

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
CAMPUS SANTIAGO SAN JOAQUÍN
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y DE MATERIALES

**“HIDROFOBICIDAD COMO MECANISMO DE
ADHERENCIA DE *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*
A LA PIRITA EN DISTINTOS MEDIOS ACUOSOS”**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
METALÚRGICA
MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL DE MINAS

ELIZABETH ANDREA GONZÁLEZ VILUGRÓN

PROFESOR GUÍA:
FRANCISCA SAN MARTÍN ROBBIANO

SANTIAGO DE CHILE 2023

ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos.....	7
Resumen.....	8
Introducción	9
Objetivos	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
1. Estado del arte	12
1.1 Procesamiento de minerales	12
1.1.1 Reactivos de flotación.....	13
1.2 Agua en Chile.....	16
1.2.1 Agua de mar en minería.....	17
1.3 Bacterias en minería.....	19
1.3.1 Bioflotación.....	19
1.3.2 Mecanismo de adherencia.....	24
1.3.3 Adherencia bacteriana e hidrofobicidad	31
2. Metodología.....	33
2.1 Microorganismos	33
2.1.1 Cultivo de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	33
2.1.2 Concentración de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	34
2.1.3 Conteo de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	35
2.2 Medios acuosos.....	35
2.2.1 Agua dulce.....	36
2.2.2 Agua de mar	36
2.2.3 Solución apolar	36

2.3	Partición líquido-líquido	37
2.4	Conteo directo	37
2.5	Cinética de adherencia	37
3.	Resultados y Discusión.....	39
3.1	Partición líquido-líquido	39
3.1.1	Agua dulce	39
3.1.2	Agua de mar	40
3.2	Cinética de adherencia	42
3.2.1	Agua dulce	42
3.2.2	Agua de mar	45
3.3	Hidrofobicidad y Máxima adherencia	47
3.4	Isoterma de adherencia	51
4.	Conclusiones	57
5.	Referencias	60
6.	Anexos	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representación del proceso de flotación (Wills and Finch, 2016).....	12
Figura 1.2: Representación ángulo de contacto. γ_{SG} es la tensión superficial entre el sólido y el gas, γ_{GL} es la tensión superficial entre el gas y el líquido y γ_{SL} es la tensión superficial entre el sólido y el líquido.	13
Figura 1.3: Xantato isopropílico de sodio.	14
Figura 1.4: Espumante MIBC y adhesión a burbuja de aire.....	15
Figura 1.5: Proyección del consumo de agua de mar en la minería del cobre 2020-2031 (Cochilco, 2020).	17
Figura 1.6: Efecto del agua de mar en la flotación de minerales (Castro, 2012).	18
Figura 1.7: Recuperación de flotación (a):pirita + PIPX (b):calcopirita + PIPX (c):pirita + células + PIPX (d):calcopirita + células + PIPX (Chandrababha et al., 2004)	21
Figura 1.8: Efecto de <i>A. ferrooxidans</i> en la recuperación de pirita en (a) agua dulce (b) agua salina (c) agua de mar (San Martín et al., 2018).....	22
Figura 1.9: Efecto de <i>A. ferrooxidans</i> en la flotabilidad de pirita en agua dulce	23
Figura 1.10: Efecto de <i>A. ferrooxidans</i> en la flotabilidad de pirita en agua de mar.	23
Figura 1.11: Resultados de (a) cinética de adhesión de las bacterias a la pirita y (b) potencial de flujo en agua de mar (San Martín et al., 2020).....	25
Figura 1.12: Cinética de adherencia de <i>A. ferrooxidans</i> a pirita en agua fresca y agua salina (35 g/l NaCl) a pH 4. Los controles son experimentos sin minerales (solo bacterias y agua) (San Martín y Aguilar., 2019).....	26
Figura 1.13: Potencial de flujo de <i>A. ferrooxidans</i> y pirita en (a) agua fresca, (b) agua salina.	26
Figura 1.14: Representación esquemática de método “Magnobead”(Straver and Kijne, 1996).....	30
Figura 2.1: Cultivo de bacterias: a) Recién preparado y b) Con días de incubación.....	34
Figura 2.2: a) Esquema de cámara Neubauer, b) Visualización de cuadros de cámara Neubauer en microscopio.	35
Figura 2.3: “Diagrama de procedimiento”	38

Figura 3.1: Cinética de adherencia en agua dulce a distintos pH y concentración de bacterias baja (10^6 bact/ml).	42
Figura 3.2: Cinética de adherencia en agua dulce a distintos pH y concentración de bacterias media (10^8 bact/ml).	43
Figura 3.3: Cinética de adherencia en agua dulce a distintos pH y concentración de bacterias alta (10^9 bact/ml).	43
Figura 3.4: Cinética de adherencia en agua de mar a distintos pH y concentración de bacterias baja (10^6 bact/ml).	45
Figura 3.5: Cinética de adherencia en agua de mar a distintos pH y concentración de bacterias media (10^8 bact/ml).	45
Figura 3.6: Cinética de adherencia en agua de mar a distintos pH y concentración de bacterias alta (10^8 bact/ml).	46
Figura 3.7 : Variación del porcentaje de hidrofobicidad y valor de adherencia en función del pH en agua dulce a 60 minutos.....	47
Figura 3.8 : Variación del porcentaje de hidrofobicidad y valor de adherencia en función del pH en agua de mar a 60 minutos.	48
Figura 3.9: Variación del porcentaje de depresión de pirita y valor de adherencia a 60 minutos en función del pH en agua dulce.....	48
Figura 3.10: Variación del porcentaje de depresión de pirita y valor de adherencia a 60 minutos en función del pH en agua de mar.	49
Figura 3.11: Ajuste de modelos Langmuir y Freundlich a datos experimentales en agua dulce.....	53
Figura 3.12: Ajuste de modelos Langmuir y Freundlich a datos experimentales en agua de mar.	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1: Contenido iónico del agua de mar (Jeldres et al., 2016).....	18
Tabla 1.2: Ángulo de contacto de la pirita en agua de mar a pH 8 y recuperación (San Martín et al., 2020) cuando se acondiciona de distintas formas.	25
Tabla 2.1: Concentración de reactivos para medio de cultivo de bacterias	33
Tabla 2.2: Concentración de sales para producción de agua de mar artificial (Kester et al., 1967).	36
Tabla 3.1: Resultados experimentos partición líquido-líquido para 60 y 120 minutos en agua dulce.	39
Tabla 3.2: Resultados experimentos partición líquido-líquido para 60 y 120 minutos en agua de mar.	41
Tabla 3.3: Parámetros de modelos de Langmuir y Freundlich para agua dulce y agua de mar.....	56

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por permitirme estudiar en la Universidad Técnica Federico Santa María, conocer gente hermosa y poder realizar mi estudio de postgrado. Él es mi fortaleza y le agradezco haberme acompañado hasta aquí.

Agradezco a mis padres, por ser un apoyo fundamental durante la duración de la carrera. Gracias por siempre apoyarme e impulsarme de manera incondicional para cumplir cada uno de mis sueños y objetivos, tanto personales como académicos. Gracias por aguantarme en aquellos periodos en los que no quería saber del mundo, por darme amor cuando más lo necesité y por siempre tener una palabra de aliento. Los amo. Agradezco también a mi familia por ser parte de este proceso de manera silenciosa pero importante, cada abrazo, palabra de ánimo y cariño fueron fundamentales para llegar a este punto.

Agradezco a mis docentes que han sido parte del camino universitario, gracias por todo el conocimiento entregado, por cada una de las enseñanzas profesionales. Agradezco de manera particular a Sergio Palma, por abrir la puerta para ingresar al programa de Magíster, gracias por ser un gran docente y siempre estar dispuesto a ayudar. Gracias a Francisca San Martín, mi profesora guía, por aceptarme como tesista, por cumplir con la difícil tarea de acompañarme en este proceso, por resolver cada una de las dudas que surgieron durante el periodo y siempre tener la disposición para corregir y aconsejar.

Agradezco a mis amigos, Valentina, Carla, David, Jean, que durante todo el periodo universitario me ayudaron a enfrentar cada uno de los desafíos que se nos iban presentando. Gracias por cada noche de desvelo, por cada mensaje y abrazo de ánimo, gracias por los momentos de distracción y por permitirme ser parte de sus vidas.

Finalmente, agradezco al proyecto fondecyt de iniciación N° 11200144 EVALUATION OF CHEMOLITHOAUTOTROPHIC MICROORGANISMS AS PYRITE DEPRESSANT IN FLOTATION OF COPPER SULFIDES WITH SEAWATER, por financiar el presente trabajo.

Resumen

En flotación de minerales de cobre y molibdeno se utiliza cal para aumentar el pH al de operación (pH entre 10 y 12). Dada la escasez hídrica, el uso de agua de mar ha ido en aumento en minería, sin embargo, esto conlleva un aumento drástico en el consumo de cal (depresante) para alcanzar el pH de operación y una disminución en la recuperación de molibdeno. Un depresante alternativo a la cal que se ha utilizado en algunos estudios es la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Se han realizado estudios de biodepresión de piritita en agua dulce y agua de mar y se conoce que la adherencia de la bacteria al mineral está directamente relacionada con la depresión, pero se desconoce el mecanismo de adherencia.

En este trabajo se estudió la hidrofobicidad como mecanismo de adherencia en distintos medios: agua de mar y agua dulce (destilada), mediante el mecanismo de partición líquido-líquido. Los líquidos polares y apolar que se usaron fueron agua de mar/agua destilada e hidrocarburos, respectivamente. Se analizó la influencia del pH y de la concentración de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Finalmente, se realizaron experimentos de adherencia luego de la partición líquido-líquido, para estudiar la relación entre la hidrofobicidad y la adherencia.

Los resultados obtenidos muestran que *A. ferrooxidans* es más hidrofóbica en agua de mar que en agua dulce y la hidrofobicidad tiene un aumento a medida que aumenta el pH. El caso con mayor hidrofobicidad corresponde en agua de mar a pH 8 (63% de bacterias transferidas a la fase orgánica). Por otro lado, la adherencia de la bacteria aumenta con el tiempo y con el pH, teniendo a pH 8 una adherencia mayor para las distintas concentraciones. Se realizaron isotermas de adherencia y los resultados se ajustaron a los modelos de Langmuir y Freundlich. Uno de los parámetros más relevantes corresponde a la máxima adherencia (X_m), el cual toma un valor máximo de $7,60 \times 10^9$ a pH 8 y en ambos medios. Los datos se ajustaron mejor al modelo de Freundlich. Finalmente, es posible decir que la adherencia de *A. ferrooxidans* a piritita es mediante fuerzas hidrofóbicas y que la unión se favorece en agua de mar a pH 8.

Introducción

En Chile existe una gran cantidad de yacimientos mineros, desde los cuales se produjeron 5,6 millones de toneladas métricas de cobre fino en 2022, siendo obtenidas mediante el proceso de concentración un total de 4,2 millones (COCHILCO, 2022). Este proceso representa el mayor consumo de agua, utilizando el 64% del total del caudal de agua (Cantalloppts et al., 2020). Chile lidera la crisis hídrica en Latinoamérica, con 53% de comunas declaradas en sequía hídrica (Fragkou et al., 2022). La escasez hídrica se puede ver evidenciada en el informe hídrico presentado por la dirección general de aguas (DGA, 2022). Por este motivo, el uso del agua de mar en la minería ha ido incrementándose en los últimos años y se espera que al año 2030 el 50% del agua utilizada en minería provenga del mar (Cochilco, 2020).

Sin embargo, uso del agua de mar en el proceso de flotación produce un aumento en el consumo de cal (depresor de pirita) al pH de operación (≈ 11) desde 1 g/kg de mineral hasta 10 g/kg de mineral y una disminución de la recuperación de molibdeno desde aproximadamente 80 a 25 % a pH 11 (Castro, 2012). El uso de microorganismos (*Acidithiobacillus ferrooxidans*) en flotación de sulfuros de cobre ha sido ampliamente estudiado (Chandraprabha et al., 2004; MISRA et al., 1996; Ohmura et al., 1993; San Martín et al., 2018), tanto en agua dulce como en agua de mar. Se determinó que *A. ferrooxidans* es capaz de deprimir la pirita en agua dulce, sin afectar en gran medida la flotabilidad de la calcopirita., indicando que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es selectiva con la pirita en flotación en agua dulce (Chandraprabha et al., 2004). En 2018 se obtuvo que al pH natural del agua de mar (7,8-8,2) es posible disminuir la recuperación de la pirita acondicionada con colector xantato. También se analizó la selectividad de la bacteria, observando que la recuperación de molibdenita y calcopirita no es afectada en gran medida (San Martín et al., 2018)

Posteriormente, se indagó en los mecanismos de biodepresión de pirita. Se analizó la adhesión bacteriana, el potencial de flujo en función del pH y el ángulo de contacto con y sin acondicionamiento con bacterias. Se determinó que a pH 8 la adherencia bacteriana y la depresión de pirita es mayor. El ángulo de contacto no presentó relación con la recuperación, es decir, cuando se acondicionó con bacterias, la recuperación de pirita disminuyó de 97% a

64% y el ángulo de contacto varió desde 54° a 59° (San Martín et al., 2020). Por otro lado, San Martín y Aguilar (2019) descartaron las fuerzas electrostáticas como fuerza impulsora de la adherencia entre pirita y *A. ferrooxidans* en agua fresca y agua salina, ya que ambas tenían la misma carga cuando más se adhería. Además, San Martín et al. (2020) descartaron también que la unión entre *A. ferrooxidans* era producto de las fuerzas electrostáticas en agua dulce y agua de mar, ya que el potencial de flujo era negativo para ambas al pH que más se unían (pH 8).

En el presente trabajo se evaluará si la adhesión de la bacteria a la pirita es mediante fuerzas hidrofóbicas. Para ello, la metodología utilizada se basó en la propuesta por Rosenberg et al. (1980), que consiste en poner en contacto una solución de hidrocarburos y bacterias en solución polar, pero realizando cambios en el análisis de adherencia de las bacterias a los hidrocarburos. En esta investigación, se estudió la hidrofobicidad de *A. ferrooxidans* mediante la técnica de partición líquido-líquido, la cual consiste en analizar la afinidad de las células bacterianas a una solución apolar (hidrocarburos) y a una solución polar, mediante conteo directo en microscopio con cámara Neubauer. Finalmente, se realizaron experimentos de adherencia para estudiar la relación entre la hidrofobicidad y la adherencia.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar si la adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a la pirita es mediante hidrofobicidad, para comprender el mecanismo de biodepresión.

Objetivos específicos

-Determinar mediante experimentos de partición líquido-líquido la condición de hidrofobicidad de las bacterias en agua dulce y agua de mar bajo distintas condiciones de pH y concentración de *A. ferrooxidans*.

-Evaluar la cinética de adherencia de *A. ferrooxidans* a pirita en distintos medios acuosos a distintos pH y concentración de bacterias.

-Confeccionar isothermas de adsorción para cada una de las condiciones de medios acuosos, pH y concentración de bacterias establecidas.

-Establecer relación entre los resultados obtenidos para cinética de adherencia/isothermas de adsorción e hidrofobicidad para las distintas condiciones definidas.

1. Estado del arte

1.1 Procesamiento de minerales

El proceso de flotación de minerales corresponde a un proceso fisicoquímico de tensión superficial que tiene como finalidad conseguir la separación de minerales sulfurados valiosos de otros minerales y especies que componen la roca (Codelco Chile, 2019). Utiliza el 64% del agua suministrada, lo que convierte a este proceso al que mayor consumo de agua tiene (Cantallopis y Ramírez, 2020). Se lleva a cabo en celdas de flotación, donde coexisten 3 fases (sólido, líquido y gas), convirtiéndolo en un sistema multifásico y heterogéneo producto de la diferencia de tamaño, forma y composición del mineral y la burbuja.

La flotación se basa en la adherencia de las partículas del mineral a la burbuja de aire, para que el agregado mineral-burbuja ascienda hasta el rebalse. Esto depende de las propiedades del mineral y de la espuma, las cuales pueden ser mejoradas o disminuidas por medio de reactivos si se requiere (Yianatos, 2008).

Para llevar a cabo el proceso, se agrega energía al sistema mediante agitación, lo cual mantiene en suspensión los sólidos y también permite la colisión y la adhesión de las partículas minerales a las burbujas de aire. Para que la partícula de mineral se pueda unir a la burbuja de aire, debe tener propiedades hidrofóbicas. En la Figura 1.1 se ilustra el proceso de flotación, donde se puede ver que las partículas blancas se unen al mineral dada su hidrofobicidad, lo cual le permite llegar al concentrado.

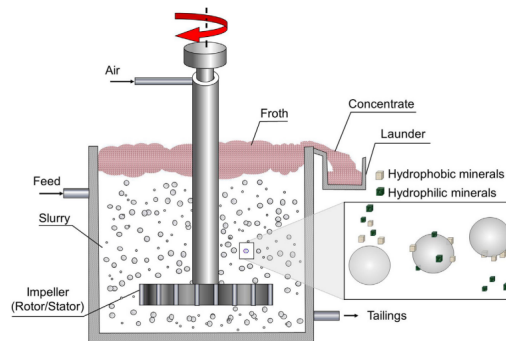


Figura 1.1: Representación del proceso de flotación (Wills and Finch, 2016).

Las fuerzas de tensión superficial de partícula-líquido y gas-líquido forman un ángulo entre la superficie del mineral y la burbuja que se denomina ángulo de contacto. La Figura 1.2 permite entender mejor la definición de ángulo de contacto y como se relaciona con la hidrofobicidad o hidrofiliidad. Por lo tanto, al aumentar el ángulo de contacto, aumenta también la hidrofobicidad. Se dice que los minerales con un ángulo de contacto alto son aerofílicos, es decir, tienen mayor afinidad por el aire que por el agua (Wills and Finch, 2016).

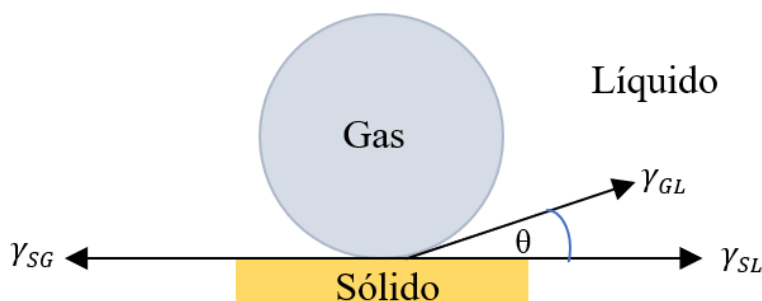


Figura 1.2: Representación ángulo de contacto. γ_{SG} es la tensión superficial entre el sólido y el gas, γ_{GL} es la tensión superficial entre el gas y el líquido y γ_{SL} es la tensión superficial entre el sólido y el líquido.

1.1.1 Reactivos de flotación

Para lograr el proceso de flotación se deben tener las condiciones necesarias para que sea eficiente. En general, el mineral que ingresa al proceso de flotación no es hidrofóbico, por lo tanto, es necesario cambiar las propiedades superficiales para que se pueda adherir a la burbuja y llegar al concentrado. Por otro lado, el tamaño de burbuja también es importante, junto con la cantidad que se generen.

Existen distintos tipos de reactivos que se utilizan en la flotación, los cuales tienen funciones específicas, que son descritos en esta sección.

- **Colectores**

Los colectores son compuestos orgánicos que otorgan hidrofobicidad a los minerales para que floten y son agregados a la pulpa durante un periodo de tiempo (acondicionamiento). Contienen un anión o catión en la parte polar y cadena de hidrocarburos en la parte no polar. La Figura 1.3 corresponde al colector xantato isopropílico de sodio, donde se pueden ver la parte polar y apolar.

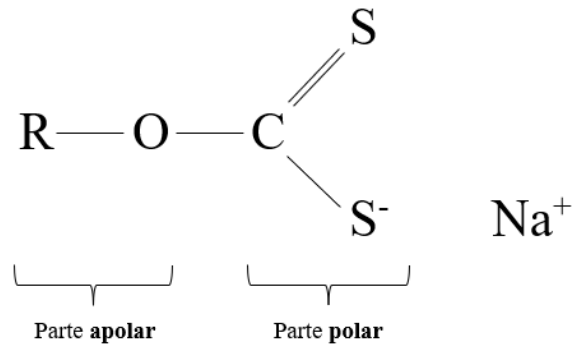


Figura 1.3: Xantato isopropílico de sodio.

La parte polar se adhiere al mineral y la cadena de hidrocarburos (parte apolar) queda orientada hacia el líquido, otorgando la hidrofobicidad. Una cadena más larga de hidrocarburos hará que el mineral sea más hidrofóbico, por lo tanto, tendrá un mayor ángulo de contacto (Yianatos, 2008).

- **Activadores**

Existen minerales cuya flotación no es posible solo añadiendo colector, debido a que el colector no tiene la capacidad de adherirse a la superficie del mineral. La flotación de esfalerita con xantato no es posible, ya que es soluble en comparación con otros xantatos de metales base, y no proporciona sitios hidrofóbicos estables. Además, la esfalerita es un semiconductor deficiente, entonces no soporta fácilmente las reacciones de transferencia de electrones. Se puede utilizar sulfato de cobre como activador de esfalerita, lo que hace que el colector xantato reaccione con el mineral, formando xantato de cobre más estable (Yianatos, 2008).

- **Espumantes**

El mineral puede subir a la superficie gracias a la adherencia de las partículas a las burbujas. Sin embargo, no basta con introducir aire a la celda, ya que la coalescencia entre las burbujas disminuye la cinética de flotación y la recuperación del mineral. Es importante añadir reactivos que favorezcan la formación y conservación de las burbujas con un tamaño adecuado, que corresponden a los espumantes.

Los espumantes son compuestos orgánicos y heteropolares, formados por un grupo polar (comúnmente grupos hidroxílicos OH-) y un grupo apolar (cadena de hidrocarburos). La estructura de las moléculas de espumante favorece la adsorción en la interfase aire-agua. Los espumantes orientan los grupos no polares hacia el aire y los grupos polares al agua. La Figura 1.4 muestra una estructura de un espumante MIBC junto con la adhesión del espumante a la burbuja de aire.

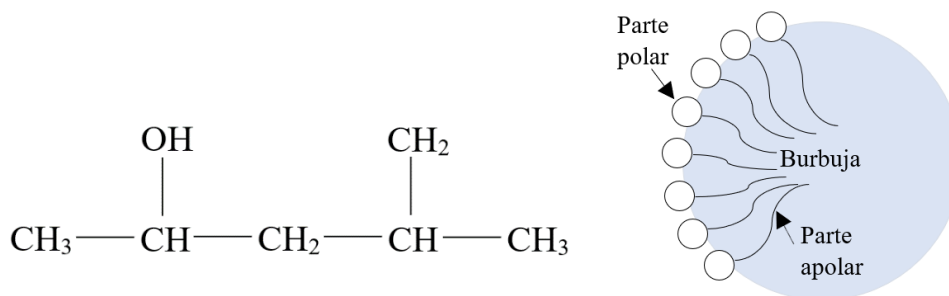


Figura 1.4: Espumante MIBC y adhesión a burbuja de aire.

Las principales funciones de los espumantes son: generar espuma estable, reducir la coalescencia de las burbujas, proporcionar burbujas de 1 a 2 milímetros (Wills and Finch, 2016; Yianatos, 2008).

- **Depresantes**

Existen minerales no valiosos que reaccionan con el colector, como por ejemplo la pirita. Esto produce una disminución en la ley de cobre en el concentrado, siendo necesaria la adición de un reactivo capaz de deprimir el mineral no valioso (Wills and Finch, 2016).

Los depresantes son utilizados para aumentar la selectividad en el proceso de flotación, que es logrado mediante la depresión de los componentes no valiosos mientras que el mineral de interés flota sin problema. Existen casos en los que la flotación es inversa, es decir, el mineral valioso se deprime y la ganga flota. Pueden ser orgánicos, inorgánicos, ácidos, sales, etc.

- **Modificadores de pH**

El pH de operación generalmente es alto en el proceso de flotación, lo cual es ventajoso porque los colectores son estables en condiciones alcalinas y, además, se minimiza el desgaste corrosivo de las celdas. Es importante mantener estas condiciones, ya que los colectores pueden perder su efectividad en un medio ácido. La cal, hidróxido de sodio, carbonato de sodio o amoníaco son algunos controladores de la alcalinidad.

En la flotación de sulfuros de cobre se utiliza cal como modificador de pH para alcanzar un pH alcalino (entre 10 y 12). Relacionado con esto, también se utiliza la cal para deprimir la pirita en este proceso.

1.2 Agua en Chile

Chile lidera la crisis hídrica. El informe publicado por Fragkou et al. (2022) indica que Chile se posiciona en el primer lugar en América latina en condición de “Estrés hídrico alto”. Por otro lado, se informa que el 53% de las comunas de Chile fueron declaradas en sequía hídrica en 2022, la mayoría de estas ubicadas en el norte del país.

La DGA monitorea un total de 25 embalses en 9 regiones del país. Hasta el 4 de julio del 2022 había 4.235 millones de m³ de agua, 563 millones de m³ más que el 2021. Sin embargo, el promedio histórico es de 5.908 millones de m³. Por otro lado, solo 15 de las 81 estaciones de la dirección general de aguas consideradas para el monitoreo de precipitaciones se encuentran con un superávit en relación con el promedio histórico (DGA, 2022).

Desde la región del Maule al norte, la totalidad de las aguas superficiales y subterráneas están asignadas por derechos de agua existentes. Por esta razón, junto a los datos recopilados por la DGA, se ha considerado como opción aceptable el uso de agua de mar en minería. Al 2018 existían 8 plantas desalinizadoras que abastecían a ciudades como Antofagasta y otros poblados pequeños. En 2021, en la minería unos 4 metros cúbicos por segundo provenían del mar, con o sin desalación (Banco Mundial, 2021).

1.2.1 Agua de mar en minería

Dentro de los recursos más importantes en la minería se encuentra el agua. El consumo de agua por sector económico en Chile muestra que la minería consume un 4% del recurso. Por otro lado, un 30% del agua utilizada en las extracciones de la gran minería tiene como fuente de suministro el mar (Consejo minero, 2021).

Existe una fuerte tendencia al aumento de la demanda de agua de mar, considerando el desfavorable escenario de las aguas continentales, especialmente en la zona norte del país. En la Figura 1.5 se presenta una proyección de la demanda de agua en la minería del cobre en el periodo 2020-2031, donde se puede ver que al año 2031, cerca del 50% del agua corresponderá a agua de mar (Cochilco, 2020).

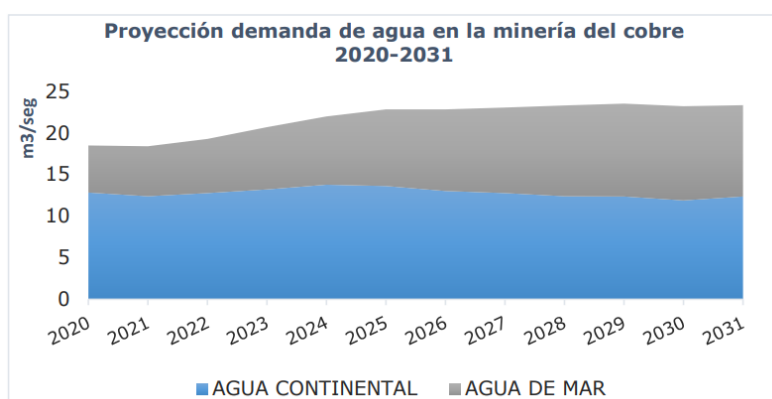


Figura 1.5: Proyección del consumo de agua de mar en la minería del cobre 2020-2031 (Cochilco, 2020).

- **Problemas del agua de mar en flotación**

El uso de agua de mar en la flotación de minerales sulfurados tiene asociados 2 grandes problemas. El primer problema corresponde al consumo de cal (modificador de pH utilizado en la industria minera del cobre), el cual aumenta aproximadamente 10 veces para alcanzar el pH de operación (aproximadamente 11) cuando se utiliza agua de mar. El segundo problema corresponde a la disminución en la recuperación del molibdeno, la cual se ve altamente afectada al pH de operación (Castro, 2012).

Los gráficos realizados por Castro (2012) se muestran en la Figura 1.6, donde se puede ver claramente que a pH 11 (pH de operación) el consumo de cal es 10 veces mayor en agua de mar que en agua dulce. Adicionalmente, al mismo pH, cae rápidamente la recuperación de molibdeno.

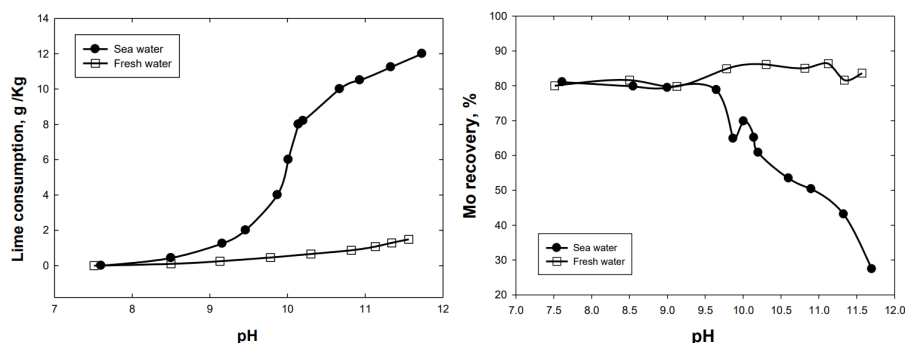


Figura 1.6: Efecto del agua de mar en la flotación de minerales (Castro, 2012).

El agua de mar está compuesta por una variedad de especies iónicas, como sodio, potasio, calcio, magnesio, cloro, entre otras, las cuales participan en 2 fenómenos que causan efecto en la flotación: efecto amortiguador y efectos secundarios de los iones. El primer efecto está relacionado con el aumento del consumo de cal, ya que el contenido iónico mostrado en la Tabla 1.1 del agua de mar le otorga propiedades amortiguadoras, provocando que el cambio del pH sea mucho más difícil. Por otro lado, el efecto secundario de los iones está relacionado con la adsorción de los iones sobre las superficies minerales hidrofóbicas, produciendo la depresión de estos, por lo tanto, disminuye la flotabilidad, por ejemplo, de la molibdenita (Jeldres et al., 2016).

Tabla 1.1: Contenido iónico del agua de mar (Jeldres et al., 2016).

Componente	Concentración g/kg	Componente	Concentración g/kg
H ₂ O	964,83	HCO ³⁻	0,104
Na ⁺	10,78	Br ⁻	0,0672
Mg ²⁺	1,28	CO ₃ ²⁻	0,0143
Ca ²⁺	0,41	B(OH) ₄ ⁻	0,00795
K ⁺	0,39	F ⁻	0,0013
Sr ²⁺	0,0079	OH ⁻	0,00014
Cl ⁻	19,35	B(OH) ₃	0,01944
SO ₄ ²⁻	2,71	CO ₂	0,00042

1.3 Bacterias en minería

Para solucionar los problemas mencionados en la sección anterior, se ha estudiado el uso de bacterias como reactivos de flotación. Los microorganismos oxidantes de sulfuro metálico han sido utilizados en biolixiviación en pilas. Estos son bacterias acidófilas (se desarrollan preferentemente en un medio ácido), aeróbicas (necesitan oxígeno) y quimiolitotrofos, que quiere decir que obtienen su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos y el carbono para generar masa celular a partir del CO₂ del aire (ciclo de Calvin-Benson) (Donati and Sand, 2007).

Los tres organismos más utilizados y estudiados en minería son: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. Estos organismos pertenecen a la clasificación de bacterias mesófilas (temperatura óptima de crecimiento hasta 40°C) y moderadamente termófilas (temperatura óptima de crecimiento entre 40 y 50 °C) (Donati and Sand, 2007).

En la siguiente sección se presentan algunos estudios relacionados con la bioflotación de minerales utilizando microorganismos quimiolitotrofos.

1.3.1 Bioflotación

La bioflotación corresponde a la flotación con microorganismos como reactivos. Al igual que lo hacen los colectores, activadores, depresantes, las bacterias deben ser capaces de modificar las propiedades superficiales de las partículas minerales, para favorecer la flotación y separación. La ventaja frente a los reactivos convencionales es que los microorganismos son biodegradables, por lo que no afectan al medioambiente.

El problema de separación selectiva de pirita de sulfuros ferrosos a pH ácido y neutro es complejo y ha sido desafiante. El uso de los microorganismos utilizados en la biolixiviación para la bioflotación ha sido estudiado por varios autores, los cuales son presentados en las siguientes secciones.

- **Bioflotación en agua dulce**

La separación selectiva de pirita y calcopirita por biomodulación en agua dulce fue estudiada por Chandrababha et al. (2004), donde se utilizó una cepa de *A. ferrooxidans* aislada de una muestra de Hutti Gold Mines. Los estudios de microflotación fueron llevados a cabo en un tubo Hallimond modificado, pasando gas nitrógeno con una tasa de 40 ml/min por 3 minutos.

La flotación de pirita y calcopirita se realizó a diferentes concentraciones de colector PIPX en el acondicionamiento, cuyos resultados obtenidos por el autor se muestran en la Figura 1.7 (a y b). Se puede ver que, para ambos casos, la recuperación aumenta con el aumento de la concentración de colector. Por otro lado, para la pirita, la recuperación es alta para pH ácido y disminuye a medida que el pH aumenta. La recuperación de la calcopirita se mantiene casi constante en todo el pH.

Se estudió también la recuperación de pirita y calcopirita, luego de la interacción con *A. ferrooxidans* más un acondicionamiento posterior con colector “PIPX”, cuyos resultados se muestran en la Figura 1.7 (c y d). Al comparar los gráficos de la Figura 1.7, se puede ver que el acondicionamiento con bacterias provoca una disminución en la recuperación, en promedio, de 50 % y 20 % para pirita y calcopirita, respectivamente. Esto indica una disminución de flotabilidad en pirita mayor a la provocada para calcopirita. Por lo tanto, *Acidithiobacillus ferrooxidans* es selectiva con la pirita.

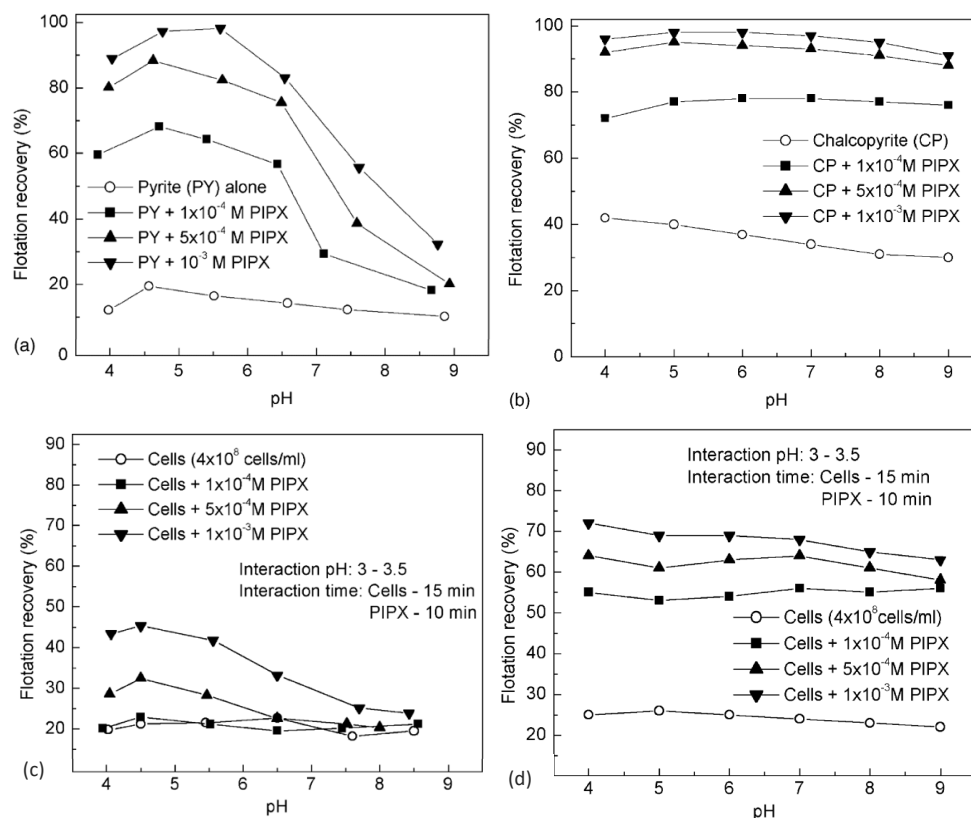


Figura 1.7: Recuperación de flotación (a):pirita + PIPX (b):calcopirita + PIPX (c):pirita + células + PIPX (d):calcopirita + células + PIPX (Chandraprabha et al., 2004)

• Bioflotación en agua de mar

San Martín et al. (2018) estudiaron la biodepresión de la pirita usando *Acidithiobacillus ferrooxidans* en distintos medios: agua dulce, agua salina y agua de mar. Las bacterias utilizadas correspondían a la cepa ATCC19859, las cuales se cultivaron a 30°C en un medio basal estéril. Todos los experimentos fueron realizados con células frescas, cosechadas al tercer día de incubación. Los estudios de flotación se llevaron a cabo en una celda de flotación Hallimond de 100 ml. Se utilizaron distintos pH de agua dulce (agua destilada), agua salina (preparada con agua destilada y NaCl con una concentración de 35 g/l) y agua de mar (extraída de la costa central de Chile).

La Figura 1.8 presenta los gráficos obtenidos por San Martín et al. (2018) de recuperación en función del pH para los distintos medios utilizados. De esta se puede ver que es posible deprimir pirita usando *Acidithiobacillus ferrooxidans* en agua dulce, agua salina y agua de

mar. La importancia de este estudio radica en la posibilidad de deprimir la pirita en agua de mar al pH natural de esta, el cual corresponde a 8 aproximadamente. En base a los problemas que fueron presentados en la sección de Problemas del agua de mar en flotación, esto podría solucionarse, debido a que no se verá afectado el consumo de cal ni la recuperación de molibdeno.

Se realizaron bioflotaciones en agua de mar al pH natural 8. La concentración de *A. ferrooxidans* y colector xantato en el acondicionamiento fue de 3×10^8 bacterias/ml y $4,74 \times 10^{-5}$ M, respectivamente. Se obtuvo una recuperación de 97% para la pirita, calcopirita y molibdenita cuando solo se acondicionaron con colector. La recuperación de pirita disminuyó a 36% desde 97% cuando se acondicionó con bacterias y colector, sin embargo, la recuperación de molibdenita y calcopirita casi no se ve afectada. Por otro lado, cuando se invirtió el orden, es decir, agregar primero colector y luego bacteria, la recuperación obtenida fue de 64%.

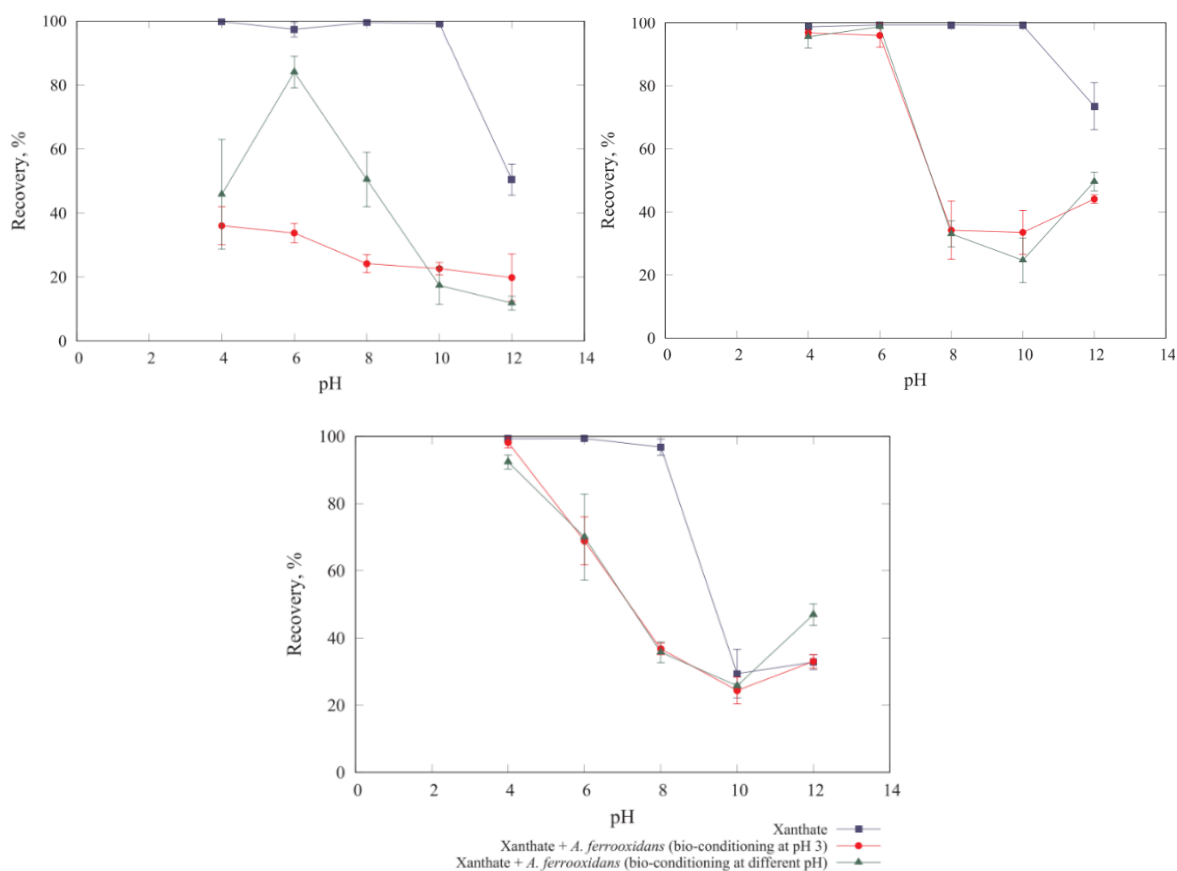


Figura 1.8: Efecto de *A. ferrooxidans* en la recuperación de pirita en (a) agua dulce (b) agua salina (c) agua de mar (San Martín et al., 2018).

San Martín et al. (2021) también estudiaron la biodepresión de pirita activada con cobre. Se utilizó el microorganismo *Acidithiobacillus ferrooxidans* y se realizaron microflotaciones en agua dulce y agua de mar. Los resultados en agua dulce (Figura 1.9) muestran que la presencia de la bacteria disminuye la flotabilidad de la pirita en todo el rango de pH, alcanzándose una mayor depresión del mineral a pH 4 y 6. Por otro lado, los resultados en agua de mar (Figura 1.10) muestran que la presencia del microorganismo, cuando la concentración de sulfato de cobre es 0, disminuye la flotabilidad del mineral desde pH 8.

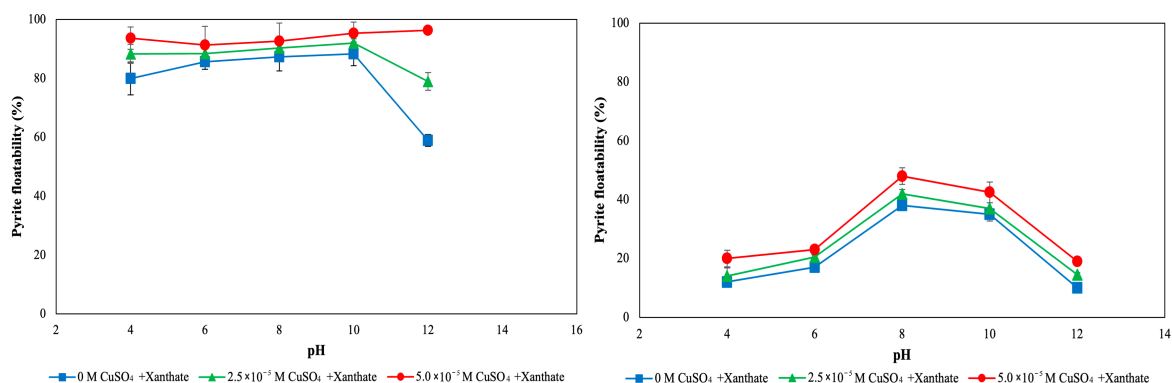


Figura 1.9: Efecto de *A. ferrooxidans* en la flotabilidad de pirita en agua dulce

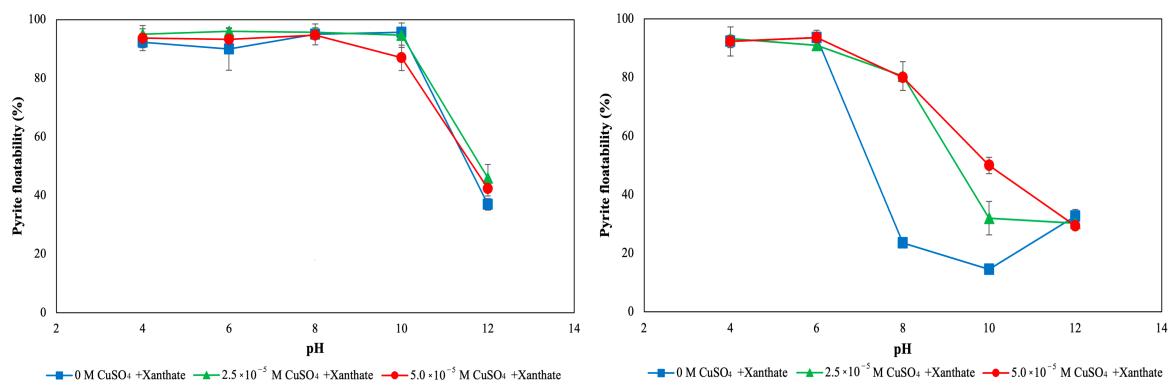


Figura 1.10: Efecto de *A. ferrooxidans* en la flotabilidad de pirita en agua de mar.

1.3.2 Mecanismo de adherencia

Aumentar el nivel de depresión de la pirita en bioflotación podría ser posible luego de entender los mecanismos de adherencia y biodepresión. San Martín et al. (2020) realizaron una campaña experimental exploratoria para comprender mejor los mecanismos involucrados en la biodepresión de pirita con *A. ferrooxidans*.

Estudiaron el cambio en la hidrofobicidad de la pirita mediante la medición del ángulo de contacto. Se llevaron a cabo experimentos de cinética de adherencia, para evaluar si la depresión de la pirita es producto de la adherencia de las bacterias. Por último, se realizaron mediciones de potencial de flujo de las bacterias y el mineral para evaluar la influencia de las fuerzas electrostáticas.

En todos los casos el bioacondicionamiento se realizó con agua de mar a pH 8 por 15 minutos. Los resultados de las mediciones de ángulo de contacto son presentados en la Tabla 1.2 y se comparan con las recuperaciones obtenidas en los distintos casos por San Martín et al. (2018). Se puede ver que el ángulo de contacto de la pirita sin acondicionamiento tiene un valor de 91° , cuyo valor disminuye a 16° cuando está en agua de mar con una recuperación de 18%. Al acondicionar con colector, el ángulo aumenta a 54° y la recuperación a 97%. Al acondicionar con colector y bacteria, el ángulo aumenta 5° , pero la recuperación disminuye a 64%. Al acondicionar solo con bacterias, el ángulo de contacto obtenido fue de 42° , cuyo valor también permanece casi invariante cuando se agrega el colector (44°), pero la recuperación de pirita obtenida fue de 36%. Debido a que la hidrofobicidad no disminuye al aplicar bacterias solas (ya que el ángulo de contacto aumenta de 16° a 42°), se puede concluir que las bacterias previenen el efecto del colector. Cuando se agregan bacterias y luego colector, el ángulo es de 44° , mientras que si se agrega colector solo es de 54° . Lo anterior indica que la disminución en la recuperación no es producto de un cambio en la hidrofobicidad de la superficie de la pirita.

Tabla 1.2: Ángulo de contacto de la pirita en agua de mar a pH 8 y recuperación (San Martín et al., 2020) cuando se acondiciona de distintas formas.

Condición	Ángulo de contacto (°)
Sin acondicionamiento	$91 \pm 6,5$
Agua de mar	$16 \pm 6,8$
Colector	$54 \pm 3,5$
Colector y bacterias	$59 \pm 1,4$
Bacterias	$42 \pm 5,4$
Bacterias y colector	$44 \pm 5,8$

Los resultados de los experimentos de cinética de adhesión y potencial de flujo se muestran en la Figura 1.11.a. Se puede ver que, a un pH mayor, existe una mayor adherencia de las bacterias. Si se comparan estos resultados con la Figura 1.8.c es posible decir que la adherencia de las bacterias a la pirita es parte del mecanismo de depresión de esta, ya que mientras más se adhieren, más se deprime. Por otro lado, de la Figura 1.11.b se puede ver que a pH 8 en agua de mar, la pirita y *A. ferrooxidans* están cargadas negativamente, mientras que a pH 4, estaban con carga opuesta. De manera simultánea, a pH 8 se obtuvo una mayor adherencia de las bacterias a la pirita, por lo tanto, se descarta que las fuerzas electrostáticas participen en la unión de *A. ferrooxidans* a pirita, ya que a pH 8 la fuerza electrostática es repulsiva.

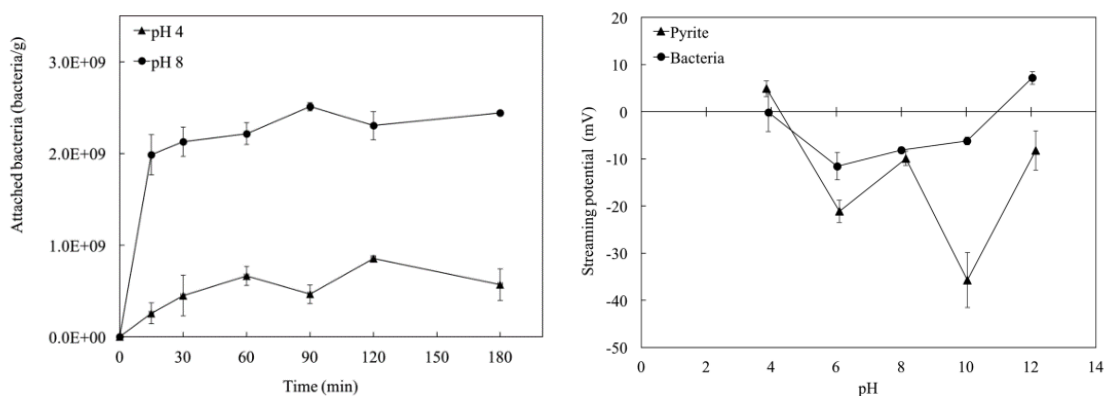


Figura 1.11: Resultados de (a) cinética de adhesión de las bacterias a la pirita y (b) potencial de flujo en agua de mar (San Martín et al., 2020).

Fuerzas electrostáticas

Las fuerzas electrostáticas corresponden a interacciones que se dan entre cuerpos que poseen carga eléctrica. La fuerza puede ser de atracción (cuerpos con igual carga) o de repulsión (cuerpos con distinta carga). El estudio de las fuerzas electrostáticas como mecanismo de adherencia de *A. ferrooxidans* a pirita fue realizado por San Martín y Aguilar (2019) y por San Martín et al. (2020).

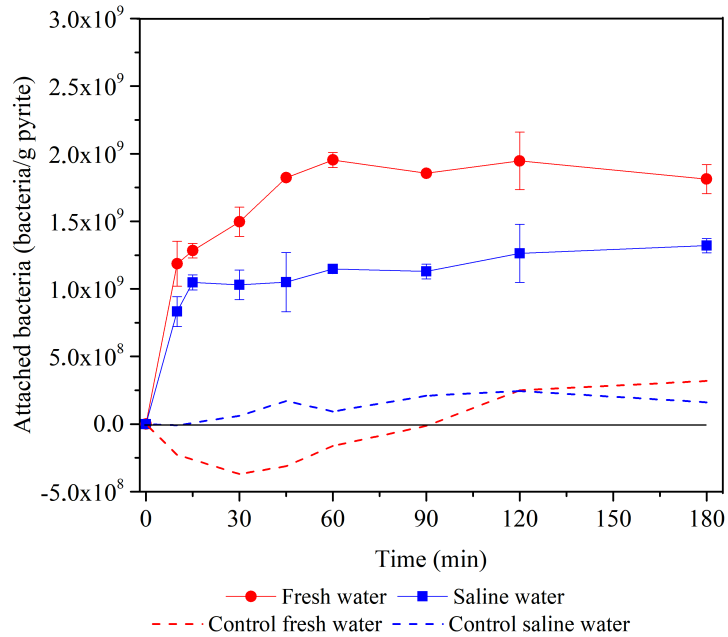


Figura 1.12: Cinética de adherencia de *A. ferrooxidans* a pirita en agua fresca y agua salina (35 g/l NaCl) a pH 4. Los controles son experimentos sin minerales (solo bacterias y agua) (San Martín y Aguilar., 2019).

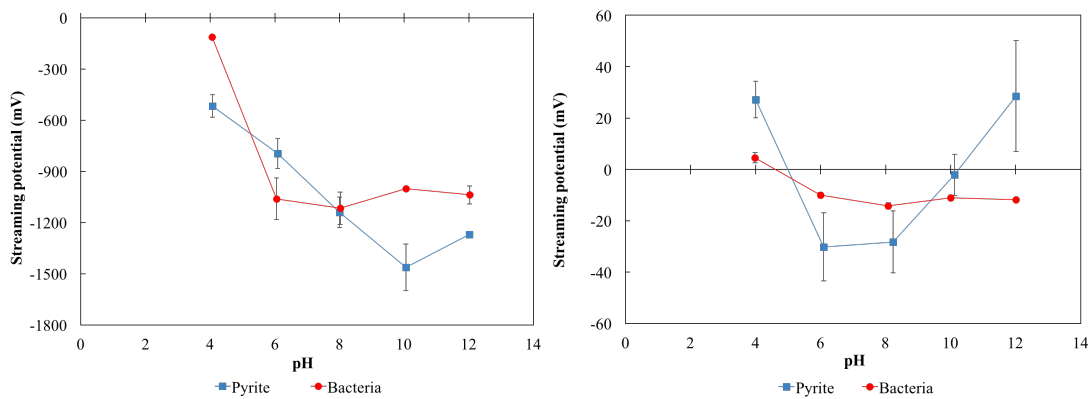


Figura 1.13: Potencial de flujo de *A. ferrooxidans* y pirita en (a) agua fresca, (b) agua salina.

En el estudio realizado por San Martín y Aguilar (2019) se realizaron experimentos de adherencia a pH 4 en agua dulce y agua salina (35 g/l NaCl). En la Figura 1.12 se puede ver que la adherencia es mayor en agua fresca que en agua salina. Por otro lado, en la Figura 1.13 se puede ver que a pH 4 la carga de pirita y bacteria son iguales, negativas en agua dulce y positivas en agua salina. Por lo tanto, de este estudio se concluye que la mayor adherencia resultante en agua fresca no es producto de las fuerzas electrostáticas cuando se trabaja en agua fresca y salina.

Por otro lado, San Martín et al. (2020) realizaron experimentos de adherencia a pH 4 y 8 en agua de mar. En la Figura 1.11 se puede ver que en agua de mar, existe una mayor adherencia a pH 8 que a pH 4 y que a pH 8, la pirita y *A. ferrooxidans* están cargadas negativamente, existiendo una fuerza repulsiva entre estas. Por lo tanto, se descartan las fuerzas electrostáticas como mecanismo de adherencia entre pirita y *A. ferrooxidans*.

Fuerzas hidrofóbicas

En primer lugar, las fuerzas hidrofóbicas corresponden a interacciones que mantienen la cohesión entre compuestos apolares inmersos en una solución o solvente polar. La causa física de las fuerzas hidrofóbicas se basa en la incapacidad de las sustancias apolares de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua en una solución. Al entrar en contacto con el agua, las moléculas apolares o hidrofóbicas tienden a agregarse espontáneamente, intentando conseguir la mayor estabilidad al disminuir el área de superficie de contacto con el agua.

Dado que no se descartaron las fuerzas hidrofóbicas, es importante realizar correctas mediciones y estudios de esta propiedad superficial. Para ello, se presentan distintos métodos, utilizados por algunos autores, para medir la hidrofobicidad en relación con el ángulo de contacto y al método de partición líquido-líquido.

- **Ángulo de contacto**

Hanning y Rutter (1989) utilizaron 3 métodos para medir el ángulo de contacto: unión burbuja-partícula, gota sésil y succión capilar. Se realizaron experimentos de flotación en una celda de flotación miniatura que fue especialmente construida.

Unión burbuja-partícula:

Se basa en determinar la partícula más grande que puede ser elevada, contra gravedad, por una burbuja de aire en condiciones estándar. Se agregó un gramo de una fracción de tamaño estrecho de partículas de carbón a 20 ml de agua en un matraz cónico y se mezcló a mano por 5 minutos para humectar la mezcla. Se introdujo una burbuja de aproximadamente 1,5 mm de diámetro, por medio de un tubo capilar. Cuando la burbuja entra en contacto con la partícula, se eleva el tubo capilar. Se determina que la fijación tiene lugar si la observación mediante un microscopio mostraba que la burbuja había levantado la partícula. El radio máximo de partícula (R_{max}) se tomó como el tamaño más grande en la fracción más gruesa donde se logró la unión de partículas. El ángulo de contacto fue encontrado mediante la Ecuación 1.1 $R_{max} = \sqrt{\frac{3\gamma_{LV}}{2\Delta\rho g}} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$, que indica el límite superior de flotabilidad de una esfera sumergida, en ausencia de fuerzas cortantes.

$$R_{max} = \sqrt{\frac{3\gamma_{LV}}{2\Delta\rho g}} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Ecuación 1.1}$$

Donde:

R_{max} es el radio máximo de partícula que se une

γ_{LV} es la tensión superficial del líquido

$\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre el sólido y el líquido sumergidos

g es la aceleración de gravedad

θ es el ángulo de contacto

Gota sésil

Se llama gota sésil a una gota apoyada sobre la superficie de un sólido. Las muestras de carbón seleccionadas para los experimentos de este método se prepararon moliendo una superficie plana (molienda manual Metaserve), seguido de pulido de polvo de alúmina. Luego se lavó la superficie con agua destilada, dejándola libre de polvo de alúmina. Se midieron los ángulos de contacto utilizando un goniómetro de ángulo de contacto “Krüss”. Se dispuso una gota de líquido sobre la superficie de carbón que fue pulida y el ángulo se

midio a través de la fase líquida como la tangente en el punto de contacto en la superficie de carbón.

Este método también fue utilizado por MISRA et al. (1996). Las mediciones de ángulo de contacto en este estudio se realizaron utilizando un goniómetro de ángulo de contacto Rame-Hart (Modelo N° 100). El pH de las mezclas de *A. ferrooxidans* se ajustó con ácido sulfúrico diluido (pH=2,4) y se acondicionaron junto a una muestra de pirita en un agitador rotativo a 25°C por 30 minutos.

- **Método “Magnobead”**

Straver y Kijne (1996) estudiaron la hidrofobicidad mediante la adhesión de células de levadura a perlas de látex paramagnéticas recubiertas de poliestireno, donde mientras más células se adhieran a las perlas, más hidrofóbicas serán. Se cosecharon las células de levadura en la fase de crecimiento estacionario temprano y se lavaron dos veces con agua desionizada. Luego, las células se suspendieron en acetato de sodio buffer de 50 mM a pH 4,5. Se transfirieron 985 µl de la suspensión a un tubo de vidrio y se agregaron 15 µl de perlas de latex, cuya mezcla se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y bajo continua agitación, con una densidad óptica a 660 nm de A660. Posteriormente, se dispuso un imán de Sm-Co junto al tubo de vidrio por 2 minutos y se determinó la densidad óptica a la suspensión celular restante. El porcentaje de adherencia se obtiene mediante la Ecuación 1.2:

$$A\% = \frac{A_{start} - A_{final}}{A_{start}} \times 100\% \quad \text{Ecuación 1.2}$$

En la Figura 1.14 se presenta un esquema donde se puede entender de mejor manera el procedimiento del método de “Magnobead”.

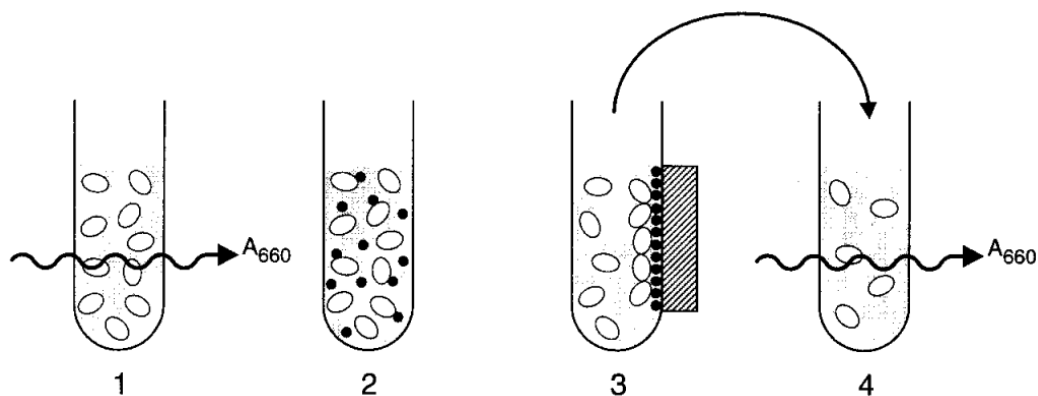


Figura 1.14: Representación esquemática de método “Magnobead”(Straver and Kijne, 1996).

- **Partición líquido-líquido**

Zita y Hermansson (1997) llevaron a cabo experimentos de cromatografía por interacción hidrofóbica. La solución bacteriana (107 células/ml) se dispusieron en una columna con un gel hidrofóbico. Se eluyeron las muestras (lavarón con solvente) con 12 ml de PBS (solución salina de fosfato amortiguada). La cantidad de células eluidas se obtuvo mediante microscopia de epifluorescencia de muestras teñidas de naranja de acridina que fueron filtradas en filtros de nucleoporos preteñidos de 0,2 μm . La hidrofobicidad se obtuvo como $100 \times (a-b)/a$, donde a es la cantidad de células añadidas a la columna y b es la cantidad de células en el eluido. Esta metodología es útil para comparar la hidrofobicidad entre dos células, siendo la más hidrofóbica aquella que tiene un porcentaje mayor de células adheridas.

El experimento se realizó con 4 ml de suspensión bacteriana (5×10^7 células/ml) mezclados con 1 ml de n-hexadecano por 2 minutos. Se dejó que la fase acuosa y orgánica se separaran durante 15 minutos y se tomaron muestras de 0,1 ml de la fase acuosa y se tomó una muestra también de la cantidad de células determinada por microscopía de epifluorescencia. La hidrofobicidad se determinó de la misma forma.

Rosenberg et al. (1980) también estudió la adherencia de bacterias a hidrocarburos para medir la hidrofobicidad de la superficie celular. Se utilizaron distintas bacterias las cuales se cultivaron a 30°C con agitación en solución con nutrientes. Se cosecharon en la etapa de crecimiento temprano logarítmico, se lavaron dos veces y se resuspendieron en una solución buffer. Se contenían 1,2 ml de células lavadas en tubos de ensayo y se añadieron varios

volúmenes de hidrocarburos de prueba (n-hexadecano, n-octano o p-xileno). Luego de 10 minutos de pre-incubación a 30°C, se agitó la mezcla uniformemente por 2 minutos. Se permitió la separación de la fase acuosa y de hidrocarburos, para luego eliminar la fase acuosa y transferirla a una cubeta de 1 ml con una pipeta. Finalmente, se midió la absorbancia de luz a 400 nm utilizando un espectrofotómetro.

1.3.3 Adherencia bacteriana e hidrofobicidad

La relación entre adherencia e hidrofobicidad de *A. ferrooxidans* ha sido escasamente estudiado. Sin embargo, existen estudios que permiten extraer información útil para este estudio. En el estudio realizado por Gehrke et al. (2001) utilizaron células bacterianas que contenían sustancias poliméricas extracelulares (EPS), entre las cuales se encontraba *A. ferrooxidans*, para analizar la composición de las EPS.

Se estudió la unión de bacterias a distintos sustratos (naturales y artificiales) mediante cromatografía en columna con un intercambiador de iones fuertemente ácido o fuertemente básico, o una resina adsorbente hidrófoba. Se añadieron muestras de 0,5 ml que contenían 10^8 células. Después del enjuague, los EPS adheridos se eluyeron con HCl 0,5 M (intercambiador de cationes), NaCl 0,5 M (intercambiador de aniones) o metanol puro (adsorbente). El número de células se determinó mediante recuento. La unión a sustratos naturales (pirita, azufre) se determinó mediante la reducción del número de células planctónicas o la disminución de EPS suspendidos.

Los resultados más relevantes son, en primer lugar, que el rendimiento de EPS de *A. ferrooxidans* dependía del sustrato utilizado en el cultivo. Las células cultivadas con sulfato de hierro (II) produjeron poco EPS, mientras que las cultivadas con sustratos sólidos como la pirita produjeron la mayor cantidad. Por otro lado, los resultados de adherencia de la bacteria a distintos sustratos muestran que, cuando la bacteria es cultivada con sulfato de hierro (II) como sustrato, *A. ferrooxidans* no se adhiere a la resina hidrófoba a un pH 2.

Por otro lado, Solari et al. (1992) realizó estudios sobre fenómenos interfaciales que afectan la adhesión de *A. ferrooxidans* a superficies de minerales sulfurados. Se realizaron estudios de movilidad electroforética, experimentos de partición líquido-líquido para evaluar la hidrofobicidad y estudios de cinética de adherencia.

Los resultados más importantes obtenidos fueron que la adhesión de las bacterias al hexadecano aumenta a medida que el pH se vuelve más ácido, por lo tanto, parecería que un aumento en la acidez aumenta la hidrofobicidad de la pared celular bacteriana. El aumento de la hidrofobicidad celular al disminuir el pH puede estar relacionado con la neutralización de los grupos carboxílicos ionizados en los componentes de ácidos grasos de la pared celular externa a esta fuerza iónica tan alta.

2. Metodología

En esta sección se presenta la metodología utilizada en los experimentos realizados.

2.1 Microorganismos

La bacteria utilizada en los experimentos correspondió a *Acidithiobacillus ferrooxidans* Cepa ATCC19859. Esta bacteria es acidófila y termófila, por lo tanto, las condiciones óptimas de crecimiento de esta bacteria fueron: pH 1,6 y temperatura 30 °C.

2.1.1 Cultivo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Para el cultivo de *A. ferrooxidans* se realizó el medio de cultivo con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄ x 7H₂O) y hidrogenofosfato de di-potasio trihidratado (K₂HPO₄ x 3H₂O). Las concentraciones utilizadas se muestran en la Tabla 2.1, en gramos por litro de agua destilada. Dado que la bacteria es acidófila, se modificó el pH hasta llegar a 1,6 con ácido sulfúrico concentrado, agregando gota a gota, mientras se agitaba la mezcla en agitador magnético y se medía el pH con medidor de pH.

Tabla 2.1: Concentración de reactivos para medio de cultivo de bacterias

Reactivo	dosis g/l de sol
Sulfato de amonio	0,4
Sulfato de magnesio heptahidratado	0,4
Hidrogeno fosfato de di-potasio trihidratado	0,056

Dado que se trabajó con bacterias, fue importante mantener la esterilidad, para no contaminar las bacterias con otros microorganismos del ambiente. El medio de cultivo se esterilizó junto a los demás materiales necesarios para el cultivo, como filtro con membrana de 0,22 µm, matraz Erlenmeyer, matraz Kitasato, puntas y probeta en Autoclave de sobremesa de 18 litros FSF-18LDJ por 20 minutos.

Luego se preparó la solución de sustrato, que correspondía a sulfato de hierro. En un vaso precipitado se agregó el sustrato en estado sólido y se disolvió con medio de cultivo en agitador magnético. La solución homogénea obtenida se aforó en matraz de aforo, donde se

alcanzó una concentración de 33% (p/v). Para esterilizar la solución de sulfato de hierro se filtró con filtro y membrana de 0,22 μm en matraz Kitasato que se conectó a bomba de vacío.

Finalmente, en matraz Erlenmeyer se preparó la mezcla para el cultivo. Se agregó el 40% del total del volumen. Con probeta estéril se agregó el medio de cultivo, correspondiente a 90,5% del volumen agregado. Con micropipeta se agregó solución de sustrato (sulfato de hierro al 33% p/v) e inóculo de bacterias, correspondiente a 5% y 4,5% del volumen agregado, respectivamente. Finalmente, se llevó el matraz Erlenmeyer al Shaker a 30°C y 100 rpm. En la Figura 2.1 se puede observar en el matraz del lado izquierdo el cultivo de bacterias recién realizado y en el lado derecho el matraz con varios días de cultivo almacenado en Shaker.

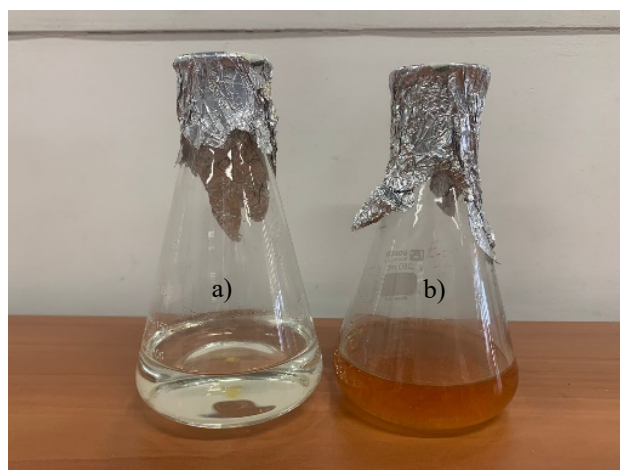


Figura 2.1: Cultivo de bacterias: a) Recién preparado y b) Con días de incubación.

2.1.2 Concentración de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Se estudió el efecto de la concentración de *A. ferrooxidans*. Para ello, se retiró el matraz Erlenmeyer del Shaker luego de mínimo dos días y se filtró la solución en filtro Whatman, para eliminar posibles precipitados de hierro. Luego, la solución resultante se filtró en filtro con membrana de 0,22 μm , para retener las bacterias. Las bacterias retenidas en la membrana se re-suspendieron con solución al pH correspondiente a cada experimento en un vaso precipitado.

2.1.3 Conteo de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Para obtener el valor de la concentración, se debió realizar el conteo de la bacteria. Para ello, se utilizó microscopio OLYMPUS CX26 y cámara Neubauer. Con micropipeta se pusieron cuidadosamente 20 µl en cámara Neubauer y se observó directamente en microscopio con objetivo 40x. Se consideró el volumen de cada compartimiento de la cámara para estimar el valor de la concentración. Para mejorar la comprensión del conteo, en la Figura 2.2 se presenta una imagen tomada desde el microscopio de la cámara Neubauer. Se debió contar el número de bacterias en 3 cuadrados, se promedió y se dividió en el volumen de cada cuadrado.

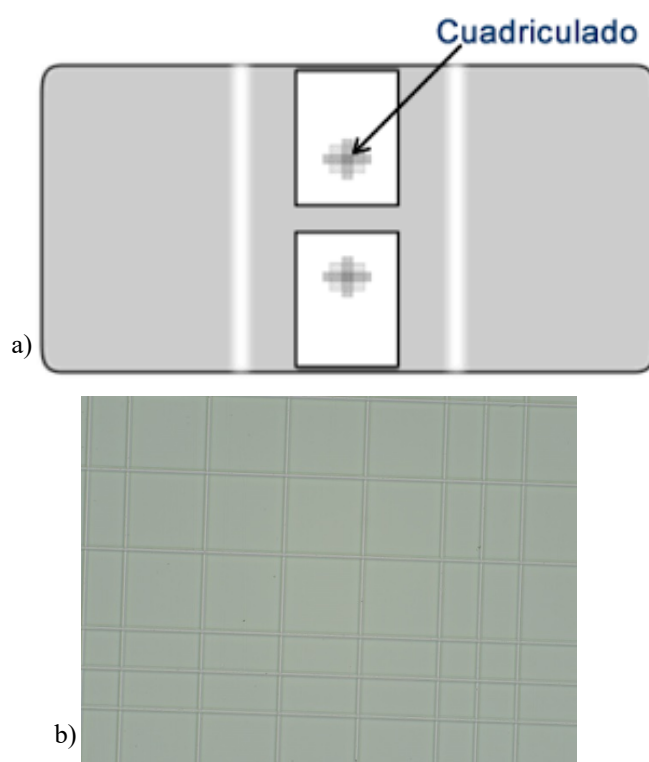


Figura 2.2: a) Esquema de cámara Neubauer, b) Visualización de cuadros de cámara Neubauer en microscopio.

2.2 Medios acuosos

Se analizó el comportamiento en distintos medios, agua dulce y agua de mar. En esta sección se detalla cada uno de estos. Se modificó el pH de ambas soluciones a 2, 4, 6, 8, 10. Se utilizó pipeta Pasteur para introducir gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) o hidróxido de sodio (NaOH), para disminuir o aumentar el pH, respectivamente.

2.2.1 Agua dulce

El agua dulce utilizada correspondió a agua destilada de laboratorio.

2.2.2 Agua de mar

El agua de mar utilizada correspondió a agua de mar artificial. Se preparó según la metodología propuesta por Kester et al. (1967). Se pesaron las sales gravimétricas y sales volumétricas según las concentraciones de la Tabla 2.2. Se mezclaron y se diluyeron con agua destilada, conservando las concentraciones. Se mezclaron con agitador a 900 rpm. Esto permitió ingresar aire a la solución y aumentar el pH de la solución, hasta llegar a pH entre 7,8 y 8,2, pH natural del agua de mar.

Tabla 2.2: Concentración de sales para producción de agua de mar artificial (Kester et al., 1967).

Sales gravimetricas	g/mol	g/l de sol
NaCl	58,44	23,926
Na ₂ SO ₄	142,04	4,008
KCl	74,56	0,677
NaHCO ₃	84,01	0,196
KBr	119,00	0,098
H ₃ BO ₃	61,83	0,026
NaF	41,98	0,003
Sales volumétricas	g/mol	moles/l sol
MgCl ₂ 6H ₂ O	203,31	0,05327
CaCl ₂ 2H ₂ O	147,01	0,01033
SrCl ₂ 6H ₂ O	266,62	0,00009

2.2.3 Solución apolar

La solución apolar correspondió a hexadecano. Los volúmenes utilizados siguieron una proporción de 50/50 de solución polar y apolar.

2.3 Partición líquido-líquido

La metodología que fue utilizada para determinar la hidrofobicidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* corresponde al método de partición líquido-líquido. Los experimentos de partición se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Rosenberg et al. (1980).

En tubos de centrifugado se agregaron 5 ml de bacterias resuspendidas a distintas concentraciones (orden 10^8 bacterias/ml) y a distintos; pH 2, 4, 6, 8 y 10 y 5 ml de líquido apolar (hexadecano). La solución se mezcló en agitador vortex por 2 minutos y se dejó en Shaker a 30°C.

2.4 Conteo directo

El conteo directo de bacterias es la herramienta que fue útil para analizar la afinidad de la bacteria con ciertos medios. Esta herramienta se empleó para obtener la hidrofobicidad de *A. ferrooxidans* y se basó en medir la concentración de bacterias en el líquido polar.

Luego de 60 y 120 minutos, se eliminó el líquido apolar del tubo centrífugo y se realizó el conteo de bacterias en la fase acuosa con ayuda del microscopio para cada caso. Todos los experimentos se realizaron por triplicado

2.5 Cinética de adherencia

Previo a realizar los experimentos de adherencia, el mineral debe ser preparado. Para ello, se reduce el tamaño del mineral (pirita), pasando por un proceso de chancado, molienda y tamizado. El rango de tamaño corresponde a -70# + 400#. Posterior a la reducción de tamaño, se realiza una limpieza para eliminar el óxido del mineral. La limpieza se realiza con HCl a una concentración de 6N. El mineral se enjuaga con agua destilada y posteriormente se seca en horno.

Se mezclaron 20 ml de solución polar a distintos pH (2, 4, 6, 8 y 10) con bacterias con 1 g de pirita en un matraz Erlenmeyer de 50 ml. Se dejó el matraz en Shaker a 30°C y a 100 rpm. Las muestras se tomaron a los 5, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos y se realizó el conteo de bacterias con cámara Neubauer en microscopio.

2.6 Diagrama del procedimiento

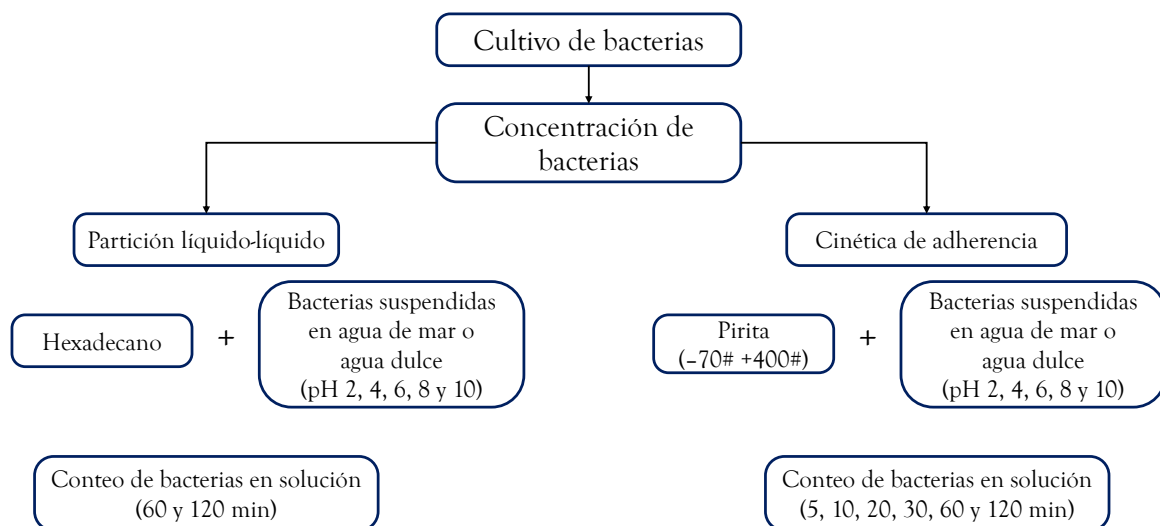


Figura 2.3: “Diagrama de procedimiento”

La Figura 2.3 muestra gráficamente la metodología realizada. Es importante entender que los experimentos de partición líquido-líquido se realizaron sin mineral ya que se requiere conocer la condición de hidrofobicidad intrínseca del microorganismo en las distintas condiciones establecidas para luego relacionarlo con el comportamiento de la bacteria adherida al mineral.

3. Resultados y Discusión

En esta sección se presentan los resultados obtenidos para cada una de las metodologías propuestas, junto con el análisis y discusión correspondiente.

3.1 Partición líquido-líquido

3.1.1 Agua dulce

La Tabla 3.1 muestra los resultados obtenidos en las pruebas de partición líquido-líquido realizadas a distintos pH en agua dulce (agua destilada).

Se puede ver que al tiempo de 60 minutos, el porcentaje de bacterias transferidas a la fase orgánica alcanza un valor máximo de 39 % a pH 6 y un valor mínimo de 17 % para pH 8 . Para 120 minutos se observa la misma tendencia, alcanzando un valor máximo de 44 % a pH 6 y mínimo de 22% a pH 2. Estos resultados indican que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es más hidrofóbica a pH ácido, teniendo mayores valores a pH 6.

En la Tabla 3.1 se puede ver una variación entre los porcentajes de bacterias en la fase orgánica (hexadecano) menor a 10% entre los 60 y 120 min. Esto podría indicar que a los 60 min ya se está alcanzando el equilibrio de transferencia de bacterias.

Tabla 3.1: Resultados experimentos partición líquido-líquido para 60 y 120 minutos en agua dulce.

pH	% de Bacterias en hexadecano	
	60 min	120 min
2	26%	22%
4	27%	40%
6	39%	44%
8	17%	26%
10	22%	29%

Los resultados obtenidos para 120 minutos de contacto entre las bacterias y ambos líquidos, indican que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es más hidrofóbica a pH 6 y 4 y tiene un menor valor a pH 2. Este resultado está en línea con uno de los resultados obtenidos por Gehrke et al. (2001), donde a un pH 2, *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivada con sulfato de hierro como sustrato no se adhiere a resina hidrofóbica, indicando que a un pH más ácido, la bacteria es más hidrofílica.

Por otro lado, según los resultados obtenidos por Solari et al. (1992), la hidrofobicidad de *A. ferrooxidans* aumenta con la acidez. Es importante analizar la composición de los EPS de la bacteria en función del pH, ya que, como se menciona en dicho estudio, la neutralización de los grupos carboxílicos ionizados en los componentes de ácidos grasos de la pared celular podría afectar en la variación de la hidrofobicidad.

3.1.2 Agua de mar

La Tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos en los experimentos de partición líquido-líquido realizados a distintos pH en agua de mar artificial.

Se observa que al tiempo de 60 minutos, los mayores porcentajes de hidrofobicidad fueron para pH 8 y pH 10, cuyos valores corresponden a 54 y 37 %, respectivamente, frente a un promedio de 19% para los pH ácidos (2, 4 y 6). Para 120 minutos, los resultados muestran una tendencia similar que para 60 min. El porcentaje de bacterias en la solución apolar es mayor para pH básicos (63% para pH 8 y 47% para pH 10). Para pH ácido, en promedio se tiene un 15% de bacterias en hexadecano. Estos resultados indican que *Acidithiobacillus ferrooxidans* es más hidrofóbica a pH básico y que existe una relación entre el pH y la hidrofobicidad cuando las bacterias están en agua de mar.

En la Tabla 3.2 se puede ver un aumento menor a 10 % en promedio entre los porcentajes de bacterias en la fase orgánica (hexadecano) a 60 y 120 min para todos los pH. Esto podría indicar que a los 60 min ya se está alcanzando el equilibrio. Por lo tanto, entre 60 y 120 min, la cantidad de bacterias transferidas desde la fase acuosa (agua dulce en este caso) al hexadecano es menor.

Por otro lado, nuevamente el resultado obtenido es comparable y está acorde con uno de los resultados obtenidos por Gehrke et al. (2001), donde a un pH 2, *Acidithiobacillus ferrooxidans* cultivada con sulfato de hierro como sustrato no se adhiere a resina hidrofóbica, indicando que a un pH más ácido, la bacteria es más hidrofílica.

Es posible relacionar estos resultados con los obtenidos por San Martin et al. (2020a), donde se concluyó que *A. ferrooxidans* se adhiere a la pirita y aumenta la depresión del mineral en agua de mar. Los resultados de la Tabla 3.2 muestran que la bacteria tiene una condición de mayor hidrofobicidad al pH donde la adherencia es mayor (pH 8) y por lo tanto, podría estar produciéndose la adherencia por fuerzas hidrofóbicas, ya que *A. ferrooxidans* no podrá establecer enlaces con el agua y buscará adherirse a la superficie sólida de la pirita.

Finalmente, la presencia de distintas sales podrían producir variación en la composición de los EPS, causando que el porcentaje de bacterias transferidas al hexadecano sea mayor a pH básico, a diferencia de los resultados obtenidos por Solari et al. (1992), donde se obtuvo que la hidrofobicidad de *A. ferrooxidans* aumentaba con la acidez.

Tabla 3.2: Resultados experimentos partición líquido-líquido para 60 y 120 minutos en agua de mar.

pH	% de Bacterias en hexadecano	
	60 min	120 min
2	17%	27%
4	24%	9%
6	15%	8%
8	54%	63%
10	37%	47%

3.2 Cinética de adherencia

Los resultados obtenidos para la cinética de adherencia de *A. ferrooxidans* a pirita se muestran en los siguientes ítems.

3.2.1 Agua dulce

La cinética de adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a la pirita en agua dulce para concentraciones baja, media y alta se presenta en la Figura 3.1, Figura 3.2 y Figura 3.3, respectivamente. Para los experimentos realizados con concentración baja (Figura 3.1), se pueden ver valores de concentración negativos. Por ello, es importante mencionar que el conteo de bacterias se realiza mediante conteo directo desde cámara Neubauer en microscopio, por lo que existe un error intrínseco al método que produce valores negativos en la concentración de bacterias adheridas a la pirita.

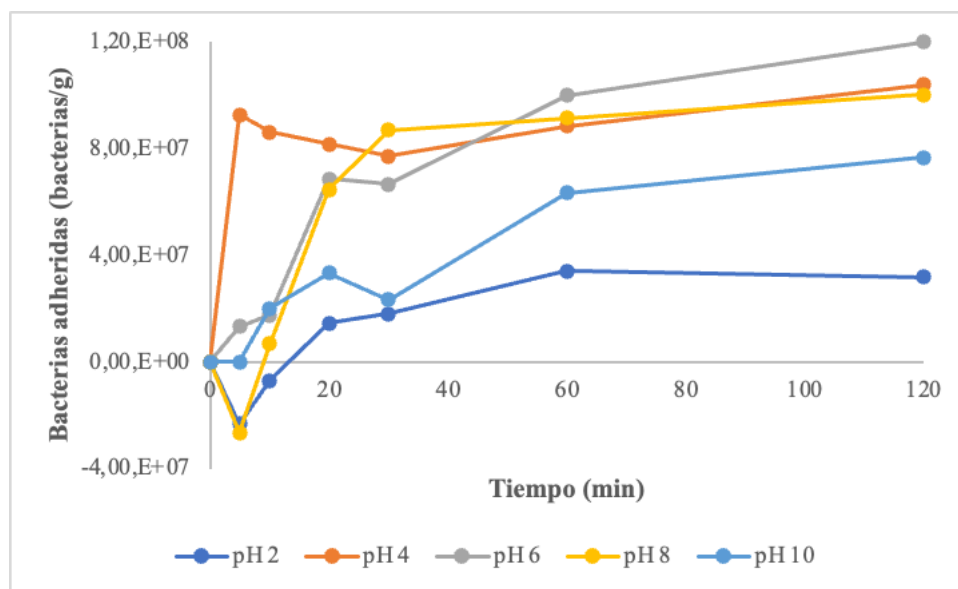


Figura 3.1: Cinética de adherencia en agua dulce a distintos pH y concentración de bacterias baja (10^6 bact/ml).

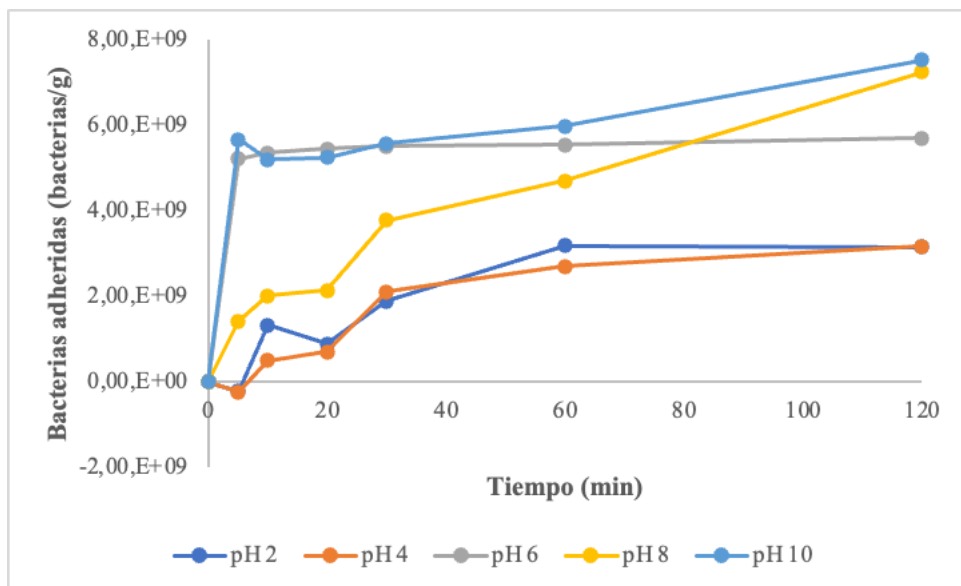


Figura 3.2: Cinética de adherencia en agua dulce a distintos pH y concentración de bacterias media (10^8 bact/ml).

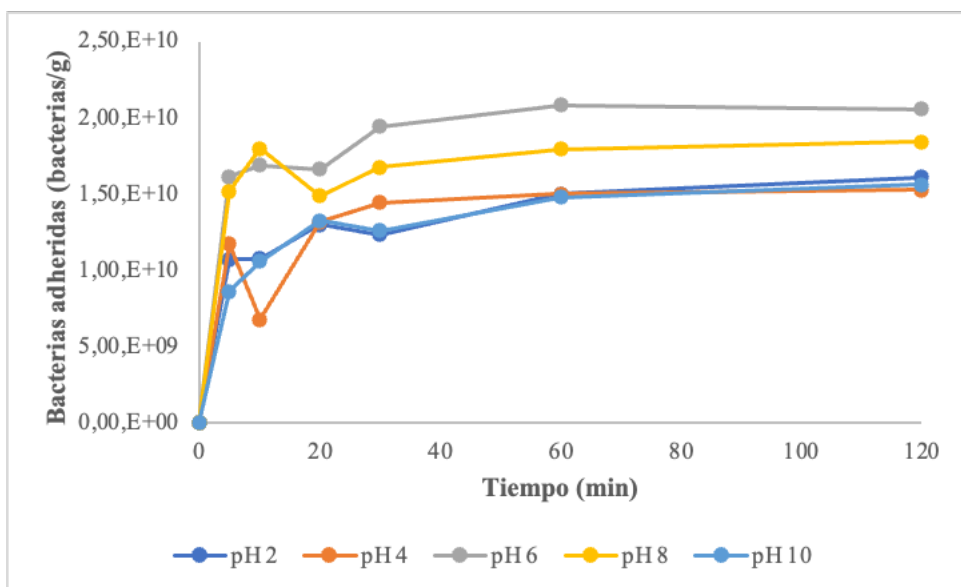


Figura 3.3: Cinética de adherencia en agua dulce a distintos pH y concentración de bacterias alta (10^9 bact/ml).

En primer lugar, de las curvas de cinética de adherencia se puede ver que la concentración de bacterias adheridas a la pirita aumenta con el tiempo para todos los casos, lo cual tiene sentido debido a que la bacteria está en constante contacto con el mineral, llegando a una densidad de bacterias adheridas (bacterias/g) máxima, debido a que la bacteria podría adherirse como una monocapa a la superficie sólida.

En la Figura 3.1 se puede ver que existe una gran variabilidad de los resultados obtenidos, lo cual tiene relación con el método de conteo utilizado y el bajo número de bacterias en la solución, ya que al ser una concentración baja, el número de bacterias visibles en la cámara variaba entre 1 y 20, produciendo una gran variación en los valores de concentración. Sin embargo, la tendencia es clara en la Figura 3.2 y Figura 3.3 y están acordes con los resultados previos.

La influencia de la concentración de *A. ferrooxidans* no es apreciable en este estudio, ya que los resultados para concentración baja podrían no ser representativos por los errores intrínsecos asociados, y las concentraciones media y alta siguen la misma tendencia. Por lo tanto, la cinética de adherencia no se ve afectada por una variación en la concentración.

En la Figura 3.2 y Figura 3.3 se puede ver que, para ambos ordenes de concentración, se obtiene una menor adherencia a pH 2 y 4 y una adherencia mayor a pH 6. Se puede ver que para pH 10 existe un comportamiento variable, donde a una concentración de orden 8 la adherencia es mayor que para los demás pH y para una concentración de orden 9 la adherencia es menor que para los demás pH. Una posible explicación de este comportamiento es el error intrínseco que tiene el método de conteo de bacterias, ya que al ser una concentración alta es necesario realizar una dilución de la solución. Sin embargo, en base a los estudios realizados con anterioridad, la concentración óptima que ha dado buenos resultados corresponde al orden de 10^8 bacteria/ml. Dicho lo anterior, se puede ver que los resultados obtenidos para concentración media (Figura 3.2) muestran que a pH 2 y 4 la adherencia es menor que a los demás pH, siendo mayor a pH 6 y 10.

Por otro lado, al observar la Figura 3.1, Figura 3.2 y Figura 3.3, se puede ver que luego de los 60 minutos de experimento, la tendencia de la mayoría de las curvas es horizontal, lo que indica que al transcurrir del tiempo, no hubo una gran variación entre las bacterias adheridas a 60 minutos y 120 minutos. Por lo tanto, es posible mencionar que el equilibrio de cinética de adherencia se alcanza luego de los 60 minutos.

3.2.2 Agua de mar

La cinética de adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a la pirita en agua de mar para distintas concentraciones (baja, media y alta) se presenta en la Figura 3.4, Figura 3.5 y Figura 3.6, respectivamente. El conteo de bacterias también se realizó directamente desde cámara Neubauer en microscopio, por lo que existe un error intrínseco al método que produce valores negativos en la concentración de bacterias adheridas a la pirita.

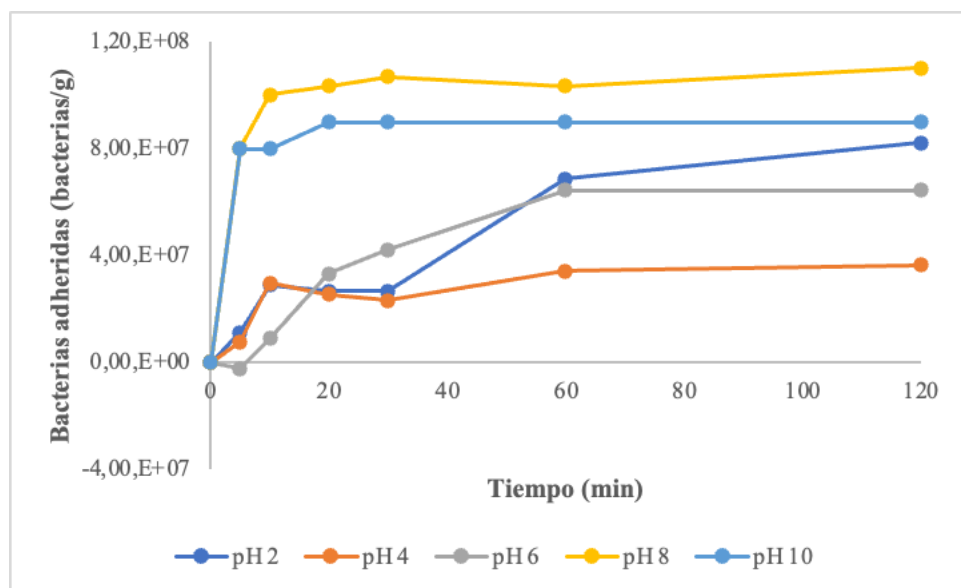


Figura 3.4: Cinética de adherencia en agua de mar a distintos pH y concentración de bacterias baja (10^6 bact/ml).

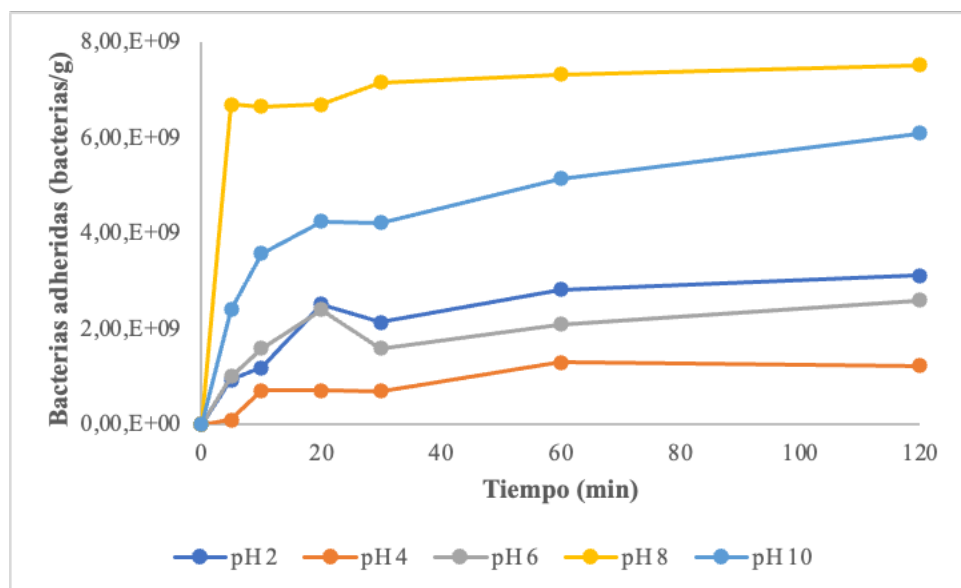


Figura 3.5: Cinética de adherencia en agua de mar a distintos pH y concentración de bacterias media (10^8 bact/ml).

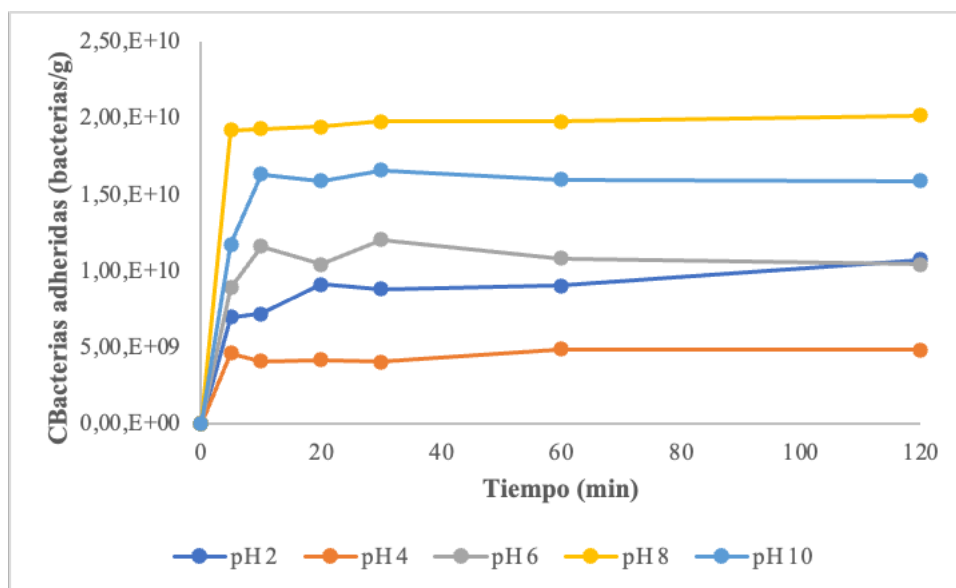


Figura 3.6: Cinética de adherencia en agua de mar a distintos pH y concentración de bacterias alta (10^9 bact/ml).

En primer lugar, se puede ver que para todas las concentraciones, a pH ácido (2, 4 y 6) la adherencia es menor que para pH básico. Específicamente, a pH 8 se alcanza una adherencia mayor a los demás pH para todos los casos de concentración. Al comparar estos resultados con los resultados de cinética de adherencia obtenidos en el estudio realizado por San Martín et al. (2020a), se puede ver el mismo comportamiento, donde a pH 4 (curva naranja) la adherencia es menor que a pH 8 (curva amarilla).

Por otro lado, al observar la Figura 3.4, Figura 3.5 y Figura 3.6, se puede ver que luego de 20-30 minutos de experimento, la tendencia de la mayoría de las curvas es horizontal, lo que indica que al transcurrir del tiempo, no hubo una gran variación entre las bacterias adheridas a 30 minutos y 120 minutos. Por lo tanto, es posible mencionar que el equilibrio de cinética de adherencia se alcanza luego de los 30 minutos. Esto podría indicar que las bacterias tienen una menor afinidad con agua de mar, en comparación al agua dulce, logrando que el equilibrio se alcance en menor tiempo. Estos resultados pueden relacionarse con los resultados obtenidos por San Martín et al. (2018), donde el uso de bacterias en flotación de pirita en agua de mar produce una disminución en la recuperación del mineral a pH 8 de 100 a 36 % (Figura 1.8), 15% más que en agua dulce. Por lo tanto, la menor afinidad que puede tener *Acidithiobacillus ferrooxidans* al agua de mar podría estar produciendo mejores resultados y favoreciendo la adherencia a la pirita en este medio.

3.3 Hidrofobicidad y Máxima adherencia

Finalmente, la Figura 3.7 y Figura 3.8 muestran la variación del porcentaje de bacterias en el hexadecano y las bacterias adheridas por gramo de mineral en función del pH, en agua dulce y agua de mar, respectivamente. Los valores utilizados para ambos gráficos corresponden a los resultados obtenidos para un tiempo de 60 minutos, ya que a este tiempo se alcanza el equilibrio para ambos experimentos. La concentración inicial para los experimentos de partición líquido-líquido corresponde a 7×10^8 bacterias/ml y 5×10^8 bacterias/ml para los experimentos de cinética de adherencia. Se puede ver que, tanto para agua destilada como para agua de mar, la cantidad de bacterias adheridas al mineral tiene una tendencia de aumento con el pH, alcanzando un valor máximo a pH 6 y 10 para agua dulce y a pH 8 en agua de mar.

Por otro lado, para el valor que hace referencia a la hidrofobicidad tiene un comportamiento distinto para ambos medios. Primeramente, para agua dulce se puede ver una tendencia al aumento hasta pH 6, alcanzando un máximo de 39%, y luego disminuye para pH 8 y 10. Para el caso del agua de mar, se puede ver que ambos parámetros tienen la misma tendencia, donde se ve un aumento en función del pH, alcanzando un valor máximo de hidrofobicidad de 54% para pH 8 y un máximo de bacterias adheridas de aproximadamente 9×10^9 bacterias/g a pH 8.

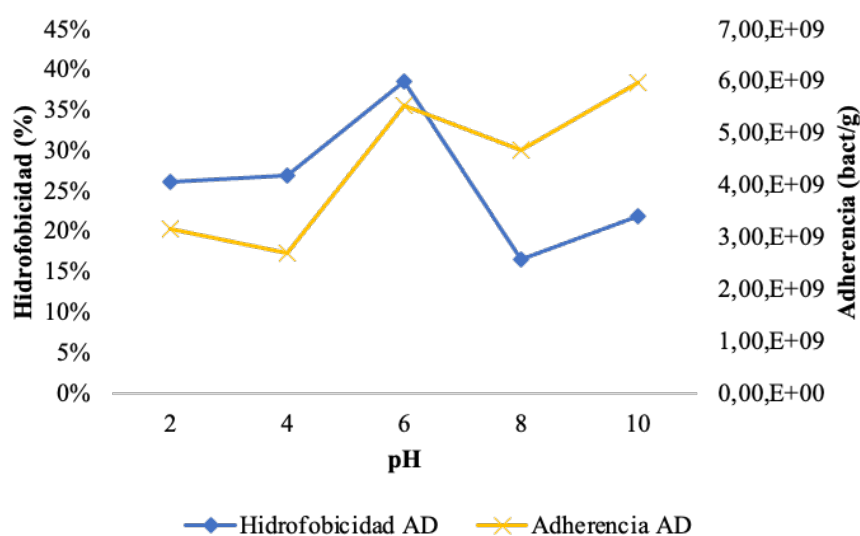


Figura 3.7 : Variación del porcentaje de hidrofobicidad y valor de adherencia en función del pH en agua dulce a 60 minutos.

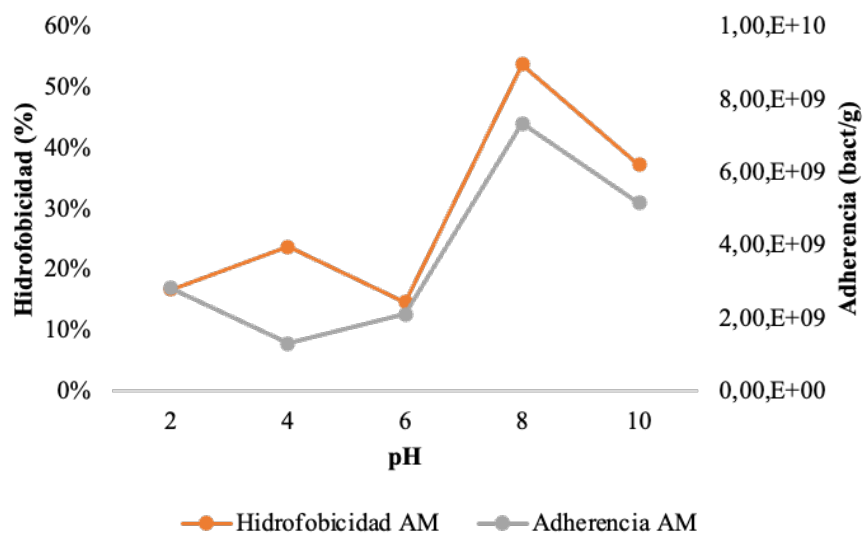


Figura 3.8 : Variación del porcentaje de hidrofobicidad y valor de adherencia en función del pH en agua de mar a 60 minutos.

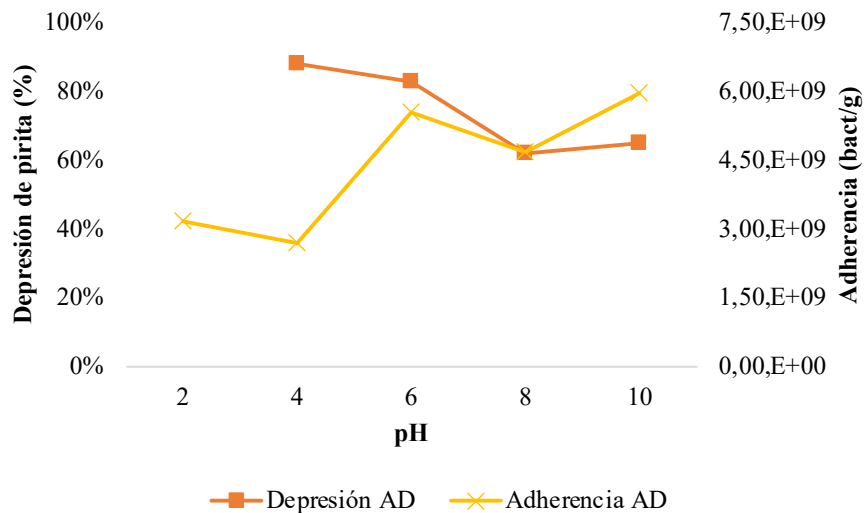


Figura 3.9: Variación del porcentaje de depresión de pirita y valor de adherencia a 60 minutos en función del pH en agua dulce.

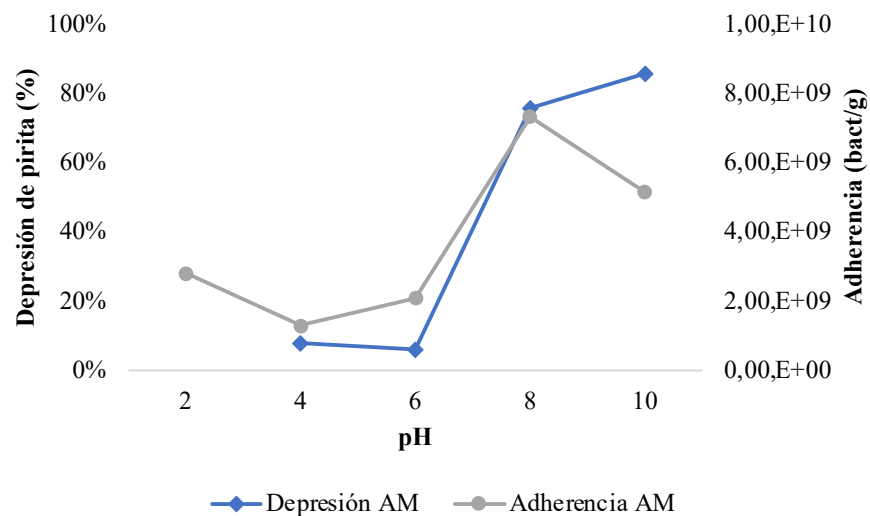


Figura 3.10: Variación del porcentaje de depresión de pirita y valor de adherencia a 60 minutos en función del pH en agua de mar.

Los resultados de depresión obtenidos por San Martín et al. (2021) presentan una variación respecto a la depresión de pirita en agua dulce, obteniéndose una depresión mayor a pH 4 y 6 (ver Figura 1.9). La depresión del mineral en agua de mar es mayor a pH 8 y 10 (ver Figura 1.10). En la Figura 3.9 y Figura 3.10 se incluyen los resultados de adherencia obtenidos en el presente estudio junto con los resultados de depresión obtenidos por San Martín et al. (2021). Se puede ver que existe una relación entre la depresión y la adherencia para ambos medios, siendo mayor a pH ácido para agua dulce y a pH básico en agua de mar. La misma tendencia puede observarse para los resultados de hidrofobicidad, donde la bacteria es más hidrofóbica a pH 4 y 6 en agua dulce y a pH 8 y 10 en agua de mar.

Por lo tanto, la adherencia de la bacteria a la pirita podría explicarse en base a la propiedad fisicoquímica de hidrofobicidad. Dado el conocimiento previo obtenido por San Martín et al. (2020a), una mayor adherencia de *A. ferrooxidans* a pirita conlleva a una menor recuperación de pirita y, por lo tanto, considerando los resultados obtenidos, la adherencia de la bacteria a la pirita, tanto en agua dulce como en agua de mar, podría estar llevándose a cabo mediante fuerzas hidrofóbicas.

La variación del comportamiento entre ambos medios puede explicarse por la presencia de las distintas sales en el agua de mar. Según el estudio realizado por Jaramillo (2001),

existen componentes específicos que proveen la característica de hidrofobicidad en distintas superficies, dentro de los cuales están los grupos carboxílicos. Solari et al. (1992) describen que el aumento de hidrofobicidad con la acidez puede ser producto de la neutralización de dichos grupos. Los resultados obtenidos muestran que, en agua de mar, la hidrofobicidad es mayor a pH básico. Esto puede tener relación con la formación de componentes en la pared celular externa de la bacteria que hacen que sea más hidrofóbica. Por lo tanto, es importante analizar la variación en la composición de los EPS en función del pH para los diferentes medios, para evaluar la influencia de la composición en la hidrofobicidad e identificar aquellos componentes que están otorgando la condición hidrofóbica.

3.4 Isoterma de adherencia

Tomando en consideración el tiempo en que se alcanza el equilibrio para los experimentos de cinética de adherencia en agua dulce y agua de mar, se utilizaron los resultados obtenidos a los 60 minutos para realizar las isotermas de adherencia, ya que el ajuste de los modelos de adsorción de Langmuir y de Freundlich que se obtuvo es mejor para dicho tiempo que para 120 minutos.

La isoterma de Langmuir es uno de los modelos de adsorción que ha permitido determinar la unión de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a azufre, cuarzo, calcopirita, bornita y pirita (Xia et al., 2013). Este modelo tiene distintas suposiciones, dentro de las cuales están que: (i) las bacterias forman una monocapa sobre el mineral, (ii) todos los sitios en la superficie son equivalentes en términos energéticos, (iii) las bacterias adheridas no interactúan entre sí y (iv) las bacterias no se mueven en la superficie. El modelo de Langmuir viene dado por la Ecuación 3.1.

$$X_e = \frac{X_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde: X_e corresponden a las bacterias adheridas por gramo de mineral (bacterias/g), C_e corresponde a la concentración de bacterias en solución en el equilibrio (bacterias/ml), K_L es la constante de absorción de Langmuir y X_m es la máxima capacidad de absorción por unidad de masa de absorbente (bacteria/g). Los parámetros X_m y K_L se obtienen del ajuste del modelo realizado con la herramienta Solver de Excel.

La isoterma de Freundlich es un modelo experimental, no está basado en supuestos y sólo puede utilizarse para predecir resultados experimentales. El modelo viene dado por la siguiente ecuación:

$$X_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde: X_e corresponden a las bacterias adheridas en el equilibrio por gramo de mineral (bacterias/g), C_e corresponde a la concentración de bacterias en solución en el equilibrio (bacterias/ml), K_F es la constante de absorción de Freundlich y n es un indicador de adsorción efectiva y representa las propiedades inherentes del adsorbente (adimensional). Los parámetros n y K_F se obtienen del ajuste del modelo realizado con la herramienta Solver de Excel.

Dado que la concentración inicial de bacterias utilizada para los experimentos de cinética de adherencia está entre 10^6 y 10^9 bacteria/ml es necesario realizar una normalización de los parámetros X_e y C_e para el ajuste del modelo de Langmuir, con la finalidad de tener un mejor ajuste de los datos. Se dividieron los parámetros por un factor 10^8 y posteriormente los parámetros X_m y K_L se multiplicaron por el mismo factor para mantener las unidades del modelo.

En el Anexo A se encuentran los valores de las distintas concentraciones de bacteria utilizados para realizar el ajuste de las isothermas de adherencia, para cada uno de los pH estudiados. Con la herramienta Solver de Excel es posible realizar el ajuste de los modelos y obtener los parámetros X_m y K_L de Langmuir y n y K_F de Freundlich. En la Figura 3.11 y Figura 3.12 se presentan las isothermas de adherencia experimentales y modeladas para cada pH en agua dulce y agua de mar.

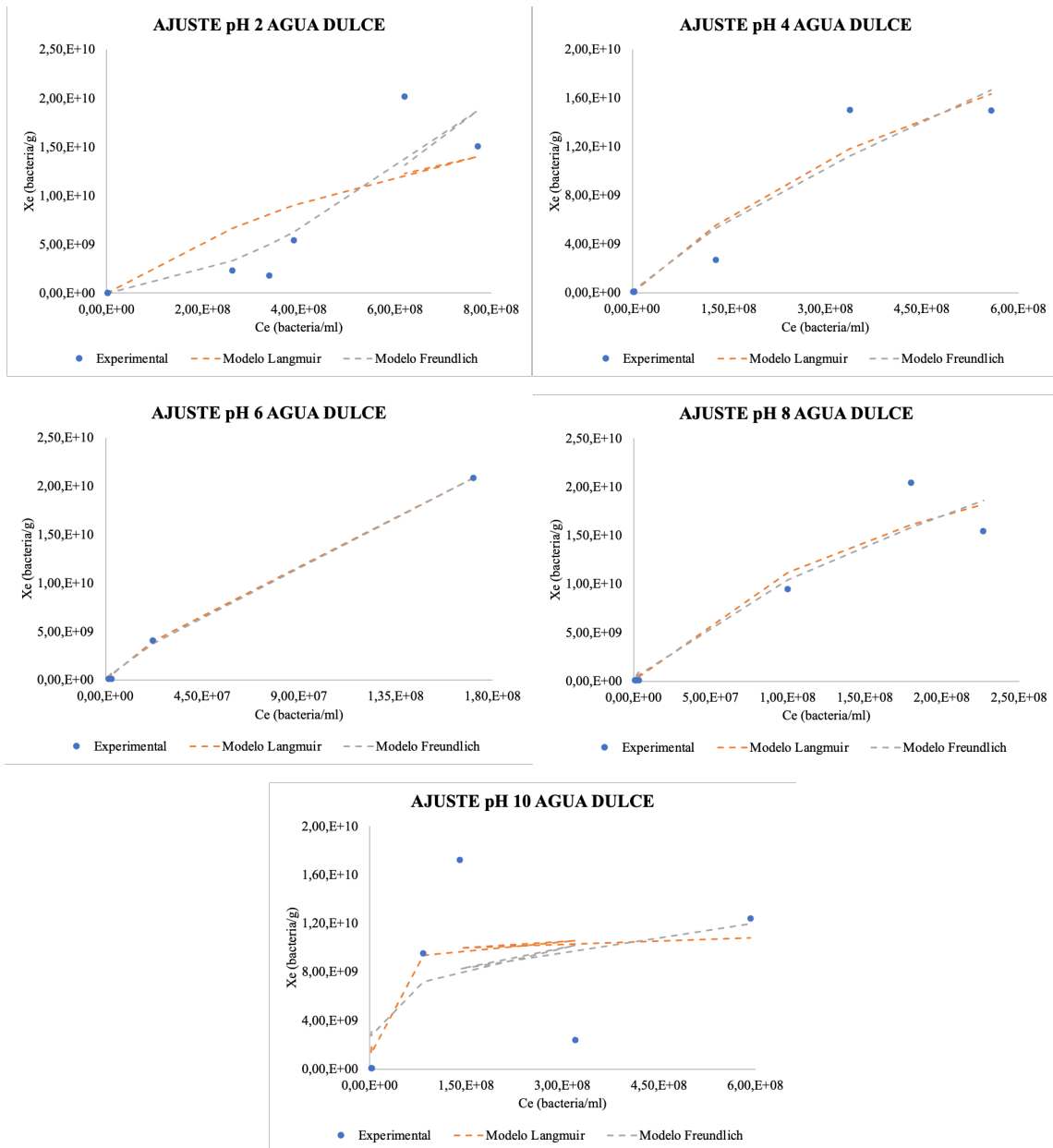


Figura 3.11: Ajuste de modelos Langmuir y Freundlich a datos experimentales en agua dulce.

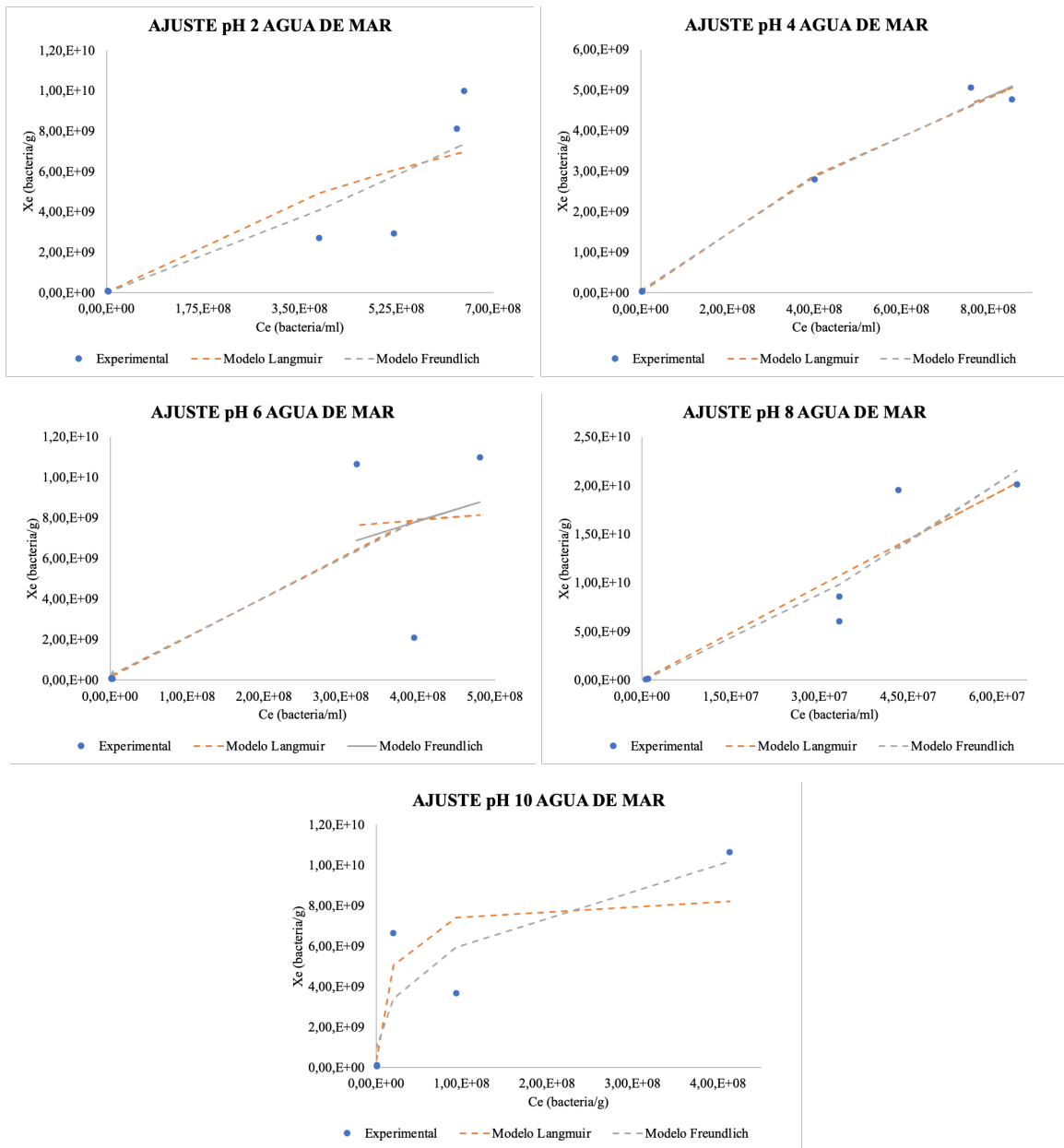


Figura 3.12: Ajuste de modelos Langmuir y Freundlich a datos experimentales en agua de mar.

A partir de los resultados mostrados en la Figura 3.11 y Figura 3.12, se puede ver que ambos modelos tiene un comportamiento similar a los resultados experimentales. Para evaluar el ajuste de los modelos a los datos experimentales se utilizó la métrica de raíz del error cuadrático medio (RMSE), la cual permite comparar los valores reales con los obtenidos mediante los modelos. Esta métrica se obtiene como:

$$RMSE = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_m - y_{exp})^2}}{n}$$

Donde y_m corresponde al valor de y obtenido mediante el modelo, y_{exp} corresponde al valor de y experimental y n corresponde al total de datos. El mejor ajuste se obtiene cuando la métrica es menor.

En la Tabla 3.3 se muestran los parámetros obtenidos para los modelos de Langmuir y Freundlich para agua dulce y agua de mar, junto con la métrica RMSE. En primer lugar, al comparar los valores de RMSE, se puede ver que, en promedio, se tiene un mejor ajuste en agua de mar para ambos modelos a todos los pH, excepto pH 6 y 8. A diferencia de los resultados obtenidos por San Martín et al. (2020b), donde se realizaron experimentos en agua dulce y agua salina, se obtuvo un mejor ajuste y mayor adherencia en agua dulce. La presencia de otras sales podría afectar en la diferencia de los resultados obtenidos, producto de la formación de otros compuestos en los EPS de la bacteria.

En segundo lugar, se puede ver que para agua dulce el valor de X_m toma un valor máximo a pH 6 de $5,53 \times 10^{10}$ bacterias/g, indicando que la bacteria tiene una mayor capacidad de adsorción a la pirita a pH 6 en agua dulce. Para agua de mar, el valor de X_m toma un valor máximo a pH 8 de $1,15 \times 10^{12}$ bacterias/g, indicando que la bacteria tiene una mayor capacidad de adsorción a la pirita a pH 8 en agua de mar.

Por otro lado, Dada et al. (2012) y Medina et al. (2014) indican que un valor de n igual a 1, significa que la partición entre las dos fases es independiente de la concentración. Si el valor de $1/n$ es inferior a uno, indica una adsorción normal o favorable. Finalmente, si $1/n$ es mayor a uno indica adsorción cooperativa. De los valores obtenidos, se puede ver que para la mayoría de los casos el valor de $1/n$ está entre 0 y 1, indicando una adsorción normal. Sin embargo, para pH 2 el valor de $1/n$ es mayor a 1, al igual que para pH 8 en agua de mar, indicando una adsorción cooperativa entre la bacteria y la pirita. Esto podría estar relacionado con la condición de mayor hidrofobicidad, favoreciendo la unión entre *A. ferrooxidans* y pirita mediante fuerzas hidrofóbicas.

Tabla 3.3: Parámetros de modelos de Langmuir y Freundlich para agua dulce y agua de mar.

Modelo	Parámetro	pH	Agua dulce	Agua de mar
Langmuir	X_m	2	$3,21 \times 10^{10}$	$1,77 \times 10^{10}$
		4	$3,95 \times 10^{10}$	$1,45 \times 10^{10}$
		6	$5,53 \times 10^{10}$	$9,45 \times 10^9$
		8	$3,57 \times 10^{10}$	$1,15 \times 10^{12}$
		10	$1,11 \times 10^{10}$	$8,49 \times 10^9$
	K_L	2	$1,00 \times 10^7$	$1,00 \times 10^7$
		4	$1,26 \times 10^7$	$6,26 \times 10^6$
		6	$3,54 \times 10^7$	$1,32 \times 10^8$
		8	$4,57 \times 10^7$	$2,84 \times 10^6$
		10	$6,40 \times 10^8$	$7,32 \times 10^8$
	RMSE	2	41,07	19,12
		4	18,39	2,00
		6	2,20	29,24
		8	21,96	31,03
		10	45,83	21,35
Freundlich	1/n	2	1,60	1,13
		4	0,79	0,76
		6	0,84	0,60
		8	0,71	1,22
		10	0,26	0,36
	K_F	2	0,00	0,85
		4	2211,13	864,06
		6	2557,96	54449,60
		8	23106,18	6,81
		10	64901010,91	7748464,92
	RMSE	2	30,39	15,94
		4	19,97	2,13
		6	3,36	29,45
		8	23,44	29,80
		10	52,11	18,88

4. Conclusiones

En el presente trabajo de investigación se estudió la relación entre la hidrofobicidad y la adherencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* a pirita bajo distintas condiciones con la finalidad de proponer la hidrofobicidad como mecanismo de adherencia. A continuación, se describen y detallan las principales conclusiones y hallazgos:

- Los resultados de hidrofobicidad obtenidos en agua dulce tienen una variación menor al 10% entre 60 y 120 minutos. Luego de 120 minutos, *A. ferrooxidans* es más hidrofóbica a pH 4 y 6, teniendo un valor mínimo de 22% de bacterias transferidas a la fase orgánica a pH 2 y máximo de 44% a pH 6. Por lo tanto, en agua dulce la bacteria es más hidrofóbica a pH 6.
- En agua de mar, la variación de hidrofobicidad entre los resultados obtenidos a 60 y 120 minutos fue menor al 10%. Luego de 120 minutos, *A. ferrooxidans* es más hidrofóbica a pH básico, teniendo un valor mínimo de 8% a pH 6 y máximo de 63% a pH 8. Por lo tanto, en agua de mar la bacteria es más hidrofóbica a pH básico, siendo mayor a pH 8.
- La composición del agua de mar podría afectar en la composición de los EPS de la bacteria, provocando que para agua dulce sea más hidrofóbica a pH ácido y en agua de mar a pH básico.
- La densidad de adherencia de *A. ferrooxidans* aumenta con el tiempo para todas las condiciones. En agua dulce, la bacteria se adhiere más a pH básico cuando se tiene una concentración media de 10^8 . Para el agua de mar, la bacteria se adhiere en mayor cantidad a medida que aumenta el pH, alcanzando un valor mínimo a pH 4 y máximo a pH 8 para la mayoría de los casos.
- El equilibrio de adherencia se alcanza entre 60 y 120 minutos para agua dulce y entre 30 y 60 minutos para agua de mar. Esto indica que la bacteria tiene mayor afinidad con el agua dulce, logrando el equilibrio en el agua de mar en un menor tiempo.

- Al comparar la adherencia en el equilibrio para una concentración alta, se tiene una concentración máxima de aproximadamente $6,0 \times 10^9$ bacterias/g a pH 6 en agua dulce y $7,3 \times 10^9$ bacterias/g a pH 8 en agua de mar. Por lo tanto, se tiene una mayor adherencia a pH 8 y en agua de mar.
- Al relacionar los resultados obtenidos por San Martín et al. (2021) con los obtenidos en la cinética de adherencia, se confirma que, tanto en agua dulce como en agua de mar, la adherencia es parte del mecanismo de depresión, ya que en agua dulce se tiene una mayor adherencia y una alta biodepresión a pH 6 ($5,8 \times 10^9$ bacterias/g y 83%) y en agua de mar se tiene una mayor adherencia y una alta biodepresión a pH 8 ($7,3 \times 10^9$ bacterias/g y 76%).
- Los resultados de partición líquido-líquido confirman que la adherencia de *A. ferrooxidans* a pirita es mediante fuerzas hidrofóbicas ya que se tiene una mayor densidad de adherencia cuando la bacteria se transfiere más desde la fase polar a la fase orgánica, a pH 6 en agua dulce (40% y $5,8 \times 10^9$ bacterias/g) y a pH 8 en agua de mar (54% y $7,3 \times 10^9$ bacterias/g).
- El ajuste de las isotermas de adsorción permitieron obtener parámetros relevantes, como lo es la máxima capacidad de absorción por unidad de masa de absorbente. Se tiene un valor máximo a pH 6 de $5,53 \times 10^{10}$ bacterias/g en agua dulce y $1,15 \times 10^{12}$ bacterias/g a pH 8 en agua de mar. Ambos modelos presentan, en promedio, un ajuste mejor en agua de mar según la métrica RMSE, siendo el modelo de Freundlich el que presenta un mejor ajuste.
- La disminución de recuperación de pirita en bioflotación a pH 6 en agua dulce y a pH 8 en agua de mar está relacionada con la propiedad fisicoquímica de hidrofobicidad. Dado el conocimiento previo obtenido por San Martín et al. (2020a), una mayor adherencia de *A. ferrooxidans* a pirita conlleva a una menor recuperación de pirita. Por otro lado, la mayor adherencia se obtiene cuando la

bacteria es más hidrofóbica. Por lo tanto, la bacteria se une a la pirita mediante fuerzas hidrofóbicas.

- Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los resultados obtenidos por San Martín y Aguilar (2019) y San Martín et al. (2020a), donde se concluye que las fuerzas electrostáticas no son responsables de la adherencia entre pirita y *A. ferrooxidans*, si no que la unión es por fuerzas hidrofóbicas.

5. Referencias

- Banco Mundial, 2021. El agua en Chile: Elemento de Desarrollo y Resiliencia.
- Cantallop A., J., Ramírez, V., 2020. Consumo de agua en la minería del cobre al año 2019 1–58.
- Castro, S., 2012. Challenges in flotation of Cu-Mo Sulfide Ores in Sea Water. Water in Mineral Processing - Proceedings of the 1st International Symposium.
- Chandrababha, M.N., Natarajan, K.A., Modak, J.M., 2004. Selective separation of pyrite and chalcopyrite by biomodulation. Colloids Surf B Biointerfaces 37, 93–100.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.06.011>
- COCHILCO, 2022. Anuario de estadísticas del cobre y otros minerales 1–182.
- Cochilco, 2020. Proyección de consumo de agua en la minería del cobre 2020-2031. Dirección de Estudios y Políticas Públicas 1–36.
- Codelco Chile, 2019. “Burbujas de cobre.” Codelcoeduca.cl 1–5.
- Consejo minero, 2021. Cifras actualizadas de la Minería – Consejo Minero. Cifras actualizadas de la Minería.
- Dada, A.O., Olalekan, A.P., Olatunya, A.M., Dada, 2012. Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn²⁺ onto Phosphoric Acid Modified Rice Husk, IOSR Journal of Applied Chemistry (IOSR-JAC).
- DGA, 2022. Informe Hidrometeorológico Semanal 1–3.
- Donati, E.R., Sand, W., 2007. Microbial Processing of Metal Sulfides.
- Fragkou, María Cristina; Fuster, Rodrigo; Ocampo, A., 2022. Chile lidera la crisis hídrica en América Latina [WWW Document]. Universidad de Chile.
- Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W., 2001. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*-a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology.
- Hanning, R.N., Rutter, P.R., 1989. A simple method of determining contact angles on particles and their relevance to flotation. Int J Miner Process 27, 133–146.
[https://doi.org/10.1016/0301-7516\(89\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0301-7516(89)90011-2)

- Jaramillo, D.F., 2000. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS COMPUESTOS HIDROFÓBICOS REMOVIDOS DE ANDISOLES REPELENTES AL AGUA DE ANTIOQUIA, Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.
- Jeldres, R.I., Forbes, L., Cisternas, L.A., 2016. Effect of Seawater on Sulfide Ore Flotation: A Review. Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review 37, 369–384.
<https://doi.org/10.1080/08827508.2016.1218871>
- Kester, D.R., Duedall, I.W., Connors, D.N., Pytkowicz, R.M., 1967. Preparation of Artificial Seawater. Limnol Oceanogr 12, 176–179.
- Medina, M.P., Michel, M.E., Cutiño, M., Frank, M., Calzadilla, V., Dolores, M., Tort, S., 2014. Adsorción de níquel y cobalto sobre carbón activado de cascarón de coco Nickel and cobalt adsorption on activated coal of coconut shell.
- MISRA, M., BUKKA, K., & CHEN, S., 1996. The effect of growth medium of *thiobacillus ferrooxidans* on pyrite flotation. Miner Eng 9, 157–168.
- Ohmura, N., Kitamura, K., Saiki, H., 1993. Mechanism of microbial flotation using *Thiobacillus ferrooxidans* for pyrite suppression. Biotechnol Bioeng 41, 671–676.
<https://doi.org/10.1002/bit.260410611>
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E., 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 9, 29–33.
- San Martín, F., Kracht, W., Vargas, T., 2018. Biodepression of pyrite using *Acidithiobacillus ferrooxidans* in seawater. Miner Eng 117, 127–131.
<https://doi.org/10.1016/j.mineng.2017.11.005>
- San Martín, F., Aguilar, C., 2019. Study of the Adhesion Mechanism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to Pyrite in Fresh and Saline Water. Minerals 9, 306.
<https://doi.org/10.3390/min9050306>
- San Martín, F., Kracht, W., Vargas, T., Rudolph, M., 2020a. Mechanisms of pyrite biodepression with *Acidithiobacillus ferrooxidans* in seawater flotation. Miner Eng 145, 106067. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2019.106067>
- San Martín, F., Kracht, W., Vargas, T., 2020b. Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to pyrite in fresh and saline water and fitting to Langmuir and Freundlich isotherms. Biotechnol Lett 42, 957–964. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02842-z>

- San Martín, F., Valles, I., Kracht, W., Vargas, T., Aguilar, C., 2021. Biodepression of copper-activated pyrite with *acidithiobacillus ferrooxidans* in flotation with fresh and seawater. *Minerals* 11. <https://doi.org/10.3390/min11101039>
- Straver, M.H., Kijne, J.W., 1996. A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. *Yeast* 12, 207–213. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19960315\)12:3<207::AID-YEA899>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19960315)12:3<207::AID-YEA899>3.0.CO;2-U)
- Solari, J.A., Huerta, G., Escobar, B., Vargas, T., Badilla-Ohlbaum, R., Rubio, J., 1992. Interfacial phenomena affecting the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to sulphide mineral surfaces. *Colloids and Surfaces* 159–166.
- Wills, B.A., Finch, J.A., 2016. Wills' mineral processing technology: An introduction to the practical aspects of ore treatment and mineral recovery, Wills' Mineral Processing Technology: An Introduction to the Practical Aspects of Ore Treatment and Mineral Recovery.
- Xia, L.X., Shen, Z., Vargas, T., Sun, W.J., Ruan, R.M., Xie, Z. Da, Qiu, G.Z., 2013. Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* onto different solid substrates and fitting through Langmuir and Freundlich equations. *Biotechnol Lett* 35, 2129–2136. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1316-1>
- Yianatos, J., 2008. Flotación de minerales. Departamento de Procesos Químicos, Biotecnológicos y Ambientales, Universidad Técnica Federico Santa María, Viña del Mar, Chile.
- Zita, A., Hermansson, M., 1997. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater in situ. *FEMS Microbiol Lett* 152, 299–306. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00214-0)

Anexos A

Valores utilizados en la construcción de isotermas de adherencia.

- Agua dulce

60 min				
pH	Bacterias iniciales/ml	Bacterias adh en eq/ml	Ce bacterias/ml	Xe bacterias/g
2	$3,65 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6$	$2,50 \times 10^6$	$2,30 \times 10^7$
	$3,18 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6$	$3,03 \times 10^7$
	$4,44 \times 10^6$	$2,44 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$4,89 \times 10^7$
	$3,77 \times 10^8$	$1,15 \times 10^8$	$2,62 \times 10^8$	$2,30 \times 10^9$
	$4,29 \times 10^8$	$9,10 \times 10^7$	$3,38 \times 10^8$	$1,82 \times 10^9$
	$6,59 \times 10^8$	$2,70 \times 10^8$	$3,89 \times 10^8$	$5,40 \times 10^9$
	$1,53 \times 10^9$	$7,54 \times 10^8$	$7,71 \times 10^8$	$1,51 \times 10^{10}$
	$1,63 \times 10^9$	$1,01 \times 10^9$	$6,20 \times 10^8$	$2,02 \times 10^{10}$
4	$6,06 \times 10^6$	$4,06 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$8,12 \times 10^7$
	$6,06 \times 10^6$	$5,06 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,01 \times 10^8$
	$6,80 \times 10^6$	$4,13 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$8,26 \times 10^7$
	$2,64 \times 10^8$	$1,35 \times 10^8$	$1,30 \times 10^8$	$2,70 \times 10^9$
	$1,09 \times 10^9$	$7,51 \times 10^8$	$3,38 \times 10^8$	$1,50 \times 10^{10}$
	$1,31 \times 10^9$	$7,49 \times 10^8$	$5,57 \times 10^8$	$1,50 \times 10^{10}$
6	$8,38 \times 10^6$	$5,71 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$1,14 \times 10^8$
	$6,30 \times 10^6$	$4,97 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$9,93 \times 10^7$
	$2,25 \times 10^8$	$2,03 \times 10^8$	$2,20 \times 10^7$	$4,07 \times 10^9$
	$1,21 \times 10^9$	$1,04 \times 10^9$	$1,71 \times 10^8$	$2,08 \times 10^{10}$
8	$7,00 \times 10^6$	$5,33 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6$	$1,07 \times 10^8$
	$7,00 \times 10^6$	$3,67 \times 10^6$	$3,33 \times 10^6$	$7,33 \times 10^7$
	$5,70 \times 10^6$	$4,70 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$9,40 \times 10^7$
	$5,73 \times 10^8$	$4,73 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$	$9,46 \times 10^9$
	$1,20 \times 10^9$	$1,02 \times 10^9$	$1,80 \times 10^8$	$2,04 \times 10^{10}$
	$1,00 \times 10^9$	$7,73 \times 10^8$	$2,27 \times 10^8$	$1,55 \times 10^{10}$
10	$5,67 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	$5,33 \times 10^7$
	$5,67 \times 10^6$	$3,67 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$7,33 \times 10^7$
	$5,60 \times 10^8$	$4,77 \times 10^8$	$8,33 \times 10^7$	$9,53 \times 10^9$
	$4,40 \times 10^8$	$1,20 \times 10^8$	$3,20 \times 10^8$	$2,40 \times 10^9$
	$1,00 \times 10^9$	$8,60 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$	$1,72 \times 10^{10}$
	$1,21 \times 10^9$	$6,21 \times 10^8$	$5,92 \times 10^8$	$1,24 \times 10^{10}$

- Agua de mar

60 min				
pH	Bacterias iniciales/ml	Bacterias adh en eq/ml	Ce bacterias/ml	Xe bacterias/g
2	$6,00 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^6$	$8,00 \times 10^7$
	$6,00 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$3,33 \times 10^6$	$5,33 \times 10^7$
	$6,00 \times 10^6$	$3,67 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$7,33 \times 10^7$
	$5,20 \times 10^8$	$1,35 \times 10^8$	$3,85 \times 10^8$	$2,70 \times 10^9$
	$6,67 \times 10^8$	$1,47 \times 10^8$	$5,20 \times 10^8$	$2,94 \times 10^9$
	$1,15 \times 10^9$	$5,00 \times 10^8$	$6,47 \times 10^8$	$1,00 \times 10^{10}$
	$1,04 \times 10^9$	$4,07 \times 10^8$	$6,33 \times 10^8$	$8,13 \times 10^9$
4	$5,00 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$4,67 \times 10^7$
	$4,47 \times 10^6$	$1,47 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	$2,94 \times 10^7$
	$4,00 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$2,67 \times 10^7$
	$5,40 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$	$4,00 \times 10^8$	$2,80 \times 10^9$
	$1,09 \times 10^9$	$2,38 \times 10^8$	$8,55 \times 10^8$	$4,77 \times 10^9$
	$1,01 \times 10^9$	$2,53 \times 10^8$	$7,60 \times 10^8$	$5,06 \times 10^9$
6	$5,33 \times 10^6$	$4,00 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$7,99 \times 10^7$
	$6,00 \times 10^6$	$2,67 \times 10^6$	$3,33 \times 10^6$	$5,33 \times 10^7$
	$4,33 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6$	$5,99 \times 10^7$
	$5,00 \times 10^8$	$1,05 \times 10^8$	$3,95 \times 10^8$	$2,10 \times 10^9$
	$1,03 \times 10^9$	$5,50 \times 10^8$	$4,80 \times 10^8$	$1,10 \times 10^{10}$
	$8,53 \times 10^8$	$5,33 \times 10^8$	$3,20 \times 10^8$	$1,07 \times 10^{10}$
8	$6,33 \times 10^6$	$5,33 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,07 \times 10^8$
	$5,70 \times 10^6$	$5,03 \times 10^6$	$6,67 \times 10^5$	$1,01 \times 10^8$
	$4,63 \times 10^8$	$4,30 \times 10^8$	$3,33 \times 10^7$	$8,60 \times 10^9$
	$3,37 \times 10^8$	$3,03 \times 10^8$	$3,33 \times 10^7$	$6,07 \times 10^9$
	$1,07 \times 10^9$	$1,01 \times 10^9$	$6,33 \times 10^7$	$2,01 \times 10^{10}$
	$1,02 \times 10^9$	$9,76 \times 10^8$	$4,33 \times 10^7$	$1,95 \times 10^{10}$
10	$6,67 \times 10^6$	$5,67 \times 10^6$	$1,00 \times 10^6$	$1,13 \times 10^8$
	$4,00 \times 10^6$	$3,33 \times 10^6$	$6,67 \times 10^5$	$6,67 \times 10^7$
	$3,52 \times 10^8$	$3,32 \times 10^8$	$2,00 \times 10^7$	$6,64 \times 10^9$
	$2,77 \times 10^8$	$1,83 \times 10^8$	$9,33 \times 10^7$	$3,67 \times 10^9$
	$9,46 \times 10^8$	$5,33 \times 10^8$	$4,13 \times 10^8$	$1,07 \times 10^{10}$