

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS EN PROCESOS DE BIOLIXIVIACIÓN

PILA DE BIOLIXIVIACIÓN



INTRODUCCION

- La biolixiviación de minerales sulfurados se caracteriza por la “participación activa” de microorganismos (bacterias y/o arqueas) en la disolución de los sulfuros metálicos.
- Características de extremófilos: acidófilos, termofílicos (moderados, extremos), autotróficos, quimiolitotróficos (oxidizan Fe(II) y compuestos reducidos de S), aeróbicos, anaeróbicos facultativos.

MICROORGANISMOS PRESENTES EN ESTOS PROCESOS

- BACTERIAS HIERROOXIDANTES
- BACTERIAS AZUFREOXIDANTES
- BACTERIAS HETEROTRÓFICAS
- BACTERIAS REDUCTORAS DE Fe(III)
- BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS
- HONGOS

PROCESOS DE BIOLIXIVIACION DE MINERALES SULFURADOS DE COBRE

- LIXIVIACIÓN EN PILAS DE SULFUROS SECUNDARIOS
- LIXIVIACIÓN EN BOTADEROS DE MINERALES DE BAJA LEY (Cp)
- LIXIVIACIÓN DE CONCENTRADOS DE CALCOPIRITA (Cp) Y ENARGITA (En)
- LIXIVIACIÓN IN SITU

PROCESOS DE BIOOXIDACIÓN DE SULFUROS CONTENIENDO ORO

- BIOOXIDACIÓN DE CONCENTRADOS EN REACTORES

Utilizando microorganismos mesófilos, termófilos moderados o termófilos extremos.

- BIOOXIDACIÓN DE MINERALES SULFURADOS EN PILAS

Utilizando microorganismos mesófilos

OBJETIVOS DE LA DETERMINACION DE BACTERIAS EN PROCESOS DE BIOLIXIVIACIÓN

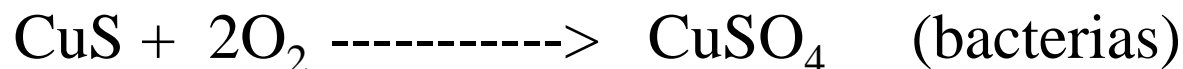
- DETERMINAR PRESENCIA O AUSENCIA DE MICROORGANISMOS
- TIPO DE MICROORGANISMOS PRESENTES
- ACTIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS

TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE BACTERIAS

- **MÉTODOS DE CULTIVOS:**
 - MEDIOS LÍQUIDOS
 - MEDIOS SÓLIDO
- **MÉTODOS MOLECULARES :**
 - MÉTODOS INMUNOLÓGICOS
 - EXTRACCIÓN DEL DNA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR, SEPARACIÓN POR DGGE , SECUENCIACIÓN Y AFILIACIÓN FILOGENÉTICA-

¿CUANTAS BACTERIAS PRESENTES EN UNA MUESTRA?

REACCIONES QUIMICAS IMPORTANTES:



OTRAS REACCIONES POSIBLES:

- SOLUBILIZACIÓN DE OTROS SULFUROS METÁLICOS
- SOLUBILIZACIÓN DE SILICATOS
- SOLUBILIZACIÓN DE CARBONATOS
- HIDRÓLISIS DE Fe(III)
- PRECIPITACION DE Fe(OH)_3

BACTERIAS IMPORTANTES EN ESTOS PROCESOS

- BACTERIAS HIERROOXIDANTES

ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS

LEPTOSPIRILLUM FERROOXIDANS

OTRAS HIERROOXIDANTES

- BACTERIAS AZUFREOXIDANTES

ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS

ACIDITHIOBACILLUS THIOOXIDANS

OTRAS AZUFREOXIDANTES

NUMERO Y ACTIVIDAD DE BACTERIAS

- ¿CUANTAS DE LAS PRESENTES SON CAPACES DE OXIDAR EL MINERAL?
 - DETERMINAR NO EL NUMERO SINO SU EFICIENCIA
 - MICROORGANISMOS ACTIVOS EN CONDICIONES DEL PROCESO:
- “CAPACES DE OXIDAR EL SULFURO, AZUFRE Y EL Fe(II) EN EL PROCESO”**

METODOLOGIAS PARA DETERMINAR CAPACIDAD DE OXIDAR

- METODOLOGIAS MOLECULARES DETERMINAN CUANTOS MICROORGANISMOS EXISTEN DE CADA TIPO (VIVAS Y MUERTAS)
- METODOS DE CULTIVO SERÍAN ESPECÍFICOS Y DETERMINAN SÓLO CÉLULAS VIABLES

MÉTODOS DE CULTIVO EN MEDIOS SÓLIDOS

DOBLE CAPA DE AGAROSA

ALGUNAS CEPAS DE *AT. FERROOXIDANS*

PLACAS SILICA GEL

ALGUNAS CEPAS DE *AT. FERROOXIDANS*

DOBLE CAPA CON CRECIMIENTO DE HETEROTRÓFICOS

AT. FERROOXIDANS, *LEPTOSPIRILLUM F*, Y
OTROS *ACIDITHIOBACILLUS*

MÉTODOS DE CULTIVO LIQUIDO

NMP DE HIERROOXIDANTES

- NO DIFERENCIA ENTRE LAS HIERROOXIDANTES
- SUBESTIMA ALGUNAS BACTERIAS DE CRECIMIENTO MAS LENTO
- PROVEE MUESTRAS PARA IDENTIFICACIÓN POSTERIOR

BACTERIAS LIBRES Y BACTERIAS ADHERIDAS

- ESTUDIOS HAN DEMOSTRADO QUE LA MAYOR PARTE DE LAS BACTERIAS SE ENCUENTRAN ADHERIDOS A LOS MINERALES
- MICROORGANISMOS PLANKTÓNICOS NO NECESARIAMENTE REFLEJAN LA POBLACIÓN ADHERIDA
- SE REQUIERE CONOCER DINÁMICA DE AMBAS POBLACIONES

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS ADHERIDAS

- **LIBERANDO LAS BACTERIAS DEL SÓLIDO POR LAVADO**
- RECuento EN LA SOLUCIÓN
- METODOLOGÍAS MOLECULARES
- **DETERMINANDOLAS DIRECTAMENTE EN EL MINERAL**
- POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA
- METODOLOGÍAS MOLECULARES

EXPERIENCIA LABORATORIO BIOHIDROMETALURGIA(U. de Chile)

PLACAS DE AGAROSA DE HARRISON
PARA *THIOBACILLUS FERROOXIDANS*

“CEPAS DE LABORATORIO”

CEPAS DE MINERA PUDAHUEL

CEPAS DE CRÁTER DE EL TENIENTE

EFICIENCIA MÁXIMA 40%

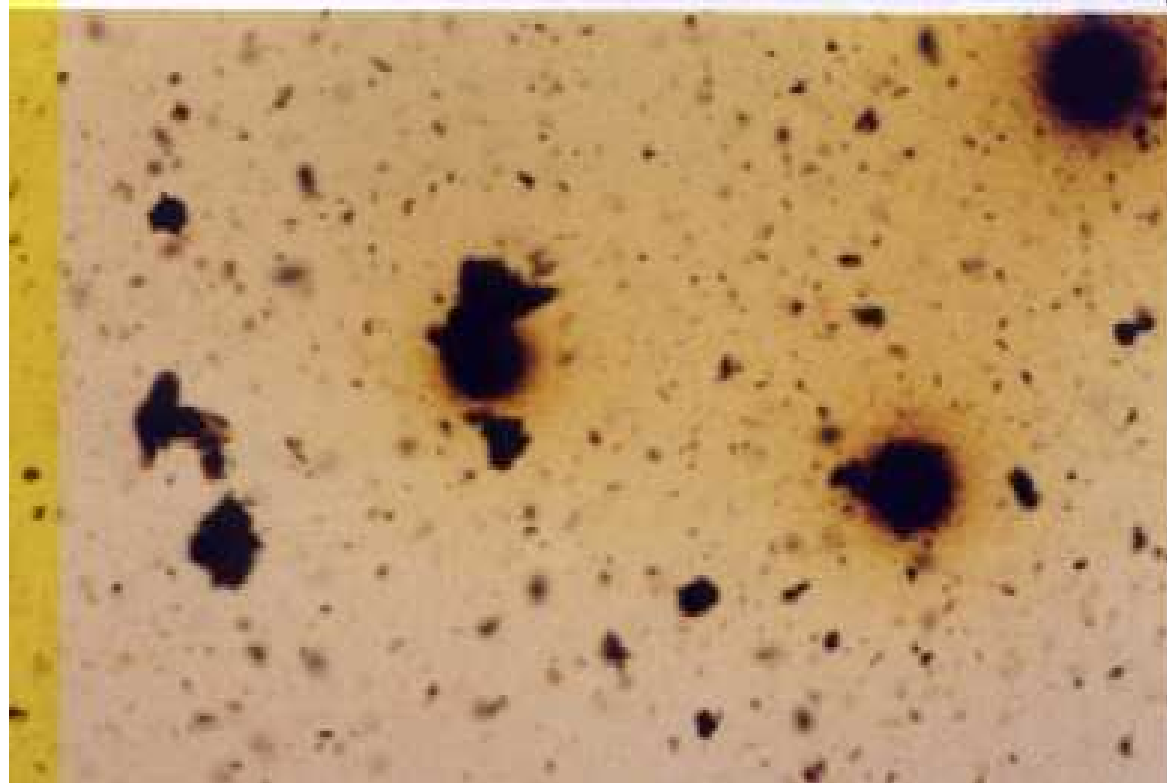
LÍMITE DE DETECCIÓN 10^3 BACT/ML

SÓLO CRECEN ALGUNAS CEPAS DE *At. f.*

(1986-1998)

DESARROLLO DE *AT. FERROOXIDANS* EN PLACAS





EXPERIENCIA LABORATORIO BIOHIDROMETALURGIA

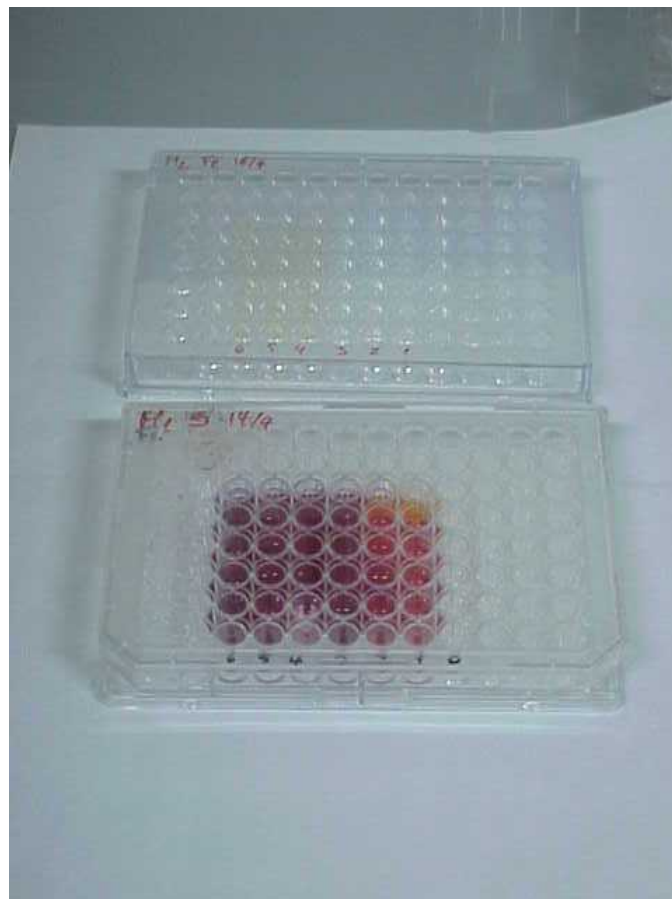
- 1990 EN ADELANTE VARIOS PROYECTOS TÉCNICOS CON EMPRESAS MINERAS
- CULTIVO EN AGAROSA DE *THIOBACILLUS THIOOXIDANS* (BAJA EFICIENCIA)
- CULTIVOS EN MEDIOS LÍQUIDOS PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR HIERROOXIDANTES Y AZUFREOXIDANTES

OTRAS TECNOLOGÍAS PARA DETERMINAR BACTERIAS VIABLES

**NMP DE HIERROOXIDANTES EN
MICROPLACAS PARA *AT. FERROOXIDANS*,
LEPTOSPIRILLUM F, Y OTROS
HIERROOXIDANTES**

- **BAJOS VOLUMENES**
- **BAJA CONCENTRACIÓN DE FE(II)**
- **LÍMITE DE DETECCIÓN 10^2 BAC/ML**
- **RESULTADOS EN 10 DÍAS**

NMP HIERROOXIDANTES



OTRAS TECNOLOGÍAS PARA DETERMINAR BACTERIAS VIABLES

NMP DE AZUFREOXIDANTES

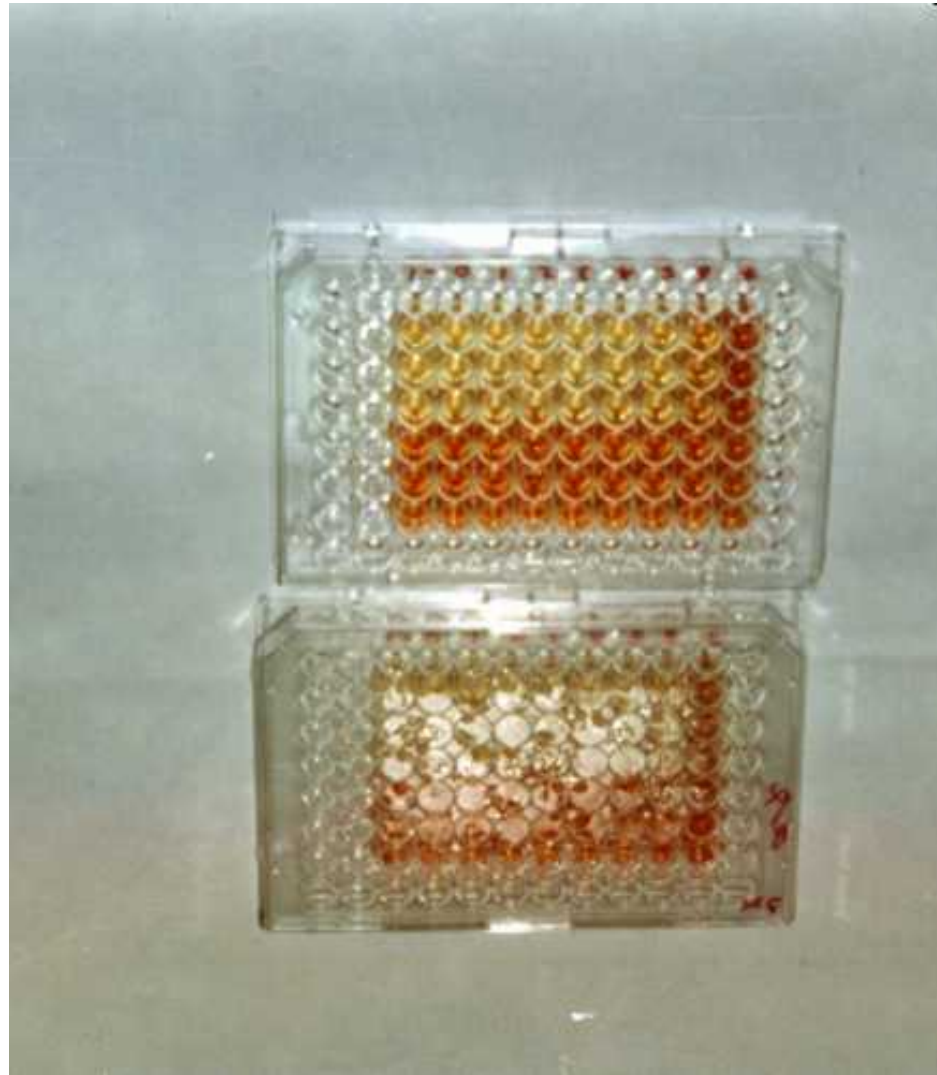
EN MICROPLACAS PARA *AT.*

FERROOXIDANS, *AT. THIOOXIDANS* Y
OTROS AZUFREOXIDANTES

- BAJOS VOLUMENES
- LÍMITE DE DETECCIÓN 10^2 BAC/ML
- CULTIVOS POSITIVOS SE DETERMINAN CON INDICADOR ÁCIDO BASE
- RESULTADOS EN 10 DÍAS

CULTIVANDO EN MICROPLACAS





CULTIVO DE HIERROOXIDANTES EN FILTROS DE MEMBRANA

SOLUCIONES DE PLANTAS C/BAJAS
CONCENTRACIONES DE BACTERIAS
ACTIVAS, NO DETECTABLES POR NMP

FILTRACIÓN EN FILTROS DE 0.1 μm

VOLUMENES DETERMINADOS

CULTIVO EN AGAROSA CON Fe(II)

CRECIMIENTO EN 48-96 HRS

DETECTA 10 *AT. FERROOXIDANS* EN 100ML

OTROS MÉTODOS 10^4 BAC/ML



DETERMINACIÓN DE BACTERIAS ADHERIDAS A MINERALES

CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS
HIERROOXIDANTES ACTIVAS ADHERIDAS
MEDIANTE VELOCIDAD DE OXIDACIÓN
DE Fe(II)

METODOLOGÍA SE CONTROLÓ CON
BACTERIAS ADHERIDAS MARCADAS CON
CARBONO 14

FUNCIONA BIEN A 30°C CON MINERAL
CALCOPIRITA (POCO REACTIVO)

COMPLICADO DE UTILIZAR CON OTROS
SULFUROS

CONTEO DE BACTERIAS LIBERADAS DE MINERAL COLONIZADO POR AT. F.

AGITACIÓN 100rpm, 30min	$(1.85 \pm 0.19) \times 10^7$
AGITACIÓN 250rpm, 30min	$(1.6 \pm 0.17) \times 10^7$
AGITACIÓN 250rpm, 30min	$(1.05 \pm 0.1) \times 10^8$
AGITACIÓN 250 rpm, 120min	$(1.5 \pm 0.15) \times 10^7$
SDS 0.0014 %, 5 min	$(1.3 \pm 0.14) \times 10^{10}$
SDS 0.003 %, 5 min	$(1.4 \pm 0.15) \times 10^{10}$
TRITON X100 0.05 %, 5 min	$(1.08 \pm 0.1) \times 10^{10}$
SONICATION, 1min	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^8$

VIABILIDAD DE BACTERIAS LIBERADAS

- **SE DETERMINÓ POR CRECIMIENTO
EN PLACAS DE AGAROSA**
- BACTERIAS CONTROL: 40%
- BACTERIAS LIBERADAS CON TRITÓN
X 100 : 5%
- BACTERIAS LIBERADAS CON SDS. ND

BACTERIAS ACTIVAS ADHERIDAS ANTES Y DESPUES DE LAVAR CON MEDIO BASAL

–	BACT INICIALES	BACT FINALES
MUESTRA 1	$(2.7 \pm 0.5) \times 10^8$	$(0.6 \pm 0.1) \times 10^8$
	$100 \pm 20 \%$	$21 \pm 1.9\%$
MUESTRA 2	$(1.4 \pm 0.3) \times 10^8$	$(0.5 \pm 0.1) \times 10^8$
	$100 \pm 20\%$	$35.7 \pm 7\%$
MUESTRA 3	$(9.5 \pm 2) \times 10^7$	$(8.0 \pm 1.6) \times 10^7$
	$100 \pm 20\%$	$84 \pm 17\%$

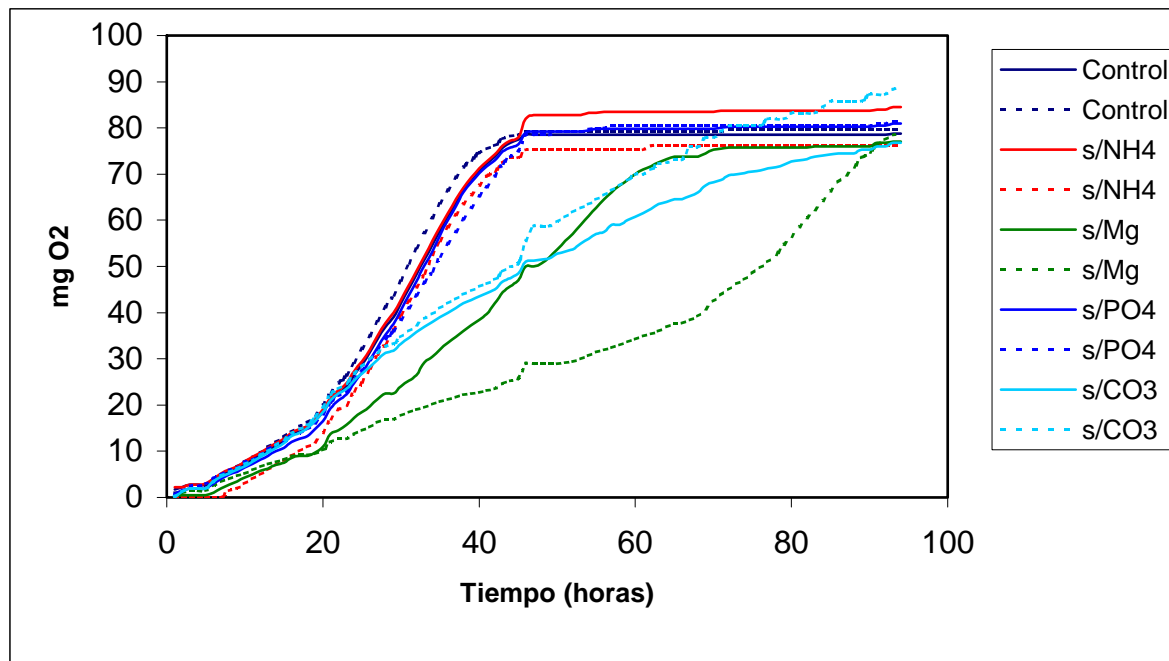
•

DETERMINACIÓN DIRECTA POR RESPIROMETRÍA

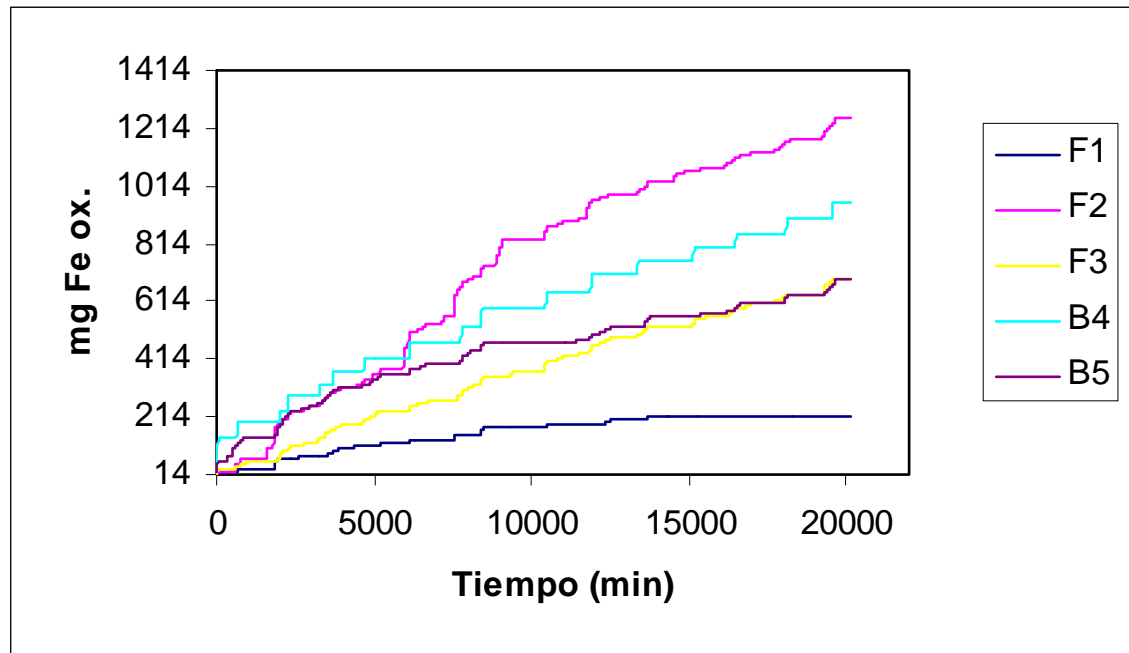
DETERMINACIÓN DE BACTERIAS
HIERROOXIDANTES ACTIVAS ADHERIDAS
PRESENTES EN UNA MUESTRA DE
MINERAL POR RESPIROMETRÍA:

- SE DETERMINA EL CONSUMO DE OXÍGENO, EQUIVALENTE AL Fe(II) OXIDADO POR LAS BACTERIAS PRESENTES EN EL MINERAL
- SE UTILIZA TAMBIÉN PARA DETERMINAR BACTERIAS ACTIVAS PRESENTES EN UNA SOLUCIÓN DE LIXIVIACIÓN





CONSUMOS DE OXÍGENO POR BACTERIAS ADHERIDAS A MINERAL



DETERMINACIÓN DIRECTA POR RESPIROMETRÍA

- **METODOLOGÍA RECOMENDADA EN LA LITERATURA PARA DETERMINAR BACTERIAS PRESENTES EN EL PROCESO**
- **BACTERIAS SE DETERMINAN EN LAS CONDICIONES EN LAS CUALES SE ENCUENTRAN EN EL PROCESO**
- **SE PUEDE UTILIZAR ENTRE OTROS PARA ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LAS BACTERIAS**

DETERMINACIÓN DE MICRORGANISMOS TERMOFÍLICOS

- PROCESOS DE BIOLIXIVIACIÓN DE
CONCENTRADOS DE CALCOPIRITA Y
ENARGITA EN REACTORES

- *SULFOLOBUS METALLICUS* A 70°C

RECuento DIRECTO

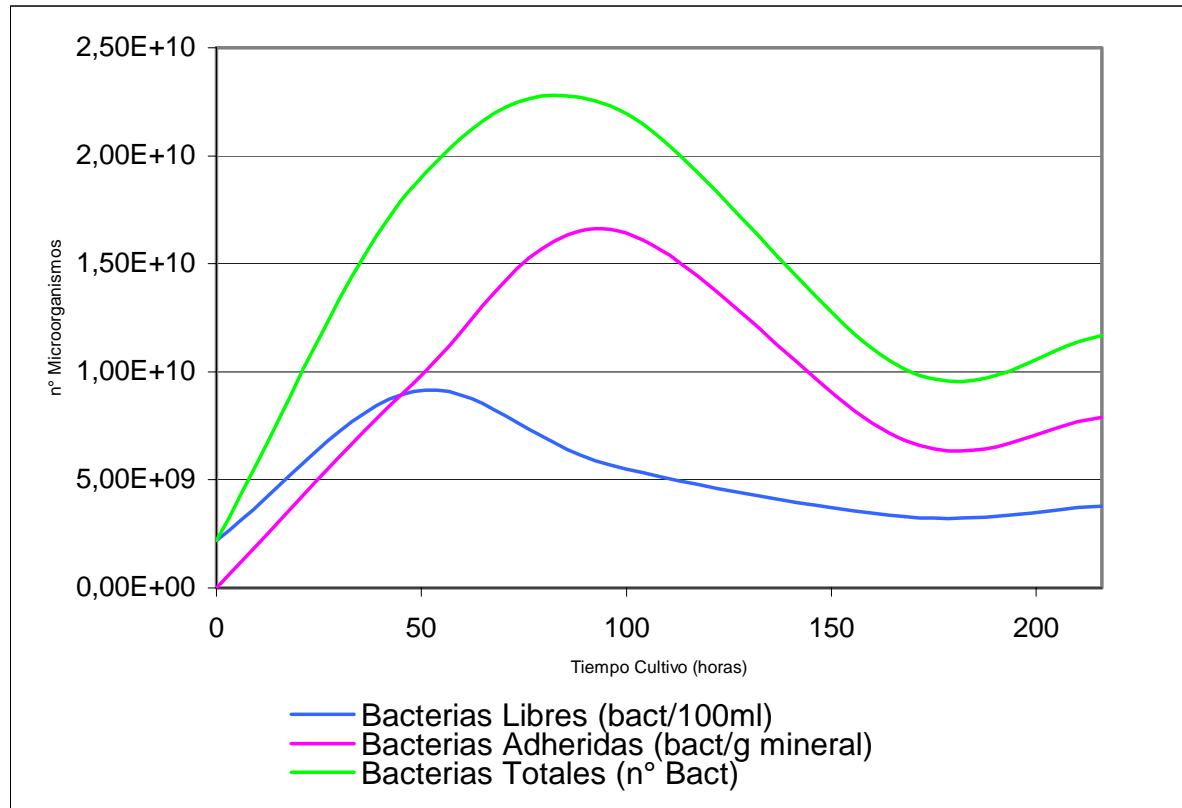
PLACAS DE GELRITE (LITERATURA)

RESPIROMETRÍA (LITERATURA)

DETERMINACIÓN DE *SULFOLOBUS* *METALLICUS*

- **RECuento DIRECTO EN SOLUCIÓN**
- **NMP HIERROOXIDANTES EN SOLUCIÓN**
- **ESTIMACIÓN DE BACTERIAS POR CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN Y EN EL MINERAL**

EVOLUCIÓN DE SULFOLOBUS METALLICUS EN LIXIVIACIÓN DE CALCOPIRITA DETERMINADO



DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE UN PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN

- **MICROORGANISMOS ACTIVOS EN
UN PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN
SE PUEDEN DETERMINAR POR
VARIACIÓN DEL POTENCIAL
REDOX DE LA SOLUCIÓN**

- **EH**