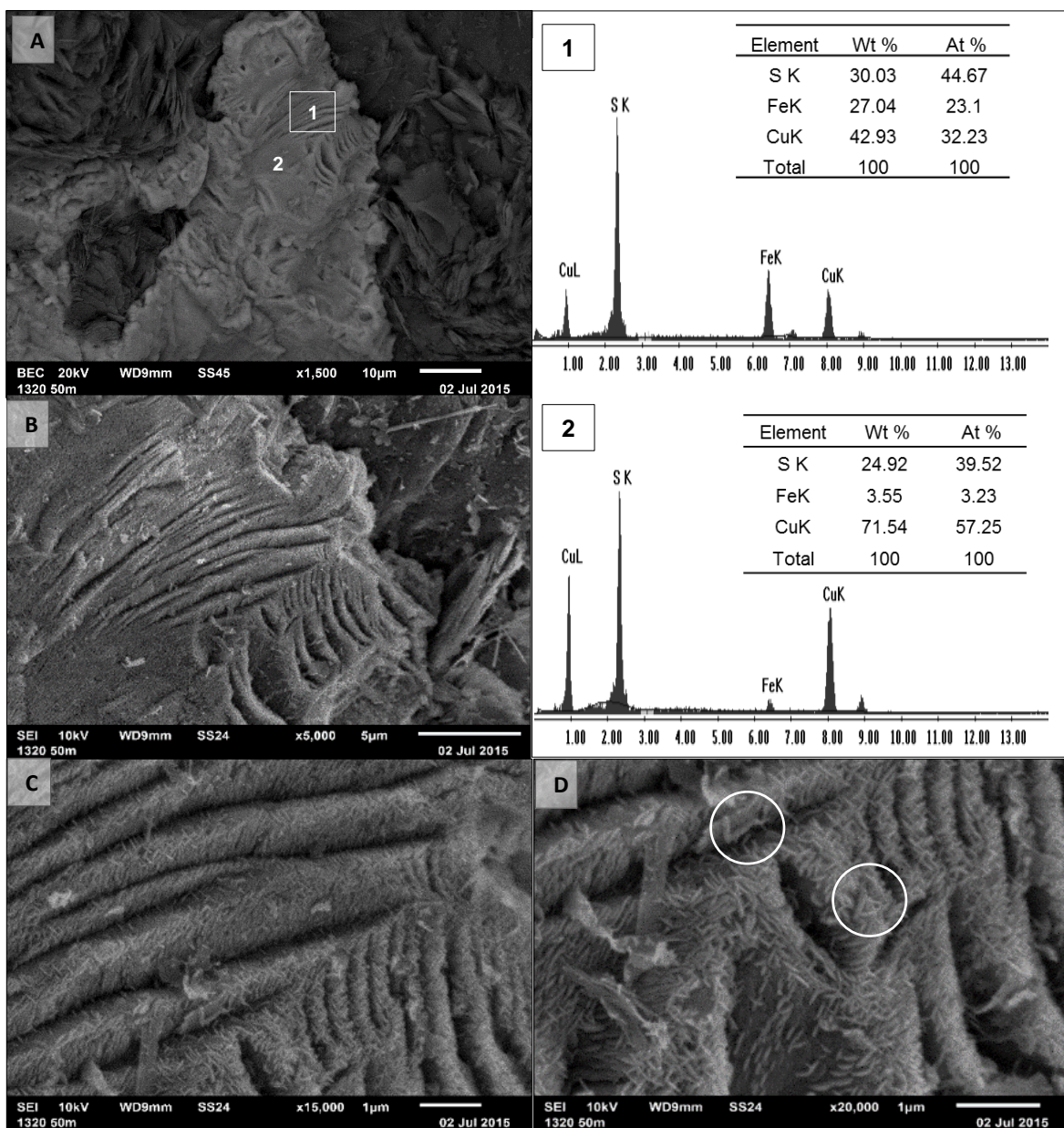
**Figura 118.** Presencia de microorganismos con morfología cocoide sobre una partícula de estromeyerita ( $\text{Cu,Ag}_2\text{S}$ ) en el nivel 20 – 30 m del terrero 1320.

**Figura 118 (continuación).** Presencia de microorganismos con morfología cocoide sobre una partícula de estromeyerita ( $\text{Cu,Ag}_2\text{S}$ ) en el nivel 20 – 30 m del terrero 1320. A) Características de la superficie asociada a una matriz de silicatos, el recuadro blanco señala la ubicación de los microorganismos y el lugar donde se realizó el análisis por EDS correspondiente. B) Ubicación de microorganismos en la superficie que presenta una textura framboidal C) Organismos cocoides agrupados que adhieren a la superficie mineral.

Fue en el nivel 50 – 60 m de profundidad del terrero que se identificó nuevamente una partícula de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) donde se presentaba la adhesión de microorganismos. La partícula muestra las características morfológicas asociadas a dicha fase mineral, como lo son las líneas de clivaje que se observan con más claridad a 5,000x en la **Figura 119B**. En esta misma fotomicrografía se percibe una textura no uniforme en su superficie, y al acercarse a ella (15,000x) se muestra recubierta por presumiblemente bacilos de pocos nanómetros de longitud y espesor. Estos se encuentran específicamente orientados, siguiendo las líneas de clivaje, posicionándose uno sobre otro; entre el gran número de las pequeñas formas bacilares se destacan tres estructuras bacilares en donde se aprecia con mayor claridad la similitud con los microorganismos que fueron observados anteriormente (Figura 93); estos se encuentran adheridos sobre las líneas de clivaje de la calcopirita o en las paredes formadas por estas (señalados en círculos). Al realizar análisis químicos puntuales en esta zona (1) así como a pocos micrómetros de esta (2) se observó una alteración de la calcopirita, presentando un enriquecimiento en cobre y azufre, transformándose gradualmente de calcopirita a calcocita (reacción 1). De esta forma, se encuentra nuevamente una relación entre la presencia de microorganismos en la superficie mineral con la transformación de la partícula.







**Figura 119.** Presencia de microorganismos acidófilos sobre líneas de clivaje de una partícula de Calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) a 50 m de profundidad en el Terrero T-1320. A) Ubicación de la partícula de calcopirita y la zona de interés denotada por el recuadro blanco. Los números señalan los sitios donde se realizó el análisis químico puntual por EDS. B y C) Aspecto de la superficie de calcopirita, se observan líneas de clivaje características y el recubrimiento de la superficie por formas bacilares D) Ubicación de algunos organismos bacterianos en los cuales se aprecia con mayor claridad sus características morfológicas, situados sobre líneas de clivaje en la calcopirita (círculos blancos).

### 4.2.3 Adhesión y contacto de microorganismos sobre silicatos

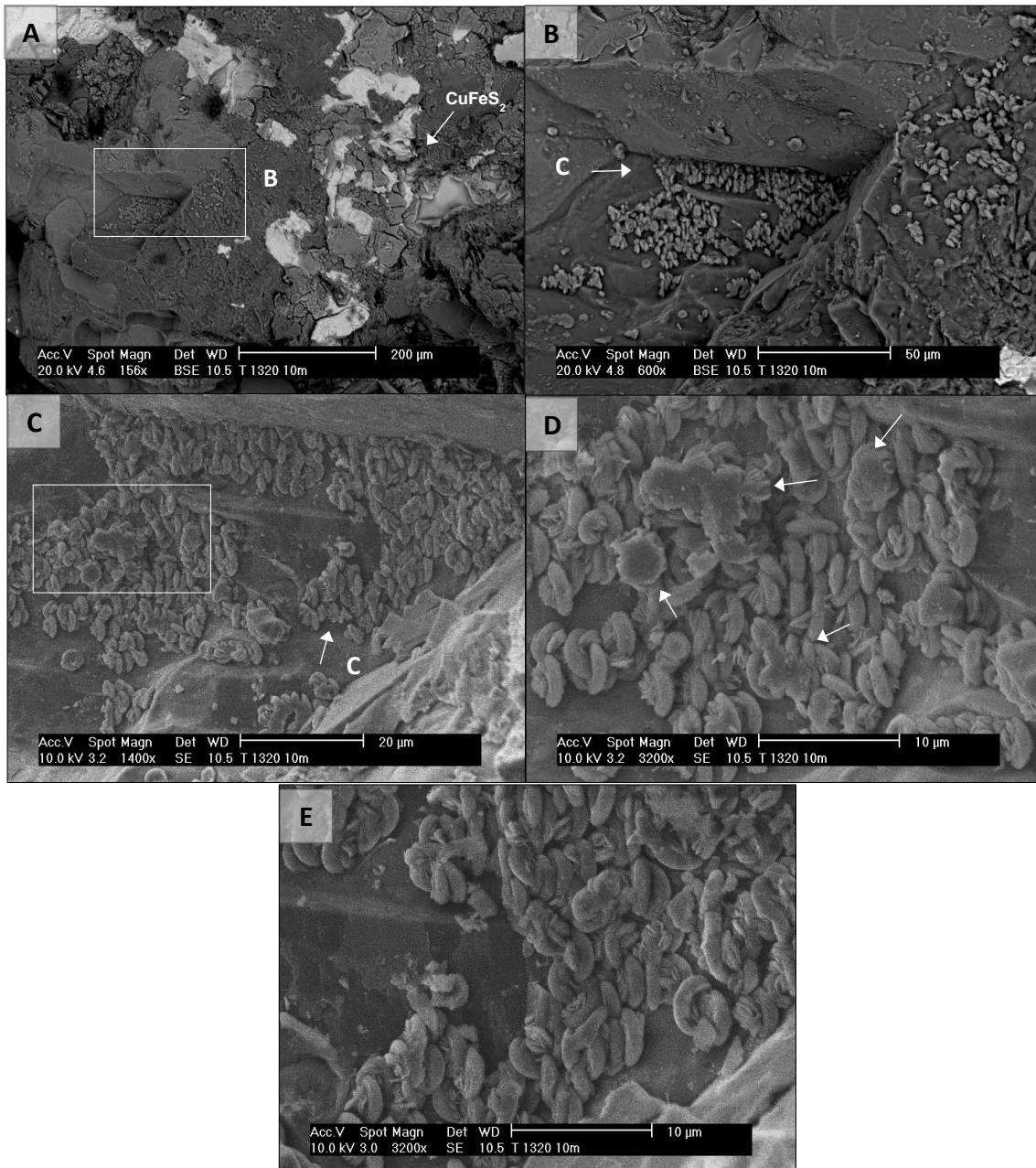
En terreros y columnas de biolixiviación los microorganismos se encontraron en un medio heterogéneo, en donde una composición mineralógica diversa propiciaría un potencial contacto y/o adhesión de los microorganismos a otras fases minerales además de los sulfuros metálicos aquí reportados. No obstante, es importante recalcar la afinidad que bacterias ferro y sulfo oxidantes muestran por los sulfuros sobre otro tipo de sustratos como cuarzo u otros silicatos (África et al., 2013); por lo que este trabajo se enfocó en encontrar y observar los diferentes microorganismos y asociaciones desarrolladas sobre dichas superficies. Sin embargo, durante el análisis de las muestras minerales también se detectó la colonización de otras superficies que comprenderían las fases de ganga para el proceso de biolixiviación, y que a pesar de la abundancia con respecto a partículas de sulfuros y que comprenden la mayoría de las áreas examinadas, se encontró sólo dos hallazgos de la interacción microbiana con mineral silicatos, al observar organismos bacilares en el nivel 10 – 20 m de profundidad del terrero 1320 y en la columna de biolixiviación 2.

En el nivel 10 – 20 m los microorganismos se encontraron adheridos a silicatos cercanos a partículas de calcopirita que habían sido colonizadas por diferentes grupos de bacilos, y a diferencia de las partículas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y pirita ( $\text{FeS}_2$ ), los microorganismos ocuparon zonas más extensas de la superficie al posicionarse sobre silicatos. Cercanos a las partículas de calcopirita colonizadas y que presentaban un notable estado de alteración químico mineralógica, la **Figura 120** muestra los primeros bacilos y análisis químicos puntuales por EDS obtenidos para diferentes puntos de interés en la muestra. Las **Figuras 120A** y **120B**, señalan la ubicación de un amplio grupo de estructuras bacilares distribuidas sobre distintos puntos de un silicato de hierro a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  de la calcopirita. Sin encontrar una restricción en su contacto y/o adhesión por el relieve de la superficie, al acercarse a 1,400x se aprecia la similitud de las estructuras con aquellos bacilos adheridos a la calcopirita (**Figura 120C**), en donde a diferencia de estos, una mayor densidad de bacilos se encuentra unidos en la superficie al posicionarse de forma



paralela y alineados uno tras otro sobre una misma zona de la superficie. Al colonizar la superficie de esta manera, la agrupación de los bacilos tiende a formar una monocapa principalmente sobre puntos de la superficie que mantienen un relieve relativamente uniforme (**Figura 120C y 120D**); para posteriormente sobreponerse o acumularse o presentar una mayor densidad de bacilos, agrupándose de forma empalizada posicionándose unos sobre otros como el borde con la partícula de carbonato (**Figura 120C**). A 3,200x en la **Figura 120D** se observa con precisión las características que exhiben los bacilos al adherirse a la superficie; con longitudes cercanas a los 2  $\mu\text{m}$  se encuentran unidos tanto por sus extremos como por sus paredes laterales, formando agrupaciones en las que se posicionan uno sobre otro y adoptan formas curvas, tal y como se observó en ocasiones anteriores. Incluso, al encontrar un mayor número de organismos unidos, se puede observar la generación de sustancias extracelulares poliméricas por los bacilos, dando paso a la formación de agrupaciones con una apariencia sólida (flechas) debido a su recubrimiento por esta matriz de EPS, incorporándose en una estructura de mayores dimensiones donde no se aprecia cada bacilo individualmente; observando probablemente de esta forma los principios en cuanto al desarrollo de biopelícula por parte de los microorganismos.

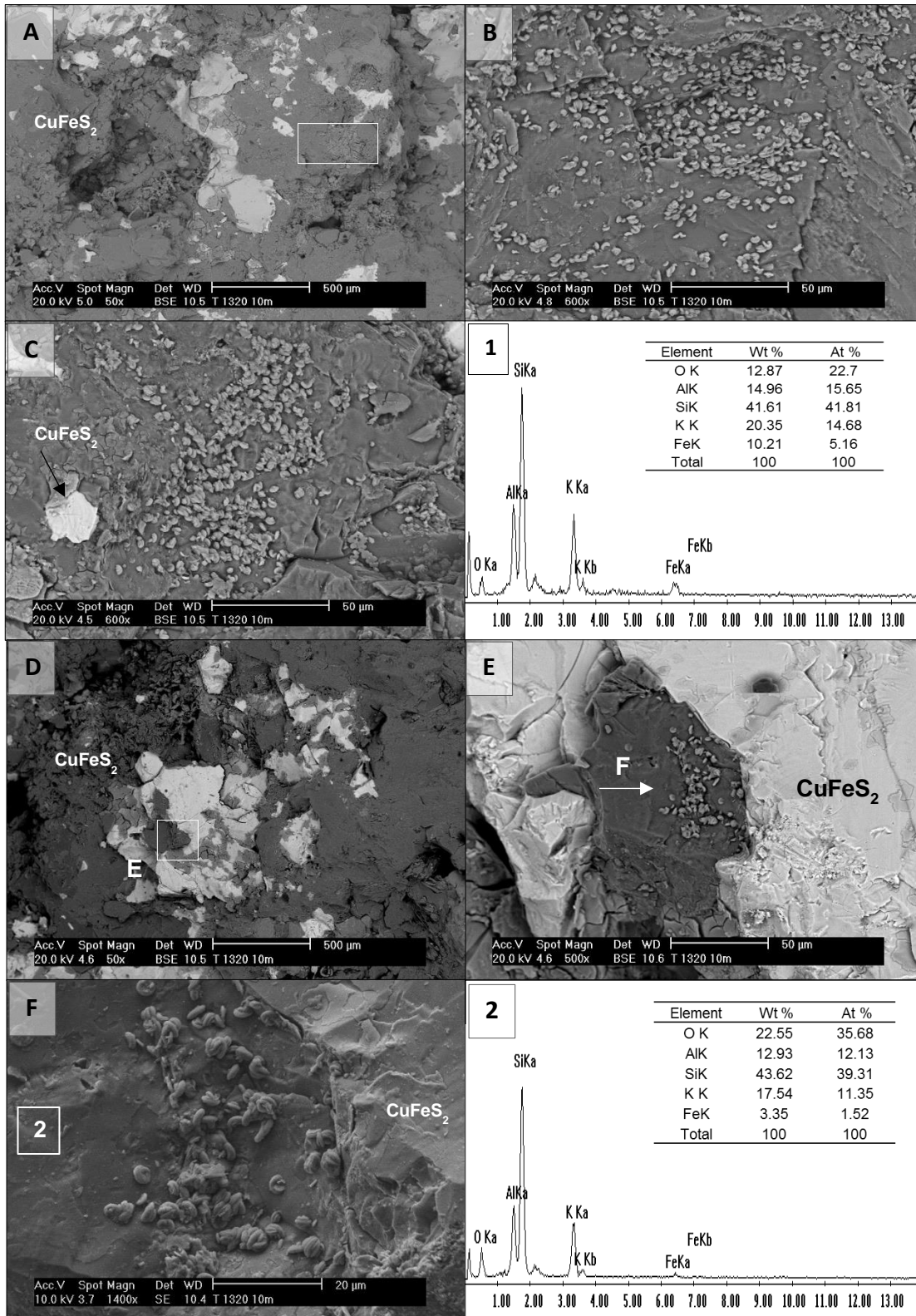
A pesar de que de no todos los microorganismos se encontraron embebidos en sustancias extracelulares poliméricas, en la **Figura 120E** continuamos observando su agrupación y colonización de la superficie. De forma puntual se identifican algunos microorganismos que al unirse parecen conectarse mediante EPS, formando agrupaciones cohesivas aparentemente por dicha matriz de polímeros.



**Figura 120.** Microorganismos sobre la superficie de silicatos en el nivel 10-20m del terrero 1320. A) Localización de los microorganismos. B) Agrupaciones microbianas sobre la superficie mineral. C y D) Características de los bacilos, se observa la convivencia y generación de sustancias extracelulares poliméricas en la que se encuentran embebidos bacilos (flechas). E) Recubrimiento de la superficie de silicato por los microorganismos.

En otros puntos de la muestra la colonización de los microorganismos sobre el mineral de ganga continuó, las distintas fotomicrografías en la **Figura 121** presentan su distribución sobre silicatos de hierro. Exhibiendo un comportamiento similar a los anteriores, las agrupaciones de bacilos ocupan amplias zonas de la superficie (**Figura 121B y 121C**), extendiéndose desde 50 a más de 200  $\mu\text{m}$ , contrastando notablemente con lo que se ha encontrado en los sulfuros metálicos. Ubicados de forma inmediata junto a calcopirita o a ciertos micrómetros de distancia, los bacilos se encontraron en un relieve no uniforme, adaptándose y adhiriéndose a diversas irregularidades en la superficie, tanto en grupos o de forma individual por medio de EPS. De esta forma se observa la mayor distribución y densidad de microorganismos en las muestras minerales en este trabajo de investigación (**Figura 121B y 121C**).

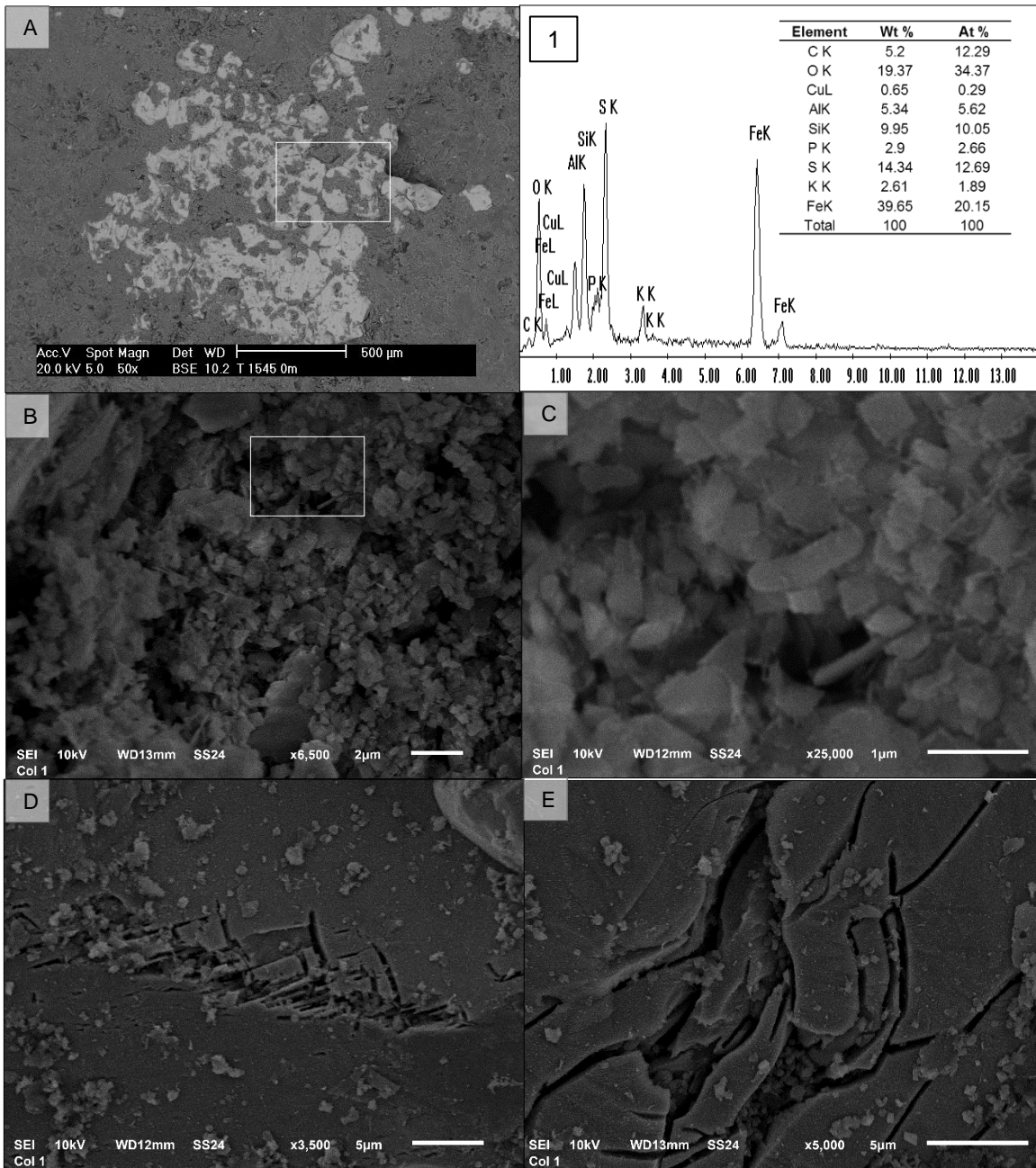
Dentro de este comportamiento, fue de especial relevancia encontrar un conjunto de microorganismos posicionados sobre un silicato asociado directamente a calcopirita en las **Figura 121E y 121F**. En éstas los microorganismos se agrupan y adhieren preferentemente a los silicatos ya que no se encuentran en la superficie inmediata de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ). La **Figura 121F** muestra con mayor claridad lo anterior, visualizando a los bacilos que forman agrupaciones y que también se encuentran adheridos a la superficie de forma individual, llegando a ubicarse en los bordes con la calcopirita sin llegar a hacer contacto con esta o distribuirse sobre esta superficie disponible.



**Figura 121.** Colonización de silicatos por microorganismos bacilares en el nivel 10-20m del terrero 1320. A) Ubicación de microorganismos en la muestra. B) Distribución de organismos bacilares sobre silicato de hierro, posible ortoclasa en base al análisis químico puntual por EDS.

**Figura 121 (continuación).** C) Un gran número de bacilos se conjuntan para recubrir la superficie de la misma fase mineral, los microorganismos tienden a encontrarse en agrupaciones más numerosas. El análisis EDS de la superficie se anexa en el recuadro 1. D) Ubicación del punto de interés cerca de calcopirita. E) Ubicación del mismo tipo de microorganismo bacilar posicionados preferentemente sobre un silicato de hierro asociado a una partícula de calcopirita. F) Fotomicrografía por SE de la superficie a 1400x, se observan las características de los bacilos y cómo es que no se encuentran en la calcopirita a pesar de su cercanía.

La presencia de microorganismos se detectó nuevamente en la sección final de columna de biolixiviación número 1, donde a diferencia de las características observadas en las últimas fotomicrografías, sólo se localizó un microorganismo bacilar con 1.2  $\mu\text{m}$  de longitud de forma aislada en la matriz de silicatos, tal y como se observa en la **Figura 122**. Su presencia se encontró relacionada a signos de alteración morfológica de pirita, al encontrar con cierto desarrollo de clivaje y fracturas en la superficie de la partícula que lo rodea.



**Figura 122. Presencia de microorganismos sobre silicatos en la columna de biolixiviación No. 1.** A) Ubicación del punto de interés en la muestra. B) Aspecto de la superficie donde se ubica el microorganismo, su composición se señala en el espectro No.1. C) Microorganismo con morfología bacilar posicionada sobre silicatos que se encuentra de forma aislada. D y E) Superficie de pirita cercana al punto donde se encuentra el microorganismo, se observa la alteración morfológica al generarse fracturas (E) y zonas de clivaje (D) sobre su superficie debido al proceso de oxidación química.

### 4.3 Discusión de resultados

A través de la caracterización de las muestras minerales extraídas a diferentes niveles de profundidad en los terreros de biolixiviación y la exploración puntual de partículas de sulfuros presentes en estas, fue posible elucidar distintos cambios y variaciones en las condiciones geoquímicas ocurrientes con respecto a la profundidad en cada uno de los taludes de terreros. Dichas condiciones se encontraron determinadas y asociadas por distintos tipos de alteraciones morfológicas y químico mineralógicas, así como la formación de fases minerales secundarias que permitieron asociar y en su caso inferir determinadas condiciones de acidez, potencial redox; e incluso asociar la acción de los microorganismos ferro y sulfo oxidantes con las condiciones que ocurrían a cada nivel de profundidad. Es importante denotar que dichos cambios ocurrieron de manera gradual y que fue posible observar cómo en ciertas partículas los procesos no habían comenzado a realizarse, o tal vez se presentaba un cambio puntual de condiciones con respecto a las que representaron con mayor notoriedad a cada nivel de profundidad. Lo anterior mantendrá un mayor sentido al considerar los señalamientos realizados por Dockrey et al., (2014) al incluir el factor microbiológico y la formación de micro ambientes debido a la alta heterogeneidad a nivel mineralógico y geoquímico de los terreros, tal como lo menciona Nichol (2005).

#### 4.3.1 Terrero 1320

En el terrero 1320 los cambios morfológicos y químico mineralógicos comenzaron a ocurrir desde los primeros 10 metros con respecto a su superficie, al observar la alteración de pirita y calcopirita. En este punto, además de la solución ácida con la que se riegan los taludes y la interacción microbiana, el oxígeno atmosférico se encontraría interviniendo en el proceso de oxidación de sulfuros debido a su proximidad a la superficie, presentándose como el principal agente oxidante en conjunto con ion férrico (Blowes y Ptacek, 2014). En este nivel aún no se observó la generación de clivaje o *pits* en pirita, indicativo de las condiciones de acidez y de su oxidación microbiana, encontrando en su lugar la formación de precipitados laminares y tubulares < 2  $\mu\text{m}$  de óxidos de hierro, mientras que en



calcopirita se encontró la formación de jarosita sobre calcopirita. Contrastantemente, en la Figura 24 comenzó a ocurrir otro tipo de alteración, tras la formación de pits circulares en la misma fase mineral, y cuya generación se ha encontrado asociada a la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Zhao et al., 2013). Uno de los principales factores en la lixiviación y/o biolixiviación de la calcopirita es el potencial redox (Eh), siendo asociados a la pasivación o mejora en su disolución, y que en base a las observaciones experimentales señaladas por Zhao et al., (2013) esta podría encontrarse bajo condiciones <650 mV vs SHE (Estándar Hydrogen Electrode) y a la acción de los microorganismos, aunque no se observaron adheridos a su superficie.

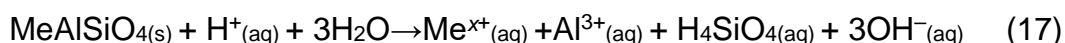
A partir del nivel 10-20 m comenzó la observación de microorganismos en la superficie de pirita y principalmente calcopirita, al encontrar su colonización por micro colonias mixtas con el mayor número de integrantes con respecto a los restantes nivel de profundidad (Figuras 92 y 110). La adhesión, alteración morfológica y químico mineralógica (formación de fases minerales secundarias) evidencio la intervención de los microorganismos en el proceso de oxidación de ambas fases, e incluso, debido a la formación de diversas fases secundarias señalo las condiciones en las que los microorganismos se encuentran en el medio. La formación de fases de oxi hidróxidos de hierro e hidroxisulfatos en las superficies de pirita, y principalmente calcopirita evidenciaron la generación de un medio oxidante en el que el potencial de oxido reducción se encontraría por arriba de los 650 mV al tomar en consideración las observaciones de Córdoba et al., (2008) y Li et al., (2013), ya que por arriba de este valor ocurre la pasivación de calcopirita por partículas de jarosita, tal como ocurre en este nivel de profundidad. La precipitación de jarosita es principalmente dependiente del pH, ocurriendo predominantemente en un rango de 1.9 a 2.2 (reacción 15) (Li et al., 2013).



M = K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> ó NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Las variables composiciones de los precipitados laminares sobre calcopirita indican cómo ocurre la transformación de la superficie, señalando el gradual enriquecimiento de Fe, la disminución en el contenido de azufre y principalmente como el Cu es parcialmente liberado, disminuyendo gradualmente hasta no presentarse en las capas de alteración de jarosita (Tabla 8). Además de lo anterior, la composición de dichos precipitados señalaría de manera indirecta el procesos de disolución de fases minerales de ganga que se encuentran ocurriendo en el nivel, ya que la disolución de partículas de aluminosilicatos permitirían la liberación de  $H_4SiO_4$ , Al, K, Ca, Mg y Mn; y que se encuentran asociados a las capas de jarosita y otras fases de oxi hidróxidos de hierro formados sobre calcopirita e incluso pirita en este y en los siguientes niveles (40-50 y 70-80m) a través del terrero.

Con base en los análisis por DRX, la principal fase que confirmaba el material de ganga fue cuarzo, seguido de albita, moscovita, ilita y ortoclasa, entre otros que se presentaron en distintos porcentajes a través de los terreros (Figuras 86-90). Así, la disolución de los distintos grupos de silicatos encontrados en los terreros (feldespatos potásicos, filosilicatos) y que mantienen un restringido número de elementos asociados a su estructura, puede representarse de manera general en base a las reacciones 16 y 17 señaladas por Lottermoser (2007):



(Me = Ca, Na, K, Mg, Mn or Fe)

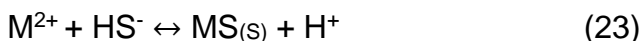
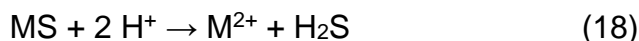
Desde los primeros diez metros y a través de este terrero ocurrió la asociación de Si, Al y P con un amplio número de precipitados de oxi hidróxidos e hidroxisulfatos de hierro. Integrándose de manera gradual y mediante distintos mecanismos acorde a cada fase mineral. En el caso de la incorporación de aluminio en partículas de jarosita podría atribuirse a un proceso de co-precipitación con hierro, encontrándose en la estructura de la jarosita debido a la sustitución de  $Fe^{3+}$  por  $Al^{3+}$ , presentándose de esta forma entre 2.77 a 12.60 Wt%. Dicho comportamiento ha sido descrito por Sánchez España y Burgos (2015) al observar la incorporación de Al en jarosita en ríos y lagos en el Cinturón Píritico Ibérico que

exhiben un pH < 4.5 (Río Tinto, pH promedio 2.3), por lo que es posible señalar dichas condiciones de acidez en las que se encontraría en solución para después dar paso a su inclusión de jarosita a condiciones más ácidas (1.9 a 2.2).

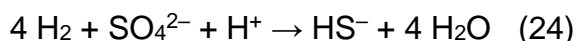
Además de la incorporación de Al y Si en los precipitados observados, el desarrollo de orificios y alteraciones encontrados sobre la matriz de silicatos refleja las condiciones de acidez y la consecuente disolución de partículas de cuarzo, albita y ortoclasa, sobre las que también ocurrió la formación de fases poco cristalinas de oxihidróxidos de hierro probablemente debido a las condiciones de acidez generadas cerca de dichos puntos (Figura 30A y 30B).

La precipitación de las partículas de jarosita y otros oxihidróxidos de hierro podría provocar una disminución de la concentración de hierro (III) en solución (así como Al, Si y P), causando de la misma manera una disminución del potencial redox, ya que este se encontraría regulado por la relación de  $[Fe^{3+}]/[Fe^{2+}]$  en solución. Una consecuente disminución en las condiciones oxidantes (< 650 mV) promovería la formación de los precipitados esferoidales de sulfuros de cobre y hierro observados en las Figuras 26, 27 y 117, indicando de manera indirecta como ocurre la evolución geoquímica del medio en los terreros.

Así, incluso sulfuros metálicos se encontraron como minerales secundarios en los terreros, ya que los hábitos cristalinos que presentaron son distintos a aquellos señalados y observados para estas fases. Es importante señalar que en el intervalo de los 10-20 m de profundidad no fueron una constante en el nivel como ocurriría más adelante, ya que los únicos casos observados ocurrieron sobre y a un costado de una partícula de pirita (Figuras 26, 27), así como en los bordes de calcopirita cercana al desarrollo de micro colonias de organismos bacilares (Figura 117). La formación de sulfuros de cobre en este nivel se contraponen a las condiciones de potencial redox antes señaladas (>650mV vs SHE) ya que para su generación se requeriría la presencia de H<sub>2</sub>S en el medio, promoviendo condiciones reductoras, formando de esta manera sulfuros metálicos con base en las reacciones 20 a 23 (Lewis, 2010):



El H<sub>2</sub>S requerido podría ser generado como un subproducto del proceso de oxidación vía polisulfuro a partir de la oxidación de sulfuros solubles en ácido presentes en el nivel (reacciones 18 y 19) (y que se encontraría reaccionando con el cobre disuelto en forma de sulfato de cobre CuSO<sub>4</sub> para formar los precipitados de covelita y calcocita mediante la reacción 22 y 23. La generación de H<sub>2</sub>S se atribuirá así a la oxidación de la calcopirita que ocurrió en el presente y anterior nivel, desde su alteración morfológica hasta su pasivación, interviniendo los microorganismos identificados en el medio, así como los agentes oxidantes H<sup>+</sup> y Fe<sup>3+</sup>. Adicionalmente, es importante considerar que una de las potenciales fuentes de H<sub>2</sub>S o HS<sup>-</sup> sería la reducción de sulfato presente en el medio por acción de microorganismos sulfato reductores (SRB). Sin embargo, no se tiene registro de su presencia en el terrero en base a la tipificación de microorganismos realizada con anterioridad, y de encontrarse ya que no se dispondría de una fuente orgánica de carbono como fuente de energía por los organismos sulfato reductores (SRB) se encontrarían aquellos organismos autotróficos que puedan usar H<sub>2</sub> como sustrato (reacción 24) (Ehrlich, 2016):



La formación de los precipitados esféricos de covelita, calcocita y bornita se encontrarían relacionados a la previa liberación de cobre a partir de calcopirita, la principal fase de cobre en este nivel y a un potencial redox por debajo de los 400 o 300 mV (vs SHE), así como a condiciones ácidas en el nivel expresadas por la formación de oxi hidróxidos de hierro. Es importante mencionar que las formaciones de este tipo de sulfuros pueden presentarse en un mayor rango de condiciones de

acidez y cercanas a la neutralidad, sin embargo, al considerar la incorporación de  $H_2S$  y los procesos de oxidación antes observados se podría señalar condiciones su formación bajo condiciones ácidas ( $pH < 4$ ).

Otro de los factores más relevantes durante la oxidación de calcopirita es la temperatura a la cual ocurre, y como su disolución ocurre y genera mayores porcentajes de liberación de Cu a temperaturas de  $68\text{ }^\circ\text{C}$  por ejemplo, con respecto a aquellas cercanas a las ambientales ( $25, 35\text{ }^\circ\text{C}$ ). En ambos casos, Córdoba et al., (2008) detectó la formación de precipitados tipo jarosita efectuando un efecto pasivante, por lo que en este caso sería aún más complicado determinar que tipo de condiciones de temperatura ocurriría, sin embargo, en base al nivel de profundidad es posible descartar un aumento tan pronunciado como aquel superior a los  $60\text{ }^\circ\text{C}$ .

A los 20-30 m el cobre previamente liberado se encontraría precipitando nuevamente en forma de sulfuros debido a la formación de covelita y estromeyerita, manteniendo un hábito cristalino botroidal asociado nuevamente a su precipitación. Covelita presentaría mayores dimensiones, al encontrarse cerca de los  $20\text{ }\mu\text{m}$  en contraste con aquellos precipitados de  $1\text{ }\mu\text{m}$  en el anterior nivel, mientras que la formación de estromeyerita con plata en solución sólida se encontró como un precipitado laminar con un relieve también botroidal sobre la superficie de ortoclasa. Al igual que el nivel anterior, los precipitados de covelita y estromeyerita se encontraron cerca de partículas de pirita con fracturas y desarrollo de clivaje, señalando una evolución en las condiciones en el medio al generarse condiciones reductoras ( $< 400\text{ mV}$ ) tras una etapa oxidante antecesora. De forma contrastante, en este nivel no se observaron precipitados de oxi hidróxidos de hierro, indicando que las condiciones reductoras podrían encontrarse asociadas a la previa disminución en la concentración de Fe desde el nivel anterior, así como también a una disminución en la concentración de oxígeno disponible debido a la profundidad del terrero y el transporte de  $H_2S$  en la solución del medio.

En los siguientes diez metros de profundidad (30 – 40 m), las condiciones oxidantes y consecuente disolución de la pirita y calcopirita fue evidenciada en la superficie de las partículas en las Figuras 32 y 33, desarrollando zonas de clivaje y pits en las que se posicionaron microorganismos bacilares y formaciones de biopelícula en estado de maduras que determinarían distintas condiciones hidrodinámicas en este punto del terrero, permitiendo señalar la influencia del flujo de solución en el desarrollo de dichas estructuras y la amplia oxidación de la pirita. Las partículas de calcopirita asociadas en forma de intercrecimientos con pirita comenzaron a liberarse tras la disolución de esta última, presentando superficies que de forma gradual comenzaron a ser oxidadas al igual que aquellas asociadas a la matriz de silicatos. Al presentar orificios, líneas de clivaje y otros aspectos de desgaste, tal y como se observa en las Figuras 32C, 33A y 33B, se señalarían condiciones de acidez y presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  requerida para que ocurra la disolución de las partículas (pH 1-3), liberando hierro (II) en solución que se encontraría disponible para su oxidación por los organismos bacterianos en este nivel y que también se encontraría precipitando nuevamente al incorporarse en sulfuros de cobre sobre distintos puntos de pirita. El cobre liberado de la calcopirita y el hierro en solución potencialmente también proveniente de calcopirita se encontraría precipitando dando paso a la formación de sulfuros de Cu secundarios como idaita, bornita y digenita, cuya formación requeriría condiciones de acidez superiores a un pH > 2, siendo el potencial redox determinante en que fase ocurriría primero. Las partículas de digenita se presentarían a un valor de Eh menor a 200 mV vs SHE, mientras que la bornita menor a 100 mV vs SHE, e idaita requeriría condiciones más reductoras, al ser detectada a valores de Eh negativos: -300 a 800 mV vs SHE (Schlesinger y King, 2011).

Estas fases se encontrarían actuando como controles de retención del cobre previamente liberado de calcopirita o algún otro sulfuro secundario en el nivel, evitando así que este continúe siendo transportado a través del terrero para su posterior recuperación. Debido a que se presentó un mayor número de zonas recubiertas con precipitados de idaita esta se identificaría como la principal fase asociada a la precipitación del cobre en solución en el nivel (Figuras 33 y 34). Así,

las distintas condiciones reductoras requeridas para su formación explicarían las diferencias en características morfológicas exhibidas por pirita en este punto con respecto a aquellos con un amplio desarrollo de clivaje en la Figura 36D y en la figura 94.

A pesar de que en las anteriores superficies no fue posible observar microorganismos, la presencia de biopelícula y la formación de colonias microbianas fue evidente en otras partículas de pirita (Figura 93 y 94). Donde en base al amplio desarrollo de clivaje, bajo y a los alrededores de las formaciones de biopelícula en estado de maduras y la nula presencia de sulfuros de cobre, se podría señalar la prevalencia de condiciones oxidantes y ácidas ( $\text{pH} < 3$ ), repercutiendo en la alteración de la superficie mineral. Las condiciones para la formación de biopelícula en la que se observa un avanzado estado de maduras coinciden con la formación de los precipitados de sulfuros de cobre, cuya morfología se ha asociado a condiciones hidrodinámicas no turbulentas que permiten la nucleación y un posterior desarrollo y crecimiento de dichas estructuras, generando hábitos cristalinos específico (Sánchez España, 2017). Así, este tipo de condiciones también daría la oportunidad para el desarrollo de biopelículas en estado de madurez e influyendo en la acumulación de microorganismos en los pits ocupados por bacilos en la misma partícula (Figura 93D).

La presencia de microorganismos continuaría ocurriendo en el nivel 40-50 m a pesar de un aumento del pH hacía condiciones cercanas a la neutralidad. No obstante, debido a las diferentes formaciones minerales secundarias detectadas en el nivel, así como su morfología y disposición con respecto a otras partículas minerales, se podría señalar distintas etapas del proceso de alteración en el nivel y que incluirían el cambio de condiciones. En un principio ácidas, las condiciones evolucionarían a neutras para volver a presentar una disminución al encontrar condiciones de mayor acidez tras la formación de las capas pasivantes de oxihidróxidos de Fe.



En un principio, sobre la superficie de pirita se detectó la formación de clivaje y canales de alteración (Figura 43) indicativos de condiciones ácidas ( $\text{pH} < 3$ ) necesarias para que el proceso de disolución ocurriera. El pH del medio o de las zonas inmediatas a pirita aumentaría, indicado por la formación y precipitación gradual de partículas coloidales de oxi hidróxidos de Fe sobre su superficie que ocurren bajo valores de pH cercanos a 6 (Huminicki y Rimstidt, 2009). No sólo posicionados sobre pirita, las capas de alteración de hierro también se encontraron recubriendo 6 conglomerados de partículas de covelita ( $\text{CuS}$ ), que reafirmarían la generación de condiciones ácidas ( $\text{pH} < 4$ ) e incluso condiciones reductoras previo al desarrollo de condiciones oxidantes y al aumento en las condiciones de alcalinidad del medio requeridas para la formación de los precipitados coloidales de Fe. Tras la formación y recubrimiento de amplias zonas de la superficie de partículas de pirita y la potencial disminución de Fe en solución debido a esto, se generaría una nueva disminución de hierro en solución al igual que en el nivel 10-20 m, y por consecuencia una disminución en el potencial redox del nivel, dando paso a condiciones reductoras favorables para la formación de partículas de sulfuros de cobre, específicamente covelita ( $\text{CuS}$ ), que se registró sobre y en los bordes de dichas capas de alteración (Figuras 41 y 44). Así, tanto su disposición sobre los precipitados como su composición indicarían un evento posterior a la formación y precipitación de los oxihidróxidos de Fe.

La formación de fases de oxi hidróxidos de hierro sobre pirita e incluso cuarzo es un indicativo de las altas concentraciones de Fe en la solución intersticial en este nivel, así como de las condiciones cercanas a un  $\text{pH} = 6-7$ , óptimas para su precipitación en base a lo observado por Huminicki y Rimstidt (2009). Al encontrarse sobre partículas de cuarzo, la incorporación de partículas de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  fue evidenciada notoriamente, tanto por su composición como morfología al discrepar de la superficie de cuarzo, y sobre las que se observó la incorporación de azufre en base a los análisis químicos puntuales, señalando su potencial transformación a jarosita y la consecuente disminución en las condiciones de acidez necesarias para su formación ( $\text{pH} < 2.2$ ) en este punto de la superficie mineral (Figura 46). Así, es posible que la presencia de mayores concentraciones de sulfato allá ocurrido debido

al transporte de la solución lixivante hacia ese punto por el flujo proveniente de un punto superior en el terrero (a partir del nivel 30-40 m).

Este cambio podría ser evidenciado aún más por la adhesión de distintos organismos bacilares sobre las partículas coloidales de oxi hidróxidos de Fe, indicando que se encontrarían posicionados tras su transporte y tras la formación de las fases minerales secundarias, señalando así condiciones cercanas a un pH <3 nuevamente en estos puntos de la partícula. De igual forma, la presencia de los microorganismos, así como la formación de sulfuros de cobre discreparía de las condiciones neutras o ligeramente alcalinas antes indicadas, por lo que se podría señalar la potencial generación de microambientes en la muestra, además de la influencia del transporte de la solución lixivante a partir de puntos superiores a este punto del terrero. Dicha formación de microambientes se encontraría remarcados por la presencia y adhesión de los microorganismos mencionados y a la formación de los conglomerados de covelita (<400 mV), señalando la generación de microambientes con distinta composición y potencial redox e incluso condiciones de acidez, remarcando aquellos hallazgos realizados por Dockrey et al., (2014) para organismos acidófilos en una operación de biolixiviación en un terrero de prueba en la mina Antamina, Perú.

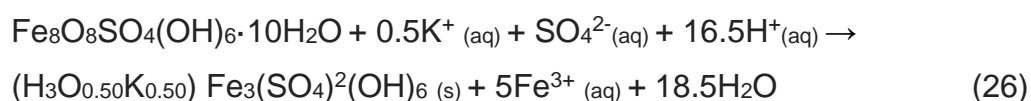
A pesar de encontrar condiciones globales cercanas a la neutralidad en esta operación (efluente del terrero pH=6), la generación de microambientes ocurrió sobre la superficie mineral de pirita y calcopirita colonizadas por comunidades microbianas acidófilas, ya que puntos de acidez fueron evidenciados por la formación de oxi hidroxisulfatos de hierro (pH<4) en dichas partículas. Por último, es importante mencionar como este nivel de profundidad permite observar como ocurre la evolución geoquímica del medio debido a los fenómenos de precipitación y transformación de distintas fases minerales a diferentes rangos de condiciones de acidez y de potencial redox, e incluso como es que los microorganismos se encuentran involucrados en este proceso.

En los siguientes 10 metros de profundidad (nivel 50-60 m), la formación de sulfuros secundarios de cobre no solo ocurrió de forma asociada a la superficie inmediata o continua de la calcopirita tras su oxidación como se observó en la Figura 119, ya que el encontrarse en otros puntos de las muestras como precipitados exhibiendo distintos hábitos cristalinos indicaron un origen distinto y el cambio de condiciones fisicoquímicas del medio que determinaría su formación (Figura 48). Así, a pesar de que el Cu puede mantenerse en solución a pH ácidos (<5), la formación de precipitados de sulfuros de cobre se encontraría relacionado a una disminución en el potencial redox de la solución de este nivel del terrero (<400 mV), que en conjunto con la generación y presencia de H<sub>2</sub>S favorecería su formación con base en las reacciones 20 a 23. Debido a que las condiciones de potencial redox, estarían determinadas en gran parte por las concentraciones de ion férrico y ferroso, la nula observación de precipitados de hierro (Fe (III)) podría señalar una disminución en su concentración en este punto, comportamiento que podría verse influenciado por la amplia formación de precipitados de Fe en el nivel anterior, determinando parcialmente las condiciones que observamos en este nivel.

Considerando las condiciones descritas, la formación de precipitados de azufre elemental en el siguiente nivel (60-70 m) indicaría la continua condición que se encuentra en el anterior nivel. La presencia de azufre en la solución del medio disponible para la formación de las partículas de covelita antes observadas, pero que en este caso se encontraría precipitando de manera única, encontrándolo en forma de precipitados laminares sobrepuestos entre si en la matriz de silicatos como ortoclasa y cuarzo, así como en orificios de la superficie de pirita que mostraron un desarrollo de clivaje considerablemente menos desarrollado que en niveles superiores del terrero, señal de un menor ataque químico y microbiano al encontrar una disminución de agentes oxidantes en este punto. Así, el azufre se encontraría precipitando por debajo de condiciones de Eh<400 y a pH<5, señalando nuevamente la prevalencia de condiciones reductoras que incluso podría haber impedido observar organismos bacterianos del genero *Acidithiobacillus* en el nivel 60 a 70 metros, así como únicamente en una sola partícula del nivel 50-60 m.

Las condiciones volverían a presentar un cambio en los últimos 10 metros del terrero, ya que en el nivel 70-80 m predominaría la generación de precipitados de hierro de variable composición, siendo las principales fases minerales identificadas. Así, este nivel se caracterizó por la formación de fases minerales secundarias entre las que se encontraron schwertmannita, jarosita y distintos precipitados de óxidos de hierro que incorporaron distintos cationes procedentes de la alteración de silicatos. En base a la identificación de las partículas de schwertmannita y jarosita, es posible señalar un cambio en las condiciones de acidez, ya que ambas fases presentan diferentes valores de pH para su formación. Así, la schwertmannita se ha señalado como la primera fase de Fe (III) que precipita en un rango de pH 2.5 a 4, en base a la reacción 25, mientras que el hallazgo de jarosita, indica una disminución en las condiciones de acidez del medio, ya que por debajo de 2.5-3 esta es la fase de Fe(III) dominante, principalmente entre un pH de 1 – 2.3.

La Schwertmannita es una fase que tiende a transformarse a fases más estables como jarosita o goethita en base a las condiciones geoquímicas bajo las que se encuentre, por lo que su transformación a jarosita ocurriría de acuerdo a la reacción 26 (Sánchez España, 2017).



La formación de jarosita no solo ocurriría a partir de la transformación de schwertmannita, al precipitar directamente del medio lixivante, siendo el comportamiento dominante en base a las amplias características morfológicas de los precipitados con esta composición. La composición de ambas fases pudo asociarse a los fenómenos de disolución y composición del medio en el nivel. En base a los análisis químicos puntuales, la detección de K en jarosita permitiría señalar la formación de jarosita potásica, así como hidronio jarosita en las que fueron incorporados o se encontraron adsorbidos sobre su estructura Al, Si, Mg, K,

Ti e incluso Cu. Para el caso de Al, ocurría el remplazamiento por  $\text{Fe}^{3+}$  en jarosita, mientras que para schwertmannita (4.14 Wt%) se encontraría adsorbido en su superficie en base a las observaciones realizadas por Sánchez-España et al., (2015) en partículas de esta misma fase en ambientes ácidos cercanos a un pH de 4.

La liberación de los elementos encontrados y que formaron parte de la estructura de jarosita y schwertmannita puede señalarse a partir de moscovita ((K, Al<sub>2</sub>)(Si, Al)<sub>4</sub>O<sub>10</sub>(OH)<sub>8</sub>), Illita ((K,H<sub>3</sub>O) Al<sub>2</sub>Si<sub>3</sub>AlO<sub>10</sub>(OH)<sub>2</sub>) y piropro de calcio ((Mg<sub>0.742</sub>Ca<sub>0.258</sub>)<sub>3</sub>(Al<sub>2</sub>(SiO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>), presentes en este nivel en base al análisis realizado por DRX. Además de ser la fuente de magnesio, la disolución del piropro de calcio permitiría la liberación de calcio al medio, que posteriormente se encontraría precipitando como yeso en forma de cristales de selenita sobre la superficie de ortoclasa en base a la reacción 27 (Figura 60), indicativo de las altas concentraciones de sulfato y reafirmando la alteración de los silicatos debido a las condiciones de acidez. Por otra parte, la presencia de Ti se atribuiría a la disolución de rutilo, por lo que este metal se encontraría siendo transportado desde otro punto del terrero incorporándose a la jarosita de las Figuras 59A -59D.



Cabe resaltar que las muestras examinadas en este nivel solo presentaron calcopirita, careciendo de otros sulfuros como fuente inmediata de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  para los precipitados de óxido e hidroxisulfatos de hierro, señalando así una mayor relevancia en el transporte y la acumulación de los productos de oxidación de sulfuros desde un nivel previo a esta zona del terrero. Así, las altas concentraciones de  $\text{Fe}^{3+}$  requeridas para la formación de las partículas de hidroxisulfatos de hierro conllevaría a un incremento en el Eh de la solución del medio, el cual podría nuevamente señalarse como superior a los 650 mV o superior a 800 mV debido a la pasivación de calcopirita por jarosita, comportamiento similar al nivel 10-20m. A pesar de que no se encontraron microorganismos en contacto directo con estas partículas como en el caso del nivel 10-20 m, las características morfológicas de schwertmannita y jarosita señalan un potencial origen o influencia de un medio

microbiano, o al menos en la intervención de estos de manera indirecta en base a las observaciones de Liao et al., 2009 y Sasaki (2004).

La presencia de ambas fases permite así señalar un aumento gradual en la acidez del medio, posiblemente influenciado por la acidez generada tras la formación de los diferentes precipitados de hidroxisulfatos de hierro (reacciones 25 y 26).

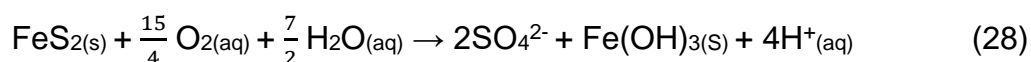
#### **4.3.2 Terrero 1440**

En el nivel 1440 ocurrió un comportamiento similar al terrero 1320 en cuanto a las condiciones favorables para el desarrollo de biopelícula y la adhesión de los microorganismos en los primeros metros a partir de los puntos de irrigación. La presencia de 13 a 14 estructuras de biopelícula posicionadas sobre superficies uniformes de pirita en el nivel 0-10 m señalaron nuevamente una preferente distribución de los microorganismos en la proximidad de la superficie, lo cual se encontraría nuevamente relacionado a una potencial preferente distribución en los primeros metros de los taludes por las condiciones de riego, ya sea por la generación de zonas de estancamiento de solución que permitieran un mayor tiempo de retención o debido a que la continua irrigación y transporte de nutrientes, en conjunto con los microorganismos permitiría su desarrollo. Al igual que en los primeros metros del anterior terrero, en ciertos puntos del nivel 0-10 metros se encontró la formación de sulfuros de cobre e incluso zinc (Figura 62), señalando una disminución en las condiciones oxidantes y con mayor notoriedad la posible formación de microambientes dentro de los niveles evaluados y que mantendrían condiciones distintas al resto del nivel. La presencia de Cu y Zn en solución que ocurre a pH <5, y previa a su precipitación sobre pirita sería más notable debido a su asociación con las estructuras de biopelícula, capturándolos a partir de la solución del medio (Figuras 99 -101).

La alteración de la pirita ocurrió de manera gradual en las zonas cercanas a las biopelículas, encontrando líneas de alteración (Figura 100), aunque la formación de clivaje y la alteración químico-mineralógica de su superficie no ocurrió en todos

los puntos donde se ubicaron, posiblemente debido a que su formación se encontraba en etapas tempranas o el proceso de oxidación de la superficie por acción microbiana comenzaba a ocurrir. El desarrollo de biopelícula indicaría condiciones ácidas desde el primer nivel de profundidad (pH<3) hasta el nivel 30-40 debido al posicionamiento de estructuras de EPS sobre partículas de pirita, con una morfología distinta debido al despliegue de estructuras laminares y tubulares de polímeros que se encontraron posicionadas sobre fracturas y bordes de las partículas, señalando como es que estos puntos son idóneos para la alteración de la superficie mineral (Figura 102).

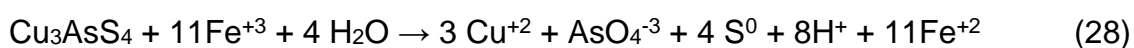
No obstante, a pesar de la presencia de este tipo de estructuras microbianas y la implicación de condiciones de acidez, la formación de clivaje en pirita ocurrió de manera puntual (Figuras 61C y 63), extensiones de superficies uniformes o que comenzaban a indicar líneas de alteración similares a aquellas cercanas a las biopelículas en los primeros 20 metros de profundidad. Lo anterior podría atribuirse a la falta de agentes oxidantes como Fe<sup>3+</sup> o debido a un cambio en las condiciones tras la formación de precipitados de sulfuros de Cu y sulfuros de Cu-Zn, como los que se observaron en los primeros metros (0-10 m). A una mayor profundidad, la alteración de la pirita presento un comportamiento distinto en el nivel 20-30 m, ya que ocurrió alteración morfológica y química mineralógica de la totalidad de las partículas. La amplia formación de clivaje se encontraría atribuida a las altas concentraciones de ion férrico necesario para que ocurra la disolución de la pirita, observando su disolución en un mismo plano al encontrar la generación de estructuras similares a mesetas, y triangulares correspondientes al plano (111); evidenciando un ambiente altamente oxidante. La superficie de pirita presento una distinta composición puntualmente, aumentando el porcentaje de S o bien el Fe y la incorporación de oxígeno en los puntos de mayor alteración, señalando su alteración y la potencial generación de óxidos u oxihidróxidos de Fe sobre su superficie en base a la reacción (28).





Las condiciones de acidez fueron señaladas con mayor notoriedad debido a las altas concentraciones de sulfato que desencadenarían en la precipitación de cristales de yeso tipo selenita sobre la misma superficie que se encontró oxidada, en costados o sobre las mismas partículas laminares y fibrilares de sulfuros de cobre. A diferencia de otras partículas no se registró la formación de precipitados o la incorporación de Si o Al en la superficie, por lo que es posible que la disolución de la superficie mineral comience a ocurrir o el flujo de solución no ha transportado hasta este momento a los elementos señalados hasta este punto. Los precipitados de sulfuros de cobre podrían encontrarse precipitando en una etapa posterior a la alteración de la pirita, la cual pudo haberse detenido debido a la disminución en las condiciones oxidantes (<400 mV), generando así la posibilidad para el desarrollo de los precipitados tal y como se mencionó para los distintos niveles en el anterior terrero.

Dichas condiciones seguirían ocurriendo en los siguientes 10 metros (30-40 m), encontrando las mismas características de alteración de pirita y precipitados de cobre sobre estas (Figura 67). Así, la prevalencia de condiciones oxidantes que dan paso a una potencial disminución en el potencial redox del medio ocurriría de igual forma en el último nivel de este terrero (40-50 m) donde se presentaría la disminución en las condiciones oxidantes exhibidas desde los 20 metros, al no encontrar el mismo grado de alteración morfológica en pirita y la formación de óxidos de Fe y Pb sobre su superficie que incorporaron también Cu (< 9.64 Wt%) y As (3.52 Wt %). La incorporación de arsénico así como cobre en los precipitados señalaría la previa disolución de enargita ( $\text{Cu}_3\text{AsS}_4$ ) en base a la reacción 29 (Dutrillac, 1972), y que se encontró únicamente en este nivel del terrero asociada con pirita al encontrarse en forma de inter crecimientos o inclusiones que se encontraban siendo liberadas. Así, en este punto del terrero parece no haberse generado las mismas condiciones de acidez debido a que no se encontró la formación de clivaje y otras características de alteración de la pirita, además de no observar la formación de cristales de yeso como en el nivel final del terrero anterior.



### 4.3.3 Terrero 1545

A diferencia de los anteriores taludes, en el terrero 1545 las características morfológicas y mineralógicas de las muestras examinadas señalaron una tendencia distinta con respecto a las condiciones geoquímicas del medio encontradas en los primeros niveles cercanos a la superficie del terrero 1320 e incluso el terrero 1440, al no encontrar presencia de microorganismos. Las condiciones oxidantes parecen encontrarse dominando en los primeros diez metros con respecto a la superficie del talud, ya que en el nivel 10-20 comienza la formación de precipitados de sulfuros metálicos de Pb-Cu y Cu con variable composición y hábitos cristalinos. Así, los precipitados cúbicos de Pb sobre calcopirita y el desarrollo de precipitados laminares de sulfuros de Pb-Cu sobre pirita, señalan la presencia de ambos elementos en la solución del medio, el cual puede haberse encontrado liberado a partir de partículas de galena (PbS), ya que para un yacimiento pórfido cuprífero se ha señalado como una de las fases minerales presentes (Berger et al., 2008). La presencia de galena no fue detectada anteriormente, siendo estos precipitados y los fragmentos cúbicos señalados en la Figura 73A posible partículas derivada de esta fase, aunque estos serían señalados como minerales secundarios.

El cobre del mismo nivel, la cual fue la principal fase de cobre encontrada, y que mostro de manera puntual el comienzo de desarrollo de clivaje como parte de su alteración. La alteración de calcopirita puede ocurrir debido a su oxidación por iones hidruro, además de ion férrico, por lo que es posible que debido a condiciones ácidas y a la generación de H<sub>2</sub>S por la oxidación de la pirita, esté ocurriendo la formación de sulfuros en un ambiente reductor. De igual forma, la formación de sulfuros metálicos de este tipo siguió ocurriendo en niveles de mayor profundidad. En este terrero la oxidación de fases minerales podría observarse como un proceso gradual con respecto a la profundidad en este terrero, ya que los cambios morfológicos más notables, indicativos de este fenómeno ocurren a partir de los 30 metros de profundidad al generar amplias zonas de clivaje en pirita y la disolución puntual y en forma acanalada de su superficie, indicando condiciones ácidas (pH <3). Cabe destacar que en el nivel 20-30, 30-40 m no se presentó la formación de

sulfuros metálicos como en los niveles anteriores. Finalmente, en el nivel 50-60 m se observaron partículas cúbicas de pirita en las que no se presentó el mismo desarrollo de clivaje que en el nivel anterior, la formación puntual de fracturas y oquedades generadas por la oxidación de la de la superficie de pirita, en la que se observó la presencia de biopelícula y que en conjunto con la formación de precipitados de Pb-Cu en otros puntos de la muestra, indicando una disminución en las condiciones de potencial redox, posiblemente asociado a la disminución de la concentración de ion férrico, ya que no se aprecia el mismo grado de alteración en pirita. Así, en el orificio de pirita donde se encontró biopelícula se habrían desarrollado previas condiciones ácidas y oxidantes para su formación, así como un ambiente propicio para la protección de los microorganismos ya que se encuentra biopelícula con un mayor desarrollo (Figura 103A -103D), al compararlo con aquellas estructuras laminares o tubulares en este mismo nivel (Figura 103E y 103F) y que se adhirieron a superficies con mayor uniformidad en los otros terreros. Ambas situaciones, así como la alteración gradual de pirita y que ocurrió de una manera parcial desde los primeros metros de profundidad señalarían la evolución en las distintas condiciones en el mismo nivel, y como el proceso de oxidación ocurre de manera gradual.

#### **4.3.4 Columnas de biolixiviación**

Al contrastar las características mineralógicas exhibidas en los terreros con aquellas de las columnas de biolixiviación, se observaron menores cambios y formaciones de minerales secundarios en los experimentos a nivel laboratorio, indicando una menor variabilidad en las condiciones de acidez, composición y potencial redox en estos últimos, aunque procesos geoquímicos similares continuaron ocurriendo. Las características morfológicas de los sulfuros sobre las que se encontró acción microbiana (pirita y calcopirita) fueron distintas en las columnas con respecto a ciertos puntos de los terreros, mostrando otros posibles escenarios para la oxidación de las partículas minerales influenciados por condiciones en las que se presentaría un potencial mayor control del medio.

A pesar de mantener distintas dimensiones, en ambos sistemas fue posible distinguir zonas de destacada oxidación y acción microbiana que se encontrarían asociados a una preferente distribución de microorganismos tras su irrigación en el mineral, influenciada por el flujo de solución. En las tres columnas evaluadas este comportamiento se encontró en la sección final (2-3 m), señalando una potencial y preferente acumulación o tiempo de residencia de la solución lixivante en la zona más alejada del punto de irrigación. Para la columna 4, la formación de amplias zonas de pits hexagonales, en comparación a la formación de clivaje fracturando las partículas de pirita en distintos puntos de la superficie muestran a la acción microbiana como un factor importante dentro del proceso de transformación de la pirita con respecto a puntos superiores, y él porque su adhesión y consecuente acción es importante. Incluso, dicha formación no fue observada de la misma manera en los terreros, posiblemente debido a la retención en este punto de la solución y/o un mayor número de microorganismos que se encontraron oxidando la pirita. Lo anterior podría llegar a inferirse debido a que en experimentos a nivel laboratorio donde partículas de pirita se encuentran en constante contacto con cultivos microbianos durante prolongados periodos de tiempo generan este tipo de alteraciones hexagonales (Pisapia et al., 2008).

En la columna 1 los cambios más notables ocurrieron nuevamente en la sección final sobre pirita, observando distintos grados de alteración al encontrar desarrollo de canales y fracturas por la disolución de la superficie y formaciones de clivaje con un patrón octaédrico sobre los cuales se encontraron capas de alteración de óxidos de hierro (Figura 83), evidenciando las altas concentraciones de ion férrico y condiciones oxidantes en este punto, acompañadas por la presencia de microorganismos y biopelícula. A pesar de no encontrar microorganismos adheridos de forma individual a la superficie de pirita con desarrollo de clivaje, si fue posible identificar la presencia de biopelícula y distintos filamentos de EPS sobre la superficie alterada de pirita y sobre la que se encontraban partículas coloidales de óxidos de hierro (Figura 105-106). Debido a que los polímeros se encontraron también recubiertos por dichas partículas podríamos señalar que estos se encontraban posicionados anteriormente o durante el proceso de oxidación de la

pirita. Las estructuras de EPS y biopelícula en estado de madurez en este mismo punto indicaría condiciones hidrodinámicas favorables para su oportuno desarrollo, al igual que en el nivel 30-40 m del terrero 1320 y en los primeros diez metros en el terrero 1440. Además de las anteriores formaciones y biomineralización que exhiben, la presencia de organismos bacilares de 1  $\mu\text{m}$  de longitud se identificó sobre cuarzo adyacente a las zonas de oxidación mencionadas.

Las condiciones oxidantes se verían señaladas nuevamente por la alteración morfológica de la superficie de calcopirita (Figura 84), generando pits circulares indicativos del proceso de oxidación y consecuente disolución en presencia de organismos acidófilos. En base a las observaciones realizadas por Zhao et al., 2013, este tipo de alteración ocurriría en aquel medio donde se ha encontrado la acción de los microorganismos sobre las partículas de calcopirita por debajo de un  $\text{pH}=2.6$  y valores de potencial redox menores a 650 mV, ya que no se encontrarían capas pasivante de oxi hidróxidos de hierro sobre calcopirita. Incluso, las condiciones ácidas señaladas se corroborarían tras la disolución de la matriz de silicatos conformada por moscovita, cuarzo, clinocloro y ortoclasa para este nivel, ya que se encuentra la incorporación de Al y Si en las capas de alteración de pirita y partículas de sílice sobre calcopirita.

La amplia generación de puntos de clivaje en ambas secciones de la columna de biolixiviación 4 señalo la prevalencia de condiciones oxidantes, en la que se observo una gran ingerencia de los microorganismos en la alteración química y morfológica de la superficie de pirita, señalando la generación de un ambiente ácido debido a la liberación de  $\text{Fe(II)}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  tras su oxidación. Lo anterior contrasta con la columna 2, ya que en la sección final de la columna se encuentran precipitados de sulfuros de cobre, indicativo de un cambio en las condiciones del medio al evolucionar a condiciones reductoras, así como la presencia de  $\text{H}_2\text{S}$  y de cobre en solución a partir de la oxidación de calcopirita u otros sulfuros secundarios, lo que permitiría su formación, impidiendo que el cobre emigre totalmente de la columna, representando un detrimento en su recuperación.

Las características mineralógicas de la sección final de la columna 2 indicaron la evolución de las condiciones geoquímicas del medio de forma similar a lo ocurrido en los niveles 10-20 m del terrero 1320, y 20-30m del terrero 1440 al presentar la precipitación de sulfuros de cobre tipo covelita (CuS). En un principio la alteración parcial de la superficie de pirita genero zonas de desgaste y fracturas, además de pits hexagonales que señalaron la acción bacteriana sobre la superficie. Tras la oxidación de pirita se presentaría una disminución en el potencial redox, permitiendo la precipitación de cobre en solución formando covelita sobre los pits de alteración y zonas cercanas a los bordes de las partículas (Figura 85). Esta formación señalaría las altas concentraciones de Cu (CuSO<sub>4</sub>) y la generación de un ambiente reductor (<400-500 mV) en el que se encontraría un pH < 4; condiciones en el que este mismo tipo de precipitados con hábito cristalino lenticular se ha encontrado en otros medios con la presencia de microorganismos. Condiciones exhibidas en lagos de Cueva de la Mora en Huelva, España, perteneciente a la provincia metalogénica del Cinturón Pirítico Ibérico donde se ha llevado a cabo extracción mineral y se han encontrado distintos sulfuros biogénicos debido a los diferentes controles biogeoquímicos ejercidos por diferentes familias de organismos microbianos (Diez-Ercilla et al., 2014).

Diez-Ercilla et al., (2014) menciona como es que las condiciones hidrodinámicas y geoquímicas permiten la formación de este y otros precipitados con morfologías lenticulares, tabulares, o en forma de filamentos a 12 metros de profundidad en Cueva de la Mora. Así, los distintos hábitos cristalinos de covelita en los terreros podrían responder a determinadas condiciones de nucleación y cristalización en el medio que se encuentren, siendo para el caso de las columnas un mayor tiempo de retención de la solución y un flujo potencialmente no turbulento. Nuevamente, la generación de sulfuros secundarios de cobre señala la previa liberación de cobre a partir de calcopirita en puntos superiores de la columna y terreros a donde estos fueron identificados. Su retención en posteriores puntos se encontraría relacionada a una modificación en las condiciones del medio, de forma puntual o global al considerar las condiciones del nivel como homogéneas. Sin embargo, como ya se señaló, la presencia de microambientes, tanto en cuestiones

de acidez como de potencial redox e incluso composición estarían ocurriendo en ambos medios estudiados, siendo dichos cambios y la evolución geoquímica en los terreros un proceso con mayor complejidad. No obstante, se pudieron señalar distintas tendencias a lo largo de los niveles, encontrando la generación de sulfuros metálicos, en especial cobre, en los niveles intermedios de los terreros 1320 y 1440, al mantener un ambiente reductor, donde las concentraciones de cobre, sulfato y ácido sulfhídrico propiciarían su formación en contraste en los primeros metros de los terreros (0-30m para el terrero 1320, 0-20 m terrero 1440 donde prevalecieron condiciones oxidantes. No obstante, es importante destacar que, a pesar de lo anterior, en los mismos niveles se encontró la formación de microambientes dando paso a la generación de nuevas o diferentes condiciones.

La amplia alteración de pirita y calcopirita observada en las secciones finales de las columnas es indicativa de una preferente acción de microorganismos con respecto a la sección superior a estas y que podría relacionarse con la preferente distribución de los microorganismos en esta sección. Este escenario resemblance los resultados reportados por Govender et al., (2017) tras realizar distintas pruebas de biolixiviación en columnas con cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Govender et al., (2017) analizó la distribución de microorganismos en la PLS y aquellos asociados a las partículas minerales en mineral de baja ley de cobre proveniente de Escondida, Chile; mostrando un incremento en el número de organismos en las secciones más alejadas al punto de irrigación para ambos casos. El material empleado por los autores encontraría similitud con el de este estudio, ya que presenta cuarzo (44.8 Wt%), moscovita (28.6 % Wt) y pirita (4 Wt%) como los principales constituyentes, mientras que mantuvo un contenido de 0.46% Cu, con especies como calcopirita, covelita, calcoita, bornita, enargita.

A pesar de que en este estudio no se determinó la distribución de microorganismos para ambos medios (PLS y partículas minerales), las características mineralógicas y morfológicas de la superficie mineral, los análisis por DRX y la asociación de microorganismos y biopelícula señalan una preferente y



similar acción de los microorganismos en las secciones finales de las columnas, el cual se encontraría relacionado a la configuración de estas y a la acumulación o preferencial distribución de los microorganismos tal como se mencionaba con anterioridad. Una preferente distribución en las secciones finales se señalaría con mayor notoriedad en la columna 4 debido a la extensa alteración superficial de partículas de pirita señalada con anterioridad (Figura 80 y 81), y sobre la que también se encontraron microorganismos.

Además, cabe destacar la potencial influencia que la solución de riego estaría ejerciendo en las columnas, ya que el origen de los microorganismos sería distinto; para la columna 4 se utilizó solución de colas mientras que las restantes columnas fueron irrigadas con solución obtenida en un biorreactor. El uso de solución de colas o microorganismos que ya han estado en contacto con el mineral podría implicar una mayor y previa adaptación de los microorganismos, influyendo en su proliferación y en consecuencia en la oxidación y disolución de las partículas minerales, en este caso manifestándose en la amplia alteración superficial de pirita y calcopirita para la sección final y media de la columna 4, específicamente aquellas formaciones de pits hexagonales que se han relacionado con la actuación directa de los microorganismos y que no ocurrió de la misma forma en las otras columnas. Para determinar con mayor exactitud como es que se comportan los microorganismos es necesario analizar con mayor detalle los cambios en las condiciones de la solución durante y tras su contacto con el mineral.

Las observaciones por MEB señalan que a pesar de lo anterior estos no se encontraron uniformemente distribuidos o en amplias zonas de la superficie para las tres columnas, por lo que es posible que la mayoría de los organismos se encuentren en la solución intersticial del medio o estos se hayan desprendido gradualmente tras ocurrir la oxidación de las partículas de pirita. Como lo menciona Govender et al., (2017) el comportamiento de los microorganismos se encontrará en función de la configuración del experimento, además de los microorganismos y mineral empleado.

Además, dichos autores también mencionan que aquellos microorganismos asociados al mineral no se encontrarían distribuidos uniformemente tal como ocurre en las columnas evaluadas y los terreros de biolixiviación (Fagan et al., 2016; Govender et al., 2017).

. Los cambios en las condiciones geoquímicas del medio, así como de los fenómenos de alteración más importantes de sulfuros se encontró relacionada a la adhesión y formación de biopelícula de microorganismos ferro y sulfo oxidantes, e incluso es posible que organismos sulfato reductores se encontraran influyendo en las condiciones aquí observadas. Por lo que es importante señalar su importancia en los procesos de alteración de pirita, calcopirita e incluso a la formación de fases minerales secundarias, debido a la generación de micro ambientes o por su potencial involucramiento en su precipitación (biomineralización).

A través de la exploración de la superficie mineral se identificaron distintas clases de microorganismos con base en sus características morfológicas, encontrando organismos bacilares de entre 0.3 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud y cocoides con 1  $\mu\text{m}$  de diámetro; interaccionando directamente con la superficie de calcopirita, covelita, estromeyerita, pirita e incluso sobre la superficie de la matriz de silicatos. Ya sea posicionados sobre la superficie de forma individual o como poblaciones mixtas, los organismos aquí encontrados interactúan entre sí dentro de los terreros, observando la convivencia de distintos grupos de bacilos y cocos que incluso se han encontrado metabólicamente activos, al encontrar signos de su replicación en el nivel 10-20m tanto para la superficie de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) como calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ). No en todas las partículas ni su superficie disponible se encontraron los mismos microorganismos, observando así una adhesión preferencial y cierta discrepancia por parte de los microorganismos a pesar de la cercanía que ciertas fases de sulfuros presentaron. Así, sobre calcopirita solamente se posicionaron organismos bacilares de 0.3, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{m}$  de longitud que se encontraron preferentemente adheridos a las capas de oxihidróxidos de hierro formados sobre su superficie, así como a zonas de alteración morfológica y química que mantenían indicios de la formación de fases minerales secundarias. En pirita se ubicaron tanto organismos

bacilares de 1, 1.5 y 4  $\mu\text{m}$ , como organismos cocoides en concavidades de la superficie, productos de alteración, zonas de clivaje y como parte de distintas formaciones de biopelícula. Mientras que en estromeyerita y sobre silicato se ubicaron organismos cocoides y bacilos de 0.5 y 2  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Así, la distribución de los organismos podría ser atribuido a la presencia de sitios óptimos para la oxidación y toma de elementos a partir de la superficie mineral, tal y como se observó durante su adhesión en puntos de fractura en capas de alteración, bordes de las partículas y *pits*.

En calcopirita y silicatos, los microorganismos bacilares se encontraron principalmente agrupados formando micro colonias de una sola especie y/o conviviendo con una o dos diferentes clases de bacilos en la misma zona, aunque sin registrar el contacto físico entre cada una de las especies para el caso de calcopirita. Caso contrario a aquel observado para la superficie de pirita, donde se pudo encontrar la convivencia y formación de colonias mixtas de microorganismos bacilares y cocoides en concavidades de las partículas (Figura 93).

La exploración de la superficie de sulfuros y silicatos permitió encontrar diferentes etapas de asociación de los microorganismos, observando células microbianas aisladas, siguiendo con la generación de estructuras de polímeros y el desarrollo de biopelícula. Desplegando distintas características morfológicas, tanto en terreros como en columnas, las características estructurales de las biopelículas se encontraron atribuidas al estar integrados por posiblemente distintos microorganismos o debido a las condiciones del medio donde se encuentran posicionados. Así, la pirita representó el sustrato ideal para su desarrollo, ya que fue en este sulfuro donde se ubicaron la mayoría de estructuras e incluso aquellas que señalaron como en estado de madurez.

Exhibiendo estructuras en forma de monocapas y una distribución heterogénea sobre la superficie de pirita en el nivel 0-10m del terrero 1440 se observó el mayor número de biopelículas sobre una misma partícula en los terreros, mientras que tan solo fue comparable con la sección final de la columna 4, donde otras 10 formaciones de biopelícula se presentaron como estructuras redondeadas

con una superficie lisa y/o rugosa cerca a los bordes de pirita alterada morfológica y químicamente. Además, en esta se observaría la presencia de una estructura de biopelícula distinta, manteniendo un aspecto diseminado que se asemejaría a las biopelículas generadas por archeas de acuerdo a observaciones señaladas en la literatura (Orell, et al., 2013); por lo que es posible que el *Sulfobacillus sp.* sea el responsable de su generación. Así, se señalan las diferencias morfológicas que se atribuirán a la especie de los organismos generadores de estas matrices poliméricas y cómo distintas clases de microorganismos estarían desarrollando biopelícula a pesar de encontrarse en el mismo punto de la superficie a pocos micrómetros de distancia (Figura 107). El desarrollo de biopelícula en forma de monocapas sólo ocurrió en este nivel de profundidad, siendo la única partícula que le ofrecía puntos de la superficie con un relieve uniforme y donde además se señala una de las observaciones posiblemente más importantes, al encontrar directamente a microorganismos bacilares de 1  $\mu\text{m}$  embebidos en la estructura de la biopelícula.

El contacto y adhesión de los microorganismos sobre sulfuros metálicos e incluso silicatos, mostró una marcada presencia en los primeros 20 metros de profundidad en los terreros 1320 y 1440, ya que fue en este intervalo donde se registró un mayor número de microorganismos en contacto con la superficie mineral. Basándose en la observación de las superficies de interés por MEB, el mayor número de microorganismos se encontró sobre partículas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) en el nivel 10-20m, al encontrarse micro colonias integradas hasta por 95 organismos que se distribuyeron heterogéneamente por diferentes puntos de la superficie disponible; mientras que sobre pirita ( $\text{FeS}_2$ ) se encontró la formación de comunidades mixtas de bacilos y cocos, así como organismos cocoides aislados. Al mismo tiempo, fue en los primeros 10 metros (0-10m) del terrero 1440 donde se observó la proliferación de diversas estructuras de biopelícula posicionadas sobre pirita, encontrando un recubrimiento heterogéneo y morfologías asimétricas de diversas monocapas sobre zonas de la superficie con un relieve uniforme y cercanas a bordes de la partícula. Tras los siguientes 20 metros de profundidad, se presentó una clara disminución en el número de organismos identificados sobre las mismas fases minerales en los restantes niveles de profundidad (20 – 50m), ya que

no fueron localizados o se encontraron agrupaciones de solamente 2 o hasta 6 microorganismos.

La preferente colonización y desarrollo de biopelícula en los primeros metros a partir de los puntos de irrigación de los taludes podría encontrarse relacionada al flujo preferencial de la solución irrigada y/o a su retención en los puntos más cercanos a la superficie de los taludes. La formación de zonas saturadas representaría un periodo de contacto más prolongado entre la superficie mineral, la solución (refinado) y los microorganismos que son transportados en esta a través de los primeros metros de los taludes, resultando en la preferente colonización de la superficie mineral observada en los primeros 20 metros en este trabajo, así como la disminución en el número de organismos a mayores profundidades en los terreros, posiblemente atribuido a la generación de zonas de flujo preferencial en los terreros. Contrariamente, en las columnas de biolixiviación los puntos más alejados del punto de irrigación (secciones finales) desarrollaron una intensa actividad microbiana, al exhibir el desarrollo de biopelícula, la alteración morfológica de grandes zonas de la superficie de pirita, así como la formación de minerales secundarios. Este preferente desarrollo de cambios morfológicos y químico mineralógicos en determinadas zonas de las columnas podría estar implicando la formación de zonas de solución estancada, permitiendo la acumulación preferencial de microorganismos en la solución intersticial o en la superficie mineral desencadenando en los cambios aquí señalados. Así posiblemente podríamos mencionar una amplia similitud de las secciones finales de las columnas con el nivel 10-20 m de los terreros.

Respecto a la interacción microbiana con la superficie mineral es importante considerar las dimensiones de los terreros, así como las características del mineral. A nivel laboratorio la interacción bacteriana con partículas minerales ha sido ampliamente estudiada, encontrando estudios sobre los porcentajes de adhesión a distintas fases minerales para diferentes familias de microorganismos, algunas de ellas presentes en los terreros de biolixiviación aquí señalados. Sin olvidar que los consorcios utilizados en estos estudios difieren en las condiciones de adaptación de

los microorganismos que se han encontrado en La Caridad, la información reportada puede tomarse como referencia para comprender la naturaleza y el grado en que los microorganismos presentes en un medio lixivante interactúan con las fases sólidas. Es así que África et al., (2013) reporta los diferentes porcentajes de adhesión para *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum* en concentrados de calcopirita (29.8% Cu, 25.9% Fe y 31.7% S), pirita (0.197% Cu, 26.6% Fe y 14.8% S), y en mineral de baja ley de cobre ( $\text{FeS}_2$  4.0%;  $\text{CuFeS}_2$  0.5%;  $\text{SiO}_2$ , 44.8%; y  $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$ , 28.6% en peso).

Mediante experimentación en columnas de biolixiviación (19 cm de alto por 2.5 cm de diámetro) con los tres tipos de muestras minerales; *Acidithiobacillus ferrooxidans* reportó una adhesión del 74% y 63% en el concentrado de pirita y calcopirita, respectivamente; mientras que hubo una disminución en su adhesión en el mineral de baja ley, con un 25% del total de las bacterias presentes en el medio. Para el caso de *Leptospirillum ferriphilum*, la adhesión fue de un 79% y 58% para los mismos concentrados minerales, disminuyendo también para el mineral de baja ley de calcopirita; reportando una adhesión del 50%. Así, distintos microorganismos en despliegan bajos grados de adhesión que los microorganismos pueden presentar en una matriz mineral compleja como lo es el mineral de baja ley de cobre, incluso cuando las dimensiones de la columna evaluada fueron de menor proporción a las de este estudio. Esta información contribuye a explicar la dificultad presentada en este estudio para encontrar y observar las diferentes agrupaciones y desarrollo de biopelícula sobre las partículas de sulfuros metálicos a través de diferentes profundidades de los terreros e incluso las columnas de biolixiviación, y él porque tal parece existir una menor presencia de bacterias asociadas a la superficie mineral que aquellas en la solución intersticial del medio. Cabe destacar que, a diferencia de otros estudios, la identificación y observación de los microorganismos se realizó sin ningún método de tinción celular que permitiera su localización rápidamente, basando su observación en una minuciosa búsqueda sobre las partículas de sulfuros metálicos y otras fases minerales cercanas, donde pudieran presentarse sitios para su adhesión.

## Conclusiones

Las características mineralógicas del material que compone los terreros de biolixiviación fue definida mediante diferentes técnicas de caracterización mineralógica, que en conjunto con la preparación especial de muestras para especímenes microbiológicos permitió determinar las características y relaciones exhibidas entre la superficie mineral con colonias de microorganismos en la operación de biolixiviación en La Caridad y las potenciales condiciones fisicoquímicas en las que se encontraron sucediendo.

La caracterización mineralógica de las muestras directamente extraídas de los depósitos de terreros permitió identificar a la pirita y calcopirita como las principales fases de sulfuros que constituían el material, encontrando un amplio rango de características morfológicas que estas e incluso material de ganga podrían presentar ya que no recibieron ninguna preparación previa a su estudio por MEB. El polimorfismo de distintas partículas de calcopirita, calcocita y covelita, así como desarrollo de clivaje y pits en pirita fue potencialmente atribuido a las condiciones de acidez del medio en las que se encontraron, y los cambios en las condiciones oxidantes y reductoras a través de distintas profundidades, que se encontraron influenciados por un cambio en la composición del medio. Además, el proceso de oxidación microbiana pudo ser observado tanto en partículas de pirita, como calcopirita, covelita y estromeyerita, evidenciado debido a cambios en su composición química, el desarrollo de fases minerales secundarias y de forma notable por su adhesión, formación de EPS e incluso el desarrollo de micro colonias sobre o en puntos inmediatos a donde se estaban llevando dichos procesos. La precipitación de cobre en un principio liberado para posteriormente formar nuevas fases sólidas señaló la heterogeneidad de las condiciones fisicoquímicas en los terreros, indicando la formación de ambientes reductores ( $<400$  mV) ácidos, representando una problemática para el proceso, ya que cierto porcentaje de cobre se encuentra siendo retenido posterior a su liberación.



El procedimiento de fijación, deshidratación y punto crítico de secado para especímenes biológicos, mostro resultados efectivos ya que las condiciones de interacción, la estructura tridimensional de los microorganismos y EPS en los distintos terreros y columnas de biolixiviación fue preservada. Derivando en su observación durante diferentes etapas del proceso de adhesión y desarrollo de biopelícula sobre la superficie mineral de forma *in situ*, al detectar la interacción con partículas de sulfuros metálicos y silicatos en un ambiente de biolixiviación a gran escala, en donde no se intervino directamente en el proceso de adhesión y colonización de las superficies. Presentes de forma individual, en micro colonias o biopelícula la adhesión de los microorganismos mostro ser específica para calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), covelita ( $\text{CuS}$ ), estromeyerita ((Cu, Ag) S), pirita ( $\text{FeS}_2$ ) e incluso determinadas partículas de silicatos. La interacción de los microorganismos ocurrió sobre zonas de clivaje y otras alteraciones morfológicas, cercana a bordes de partículas, así como en distintos productos de alteración desarrollados en la superficie de los sulfuros mencionados (oxihidróxidos de hierro y jarosita), señalando la estrecha relación que guarda el proceso de transformación mineral con la presencia y acción de los microorganismos y condiciones de acides al tomar como referencia las condiciones de formación de jarosita ( $\text{pH} < 3$ ).

La identificación de minerales secundarios como oxihidróxidos e hidroxisulfatos de hierro asociados sobre la matriz de silicatos y la superficie de sulfuros de cobre y pirita, fue indicativo de la actividad microbiana sobre las diferentes partículas minerales donde se observó su desarrollo, tanto por las condiciones requeridas para su desarrollo ( $\text{pH} < 4$ ), la morfología característica exhibida por la acción localizada de los organismos procariontes previamente identificados y las variables condiciones de acidez en la superficie mineral que estos promueven, tanto por su colonización como la generación de EPS y biopelícula.

La formación de jarosita sobre la superficie de calcopirita representó la principal problemática con respecto a la potencial pasivación de las superficies de interés en el proceso de biolixiviación. Aunque es importante señalar que esto solo ocurrió de forma puntual en aquellos niveles que señalaron altas concentraciones de ion férrico y por lo tanto altas condiciones oxidantes ( $E_h > 650 \text{ mV vs SHE}$ ), así

como altas concentraciones de sulfato y pH menores a 3. Las capas de alteración que estarían impidiendo el contacto de los agentes oxidantes se encuentran desprendiéndose tras su fractura y la continua acción de los organismos sulfo y ferro oxidantes presentes en su superficie. Además, debido a que no se encontró la acumulación de precipitados de azufre sobre la superficie de sulfuros de cobre y pirita, la presencia de un consorcio de microorganismos microbianos pareciera ser efectivo al evitar su acumulación, ya que estos solo se presentaron sobre la matriz de silicatos y sobre concavidades en la superficie de pirita en el nivel 40-50 m y 60-70m del terrero 1320.

A pesar de que la tipificación de los microorganismos sobre las muestras minerales se encontró más allá del alcance de este trabajo, la exploración por MEB permitió detectar diferentes clases de microorganismos basados en sus características morfológicas. Así, se encontraron cinco tipos de organismos bacilares que mantuvieron dimensiones entre los 0.3 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud y organismos cocoides de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, estos últimos sin haber sido previamente identificados en la tipificación de los organismos acidófilos, ya que aquellos reportados previamente son organismos de morfología bacilar.

La generación de biopelícula encontró distintas características morfológicas atribuidas tanto a su formación por distintos microorganismos, como a las condiciones del medio y al relieve de la superficie. Ocupando zonas cercanas al borde de las partículas, y recubriendo de forma heterogénea principalmente la superficie de pirita, se pudo observar como organismos bacilares se encontraron embebidos en diferentes puntos de la estructura de la biopelícula, confirmando que estos integran parte de su estructura. La integración de los resultados obtenidos en las columnas de biolixiviación permitió observar una mayor confluencia de estructuras poliméricas y biopelícula a pocos micrómetros de distancia en las secciones finales de las columnas 1 y 4, en las que se asociaron directamente con partículas de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) que exhibieron una mayor alteración química mineralógica y morfológica localizada en comparación a otras columnas o incluso determinados niveles de profundidad en los terreros, señalando la influencia en el régimen

hidrodinámico y la potencial retención de los microorganismos y solución lixiviante cerca o sobre partículas de los niveles 10-20 m, 30-40 m del terrero 1320 y de 0-10m para el terrero 1440.

La preferente colonización y desarrollo de biopelícula en los primeros metros a partir de los puntos de irrigación de los taludes podría atribuirse al flujo preferencial de la solución y/o a su retención en los puntos más cercanos a la superficie. Lo anterior representaría un mayor periodo de contacto de la solución y potencialmente de los microorganismos que son transportados en esta, resultando en la colonización de la superficie mineral por un mayor número de células microbianas debido a un periodo de contacto más prolongado. Mientras que la disminución en el número de organismos observados a mayores profundidades podría atribuirse a la generación de zonas de flujo preferencial en los terreros, así como a la disminución en las condiciones oxidantes ( $<400$  mV), o incluso debido a la generación de zonas con un pH cercano al neutro.

La contribución de esta investigación se basa en la observación y descripción de colonias y organismos microbianos en un ambiente de biolixiviación a gran escala, en este caso en depósitos de terreros, donde las partículas de sulfuros encontraron distintas características morfológicas y química mineralógicas en una matriz mineral compleja y por lo tanto los microorganismos se encontraron adheridos a distintos puntos de la superficie mineral. Encontrando microorganismos que, tras ser inoculados, colonizaron y entraron en contacto deliberadamente con partículas de sulfuros metálicos, silicatos y oxi hidróxidos de hierro a través de su recorrido en los diferentes depósitos minerales, indicando condiciones representativas de una operación a nivel industrial, así como condiciones cercanas en un medio natural por las características ya señaladas.

Las condiciones de acidez, potencial redox y potencial composición inferidas a partir de la oxidación y precipitación de los distintos oxi hidróxidos, hidroxisulfatos así como sulfuros de cobre y otras fases secundarias detectadas en los terreros y columnas señalaron distintas condiciones geoquímicas a través de las profundidades evaluadas, señalando la generación de microambientes y como ocurre la evolución geoquímica del medio incluso para un mismo nivel, presentando

cambios en el potencial redox y condiciones de acidez. A pesar de lo anterior, fue posible señalar una preferente generación de condiciones oxidantes en los primeros metros de los taludes con respecto a la superficie, encontrando la generación de ambientes reductores en los niveles intermedios o centrales debido a la formación de un mayor número de partículas de sulfuros de cobre a mayores profundidades, no obstante, debido a la continua irrigación y transporte de agentes oxidantes, así como sulfato y otros compuestos fue posible observar como uno de los principales factores que estarían influyendo es la heterogeneidad del medio, así como la presencia de microorganismos y el flujo de solución lo cual influirá su transporte así como de distintos compuestos a través de los terreros así como en columnas.

Para el conocimiento de los autores, este tipo de información no ha sido adquirida previamente para este tipo de condiciones; por lo que los hallazgos aquí reportados sobre las comunidades microbianas, así como su relación con los efectos de meteorización o transformación química de partículas de sulfuros minerales contribuyen a continuar comprendiendo el proceso de biolixiviación de forma *in situ*, lo cual desencadene en una eficiente colonización de la superficie mineral y consecuentemente en una mejora en la eficiencia del proceso. No obstante, es importante remarcar la necesidad de ampliar la caracterización microbiológica y químico mineralógica de las superficies aquí señaladas mediante técnicas de caracterización más avanzadas, que permitan identificar con precisión las características en las que se encuentran diversos compuestos minerales formados o colonizados por los microorganismos, así como determinar las condiciones geoquímicas globales del terrero y columnas, debido a la imposibilidad de realizar determinaciones puntuales en el momento de la obtención de las muestras en los taludes y pruebas de laboratorio evaluadas.

## Perspectivas

Los resultados de este trabajo muestran el amplio campo de oportunidad para continuar estudiando y profundizando en el proceso de biolixiviación que ocurre en depósitos de terreros, así como entender que factores pueden estar determinando el comportamiento de los microorganismos y la eficacia que las operaciones pueden llegar o no a exhibir.

Además de los factores mineralógicos y microbiológicos que se han abordado en este trabajo, es importante señalar la necesidad de complementar esta información con técnicas complementarias o más avanzadas, así como con el estudio y análisis de las condiciones geoquímicas a través de los terreros, e incluso columnas de biolixiviación, lo que permitiría confirmar o determinar con precisión las condiciones señaladas a partir de las características mineralógicas observadas y elucidar con mayor precisión los procesos a diferentes profundidades, o a nivel global de la operación. Así, dentro de los parámetros a considerar se encontraría el pH, potencial redox, así como concentración de oxígeno, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), temperatura y composición elemental de la solución lixivante, durante y/o tras la operación.

Una misma oportunidad de trabajo podría señalarse para la evaluación y tipificación de los organismos a través del terrero, tanto para determinar que familia se encontraría en las distintas profundidades, así como identificar potenciales microorganismos sulfato reductores o reductores de hierro que pudieran estarse encontrando en aquellos puntos donde las condiciones reductoras prevalecieron o que surgieron durante o tras otros procesos de alteración de sulfuros. De igual forma, la tipificación de los microorganismos adheridos a la superficie mineral y no sólo aquellos en la solución intersticial del medio podrían ser determinados por técnicas como hibridación de fluorescencia in situ (FISH, por sus siglas en inglés) (Florian, 2012; Dockrey et al., 2014).

En base a los productos minerales secundarios encontrados, y la formación de sulfuros es importante considerar opciones para mejorar el proceso de oxidación de calcopirita y los otros sulfuros de cobre, por lo que la realización de distintas pruebas a nivel laboratorio o en campo con distintas agrupaciones de microorganismos nativos, así como distintos regímenes de riego que permitan la proliferación de los organismos puede representar una de las potenciales opciones para el mejoramiento de este tipo de operación, teniendo en consideración la importancia de la adhesión y contacto de los microorganismos con la superficie mineral.

Es así como la caracterización geoquímica, evaluar la distribución de flujo a través de los terreros, así como el realizar un mayor número de pruebas a nivel laboratorio contemplando el uso de los distintos microorganismos nativos de “La Caridad” complementarían el entendimiento no solo para esta operación, si no del mismo comportamiento e interrelación de los microorganismos en un medio a gran escala, y cercano a la interacción que presentarían bajo condiciones naturales.

La complementación de la caracterización mineralógica de las muestras minerales obtenidas para ambas operaciones pueden complementarse mediante otras técnicas de caracterización como Espectroscopia Raman, MEB acoplada a un sistema Raman, o incluso mediante técnicas más avanzadas basadas en el uso de aceleradores de partículas como: Espectroscopia de Absorción de Rayos X (XAS, por sus siglas en inglés) o Espectroscopia de Absorción de estructura fina de Rayos X (EXAFS, por sus siglas en inglés) (Dockrey et al., 2014). Las cuales permitan realizar análisis a nivel puntual en las superficies alteradas y estructuras minerales secundarias justo donde se encuentren los microorganismos sin que la muestra sea destruida, identificando con precisión el tipo de fase mineral asociada.

## Referencias bibliográficas

- Africa, C., Hille, R. P. Van, Sand, W., y Harrison, S. T. L. (2013). Investigation and in situ visualisation of interfacial interactions of thermophilic microorganisms with metal-sulphides in a simulated heap environment. *Minerals Engineering*, 48, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.09.011>
- Africa, C. J., Van Hille, R. P., y Harrison, S. T. L. (2013). Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum* cultured under varying conditions to pyrite, chalcopyrite, low-grade ore and quartz in a packed column reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1317–1324. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3939-x>
- Akcil, A., Ciftci, H., y 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. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2006.10.016>
- Berger, B. R., Ayuso, R. a, Wynn, J. C., y Seal, R. R. (2008). Preliminary model of porphyry copper deposits. *Open-File Report - U. S. Geological Survey*, 55.
- Blowes, D. W., y Ptacek, C. J. (2014). *The Geochemistry of Acid Mine Drainage. Environmental Geochemistry* (11th ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-095975-7.00905-0>
- Bos, R., Van Der Mei, H. C., y Busscher, H. J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - Its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 179–229. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00004-2)
- Chiume, R., Minnaar, S. H., Ngoma, I. E., Bryan, C. G., y Harrison, S. T. L. (2012). Microbial colonisation in heaps for mineral bioleaching and the influence of irrigation rate. *Minerals Engineering*, 39, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.07.002>
- Cochilco. (2009). Biolixiviación : Desarrollo actual y sus expectativas.
- Córdoba, E. M., Muñoz, J. A., Blázquez, M. L., González, F., y Ballester, A. (2008a). Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: General aspects. *Hydrometallurgy*, 93(3–4), 81–87.



<https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.015>

- Córdoba, E. M., Muñoz, J. A., Blázquez, M. L., González, F., y Ballester, A. (2008b). Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part II: Effect of redox potential. *Hydrometallurgy*, 93(3–4), 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2008.04.016>
- D. W. Blowes, C. J. Ptacek, J. L. Jambor, C. G. W. U. (2003). 9.05 The Geochemistry of Acid Mine Drainage. *Treatise on Geochemistry*, 149–204. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/09137-4>
- Dill, H. G. (2001). The geology of aluminum phosphate and sulphates of the alunite group minerals: A review. *Earth Science Reviews*, 53(1–2), 35–93. [https://doi.org/10.1016/S0012-8252\(00\)00035-0](https://doi.org/10.1016/S0012-8252(00)00035-0)
- Dockrey, J., Lindsay, M., Mayer, K., Beckie, R., Norlund, K., Warren, L., y Southam, G. (2014). Acidic Microenvironments in Waste Rock Characterized by Neutral Drainage: Bacteria–Mineral Interactions at Sulfide Surfaces. *Minerals*, 4(1), 170–190. <https://doi.org/10.3390/min4010170>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Diseases*. <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no9/02-0063.htm>, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Dutrizac, J. E. (1972). The kinetics of dissolution of enargite in acidified ferric sulphate solutions, 11(3), 469–476.
- Echlin, P. (2009). *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Business (Vol. 199). <https://doi.org/10.1007/978-0-387-85731-2>
- Edwards, K. J., Bond, P. L., y Banfield, J. F. (2000). Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: A chemotactic response to sulphur minerals? *Environmental Microbiology*, 2(3), 324–332. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00111.x>
- Edwards, K. J., Hu, B., Hamers, R. J., y Banfield, J. F. (2000). A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. *FEMS Microbiology Ecology*, 34(3), 197–206. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(00\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(00)00094-5)
- Edwards, K. J., Schrenk, M. O., Hamers, R., y Banfield, J. F. (1998). Microbial

- oxidation of pyrite: Experiments using microorganisms from an extreme acidic environment. *American Mineralogist*, 83(11–12 PART 2), 1444–1453.
- Ehrlich, H. L. (1996). How microbes influence mineral growth and dissolution. *Chemical Geology*.
- Ehrlich, H. L. (2016). Ehrlich's Geomicrobiology, Sixth Edition. In *Ehrlich's Geomicrobiology*.
- Ehrlich, H. L., y Newman, D. K. (2009). *GEOMICROBIOLOGY* (5ta edició).
- Fagan, M. A., Ngoma, E., Chiume, R. A., Minnaar, S., Sederman, A. J., Johns, M. L., y Harrison, S. T. L. (2016). MRI and gravimetric studies of hydrology in drip irrigated heaps and its effect on the propagation of bioleaching microorganisms, (December 2014). <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.04.022>
- Flemming, H.-C., y Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1080/0892701031000072190>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., y Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Florian, B. M. (2012). *Investigation of initial attachment and biofilm formation of mesophilic leaching bacteria in pure and mixed cultures and their efficiency of pyrite dissolution*. Universität Duisburg-Essen.
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(3), 609–643. <https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., y Sand, W. (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2743–2747.
- Govender, E., Kotsiopoulos, A., Bryan, C. G., y Harrison, S. T. L. (2017). Modelling microbial transport in simulated low-grade heap bioleaching systems: The hydrodynamic dispersion model, (July). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.07.008>
- GRUPO MÉXICO, S. A. B. D. C. V. (2011). *Informe anual 2011*. <http://www.gmexico.com.mx>.

- Habashi, F. (2005). A short history of hydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 79(1–2), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2004.01.008>
- Hamidian, H., Rezai, B., Milani, S. A., Vahabzade, F., y Shafaie, S. Z. (2009). Microbial leaching of uranium ore. *Asian Journal of Chemistry*, 21(8), 5808–5820.
- Hinkle, M. E., y Koehler, W. A. (1947). The action of certain microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science*, 106, 253–256.
- Hoque, M. E., y Philip, O. J. (2011). Biotechnological recovery of heavy metals from secondary sources-An overview. *Materials Science and Engineering C*, 31(2), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.09.019>
- Huminicki, D. M. C., y Rimstidt, J. D. (2009). Iron oxyhydroxide coating of pyrite for acid mine drainage control. *Applied Geochemistry*, 24(9), 1626–1634. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2009.04.032>
- Jerez, C. (2009). Metal extraction and biomining. *Encyclopedia of Microbiology*, 407–420. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00154-1>
- Johnson, D. B. (2014). Biomining-biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.04.008>
- Kashi, A. M., Tahemanesh, K., Chaichian, S., Joghataei, M. T., Moradi, F., Tavangar, S. M., ... Abed, S. M. (2014). How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM). *Galen Medical Journal*, 3(2), 63–80. Retrieved from [http://www.gmj.ir/gmj/index.php/gmj/article/view/267/\\_32](http://www.gmj.ir/gmj/index.php/gmj/article/view/267/_32)
- Kemner, K. M., Loughlin, E. J. O., Kelly, S. D., y Boyanov, M. I. (2005). Investigations of Mineral – Microbe – Metal Interactions. *Elements*, 1, 217–221.
- Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., y Sand, W. (2003). Bioleaching - A result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy*, 71(1–2), 83–88. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(03\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00176-2)
- Konhauser, K. O. (1998). Diversity of bacterial iron mineralisation. *Earth-Science Reviews*, 43, 91–121.

- Lara, R. H., Valdez-Pérez, D., Rodríguez, a. G., Navarro-Contreras, H. R., Cruz, R., y García-Meza, J. V. (2010). Interfacial insights of pyrite colonized by *Acidithiobacillus thiooxidans* cells under acidic conditions. *Hydrometallurgy*, 103(1–4), 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.02.014>
- Lewis, A. E. (2010). Review of Metal Sulfide Precipitation Review of metal sulphide precipitation. *Hydrometallurgy*, 104(2), 222–234. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.06.010>
- Li, Q., y Sand, W. (2017). Mechanical and chemical studies on EPS from *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: from planktonic to biofilm cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.02.009>
- Li, W. W., y Yu, H. Q. (2014). Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresource Technology*, 160, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.074>
- Li, Y., Kawashima, N., Li, J., Chandra, A. P., y 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*, 197–198, 1–32. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.03.004>
- Liao, Y., Zhou, L., Liang, J., y Xiong, H. (2009). Biosynthesis of schwertmannite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* cell suspensions under different pH condition. *Materials Science and Engineering C*, 29(1), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.06.011>
- Liu, H., Gu, G., y 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(1–2), 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2011.03.010>
- Lottermoser, B. G. (2007). *Mine Wastes* (2nd ed.).
- Lowell, J. ., y Guilbert, J. . (1970). Lateral and Vertical Alteration-Mineralization Zoning in Porphyry Ore Deposit. *Economic Geology*, 65(No.4), 373–408.
- Monds, R. D., y O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial

- biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
- Noel, N. (2014). Attachment of acidophilic bacteria to solid substrata Dissertation.
- Nordstrom, D. K., Blowes, D. W., y Ptacek, C. J. (2015). Hydrogeochemistry and microbiology of mine drainage: An update. *Applied Geochemistry*, 57(June), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.02.008>
- Ochoa Landín, L., Pérez Segura, E., y Del Río Salas, Rafael Valencia Moreno, M. (2011). *Depósitos minerales de Sonora, México. Panorama de la geología de Sonora, México. Boletín No. 118 del Instituto de Geología, U.N.A.M.*
- Olías, M., y Nieto, J. M. (2015). Background Conditions and Mining Pollution throughout History in the Río Tinto (SW Spain). *Environments*, 2, 295–316. <https://doi.org/10.3390/environments2030295>
- Olson, G. J., Brierly, J. A., y Brierly, C. L. (2003). Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1448-7>
- Orell, A., Fröls, S., y Albers, S.-V. (2013). Archaeal Biofilms: The Great Unexplored. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 337–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155616>
- Panda, S., Akcil, A., Pradhan, N., y Deveci, H. (2015). Current scenario of chalcopyrite bioleaching: A review on the recent advances to its heap-leach technology. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.064>
- Petersen, J. (2016). Hydrometallurgy Heap leaching as a key technology for recovery of values from low-grade ores – A brief overview. *Hydrometallurgy*, 165, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2015.09.001>
- Petersen, J., y Dixon, D. G. (2007). Principles, mechanisms and dynamics of chalcocite heap bioleaching. *Microbial Processing of Metal Sulfides*, 193–218. [https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7\\_10](https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7_10)
- Pisapia, C., Humbert, B., Chaussidon, M., y Mustin, C. (2008). Perforative Corrosion of Pyrite Enhanced by Direct Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

*Geomicrobiology Journal*, 25(6), 261–273.  
<https://doi.org/10.1080/01490450802258105>

- Posth, N. R., Canfield, D. E., y Kappler, a. (2014). Biogenic Fe(III) minerals: From formation to diagenesis and preservation in the rock record. *Earth-Science Reviews*, 135, 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2014.03.012>
- Pradhan, N., Nathsarma, K. C., Srinivasa Rao, K., Sukla, L. B., y Mishra, B. K. (2008). Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering*, 21(5), 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.10.018>
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D. S., y Bonnefoy, V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics*, 10, 394. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-394>
- Rawlings, D. E. (2004). Microbially-assisted dissolution of minerals and its use in the mining industry. *Pure and Applied Chemistry*, 76(4), 847–859. <https://doi.org/10.1351/pac200476040847>
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., y Muñoz, J. A. (2003). Study of Bacterial Attachment During the Bioleaching of Pyrite, Chalcopyrite, and Sphalerite. *Geomicrobiology Journal*.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., y Sand, W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in Bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacteria metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1448-7>
- Rohwerder, T., y Sand, W. (2003). The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology*, 149(7), 1699–1709. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26212-0>
- Rohwerder, T., y Sand, W. (2007). Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation. In *Microbial Processing of Metal Sulfides* (pp. 35–58). [https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7\\_2](https://doi.org/10.1007/1-4020-5589-7_2)
- Rojas-Chapana, J. a., y Tributsch, H. (2004). Interfacial activity and leaching patterns of *Leptospirillum ferrooxidans* on pyrite. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(1), 19–29. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00221-6)

- Sánchez España, J. (2017). Crystallization in acidic media : from nanoparticles to macrocrystals. In *Seminarios de la Sociedad Española de Mineralogía*.
- Sánchez España, J., y Burgos, W. (2015). Geochemistry of dissolved aluminum at low pH: Extent and significance of Al-Fe ( III ), (January 2016). <https://doi.org/10.1016/j.gca.2015.10.035>
- Sand, W., y Gehrke, T. (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology*, 157(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.07.012>
- Sanhueza, A., Ferrer, I. J., Vargas, T., Amils, R., y Sánchez, C. (1999). Attachment of *Thiobacillus ferrooxidans* on synthetic pyrite of varying structural and electronic properties. *Hydrometallurgy*, 51(1), 115–129. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(98\)00079-6](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(98)00079-6)
- Schippers, A., Breuker, A., Blazejak, A., Bosecker, K., Kock, D., y Wright, T. L. (2010). The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy*, 104(3–4), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.01.012>
- Schippers, A., Hedrich, S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W., y Willscher, S. (2013). Biomining: Metal Recovery from Ores with Microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 141, 1–47. <https://doi.org/10.1007/10>
- Schippers, A., y 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.
- Schlesinger, M. E., y King, M. J. (2011). Hydrometallurgical Copper Extraction : Introduction and Leaching. In *Extractive Metallurgy of Copper* (5th Editio). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-096789-9.10015-0>
- Shiers, D. W. (2012). Iron and sulfur utilisation patterns in chemolithotrophic cultures.
- Skinner, H., y Jahren, A. (2003). Biomineralization. *Treatise on Geochemistry*, 117–184. <https://doi.org/10.1007/BF02555813>
- Tao, H., y Dongwei, L. (2014). Presentation on mechanisms and applications of



- chalcopyrite and pyrite bioleaching in biohydrometallurgy – a presentation. *Biotechnology Reports*, 4, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.09.003>
- Tourney, J., y Ngwenya, B. T. (2014). The role of bacterial extracellular polymeric substances in geomicrobiology. *Chemical Geology*, 386, 115–132. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2014.08.011>
- Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching, 177–185.
- UNEP, U. N. E. P. D. of T. I. and E. (2000). Mining and sustainable development II: Challenges and perspectives. United Nations Environment Programme Division of Technology Industry and Economics. *Industry and Environment*, 23(Special Issue), 1–96.
- Valencia-moreno, M., Ochoa-landín, L., y Noguez-alcántara, B. (2006). Características metalogenéticas de los depósitos de tipo pórfido cuprífero en México y su situación en el contexto mundial.
- Vera, M., Schippers, A., y Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: Fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7529–7541. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4954-2>
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., y Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14, 2535–2554. <https://doi.org/10.3390/molecules14072535>
- Waksman, S., y Joffe, J. (1922). Microorganisms Concerned in the Oxidation of Sulfur in the Soil, 2(85), 609–616.
- Watling, H. (2016). Microbiological advances in biohydrometallurgy, 1–23. <https://doi.org/10.3390/www.mdpi.com/journal/minerals>
- Watling, H. R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. *Hydrometallurgy*, 84(1–2), 81–108. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.05.001>
- Williams, A. J., Sumner, D. Y., Alpers, C. N., Karunatilake, S., y Hofmann, B. a. (2015). Preserved Filamentous Microbial Biosignatures in the Brick Flat Gossan, Iron Mountain, California. *Astrobiology*, 15(8), 150806115313000. <https://doi.org/10.1089/ast.2014.1235>

- Zhang, R., Bellenberg, S., Castro, L., Neu, T. R., Sand, W., y Vera, M. (2014). Colonization and biofilm formation of the extremely acidophilic archaeon *Ferroplasma acidiphilum*. *Hydrometallurgy*, 150, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2014.07.001>
- Zhao, X., Wang, R., Lu, X., Lu, J., Li, C., y Li, J. (2013). Bioleaching of chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Minerals Engineering*, 53, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.08.008>