

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 878**

51 Int. Cl.:

C22B 11/00 (2006.01)

C22B 3/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2009 E 09735954 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2271781**

54 Título: **Minería ecológica: proceso de biolixiviado libre de cianuro y bioadsorción de metales preciosos**

30 Prioridad:

21.04.2008 EP 08007723

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.03.2013

73 Titular/es:

**B.R.A.I.N. BIOTECHNOLOGY RESEARCH AND
INFORMATION NETWORK AG (100.0%)
Darmstädter Strasse 34-36
64673 Zwingenberg, DE**

72 Inventor/es:

**ZINKE, HOLGER y
GABOR, ESTHER**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 397 878 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Minería ecológica: proceso de biolixiviado libre de cianuro y bioadsorción de metales preciosos

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a un proceso para aislar metal precioso oro de un material particulado tal como una mena de mineral o un material residual de minería sin necesidad de lixiviado de cianuro in situ. Los átomos metálicos y los iones se separan y se concentran a partir del mineral por medio de adsorción mediante microorganismos y posteriormente son liberados a partir del mismo en un proceso respetuoso con el medio ambiente. De manera general, la invención se refiere al uso de biomasa para aislar un metal a partir de un mineral.

Antecedentes de la Invención

15 Las décadas recientes han visto un agotamiento continuado de los recursos minerales de alta calidad y, de manera concomitante, una demanda creciente de los metales preciosos. La demanda de oro sigue en auge; de manera creciente otros metales preciosos tales como iridio, indio y paladio escasean debido a su importancia, en particular en el campo de las pantallas y de los dispositivos electrónicos de alta tecnología. Al mismo tiempo, la preocupación por los problemas ambientales asociados a las técnicas de minería convencional ha crecido de manera significativa, así como los costes de las cantidades exorbitantes de energía necesaria.

Depósitos principales de metales preciosos

25 **Oro (Au):** el oro es uno de los elementos más raros de la tierra. En el agua del mar, que constituye la reserva más grande de oro, su concentración es de 0,01 mg/m³, mientras que en la parte superior de la corteza terrestre se encuentra presente en una cantidad media de 4 mg/t. En este entorno, la mayoría de las veces el oro aparece como metal puro (Au⁰) o como aleación de plata y oro (Ag/Au) y aparecen inclusiones muy pequeñas en grandes volúmenes de material, normalmente roca. Además, se ha descubierto (con frecuencia en asociación con cuarzo) como telururo (AuTe₂) y seleniuro (AuSe₂) o encerrado en la estructura reticular de minerales tales como pirita y arsenopirita (oro invisible). Los rendimientos de oro obtenidos por medio de minería convencional se encuentran actualmente entre 0,5 a 13,7 g de oro/t de roca, con una tendencia creciente a la explotación de minerales de baja calidad debido a la escasez de los de alta calidad.

35 **Plata (Ag):** la plata es alrededor de 20 veces más abundante que el oro. La mayoría de la plata accesible desde el punto de vista comercial hasta la fecha se encuentra depositada como plata metálica. Pero también, con frecuencia, pueden aparecer minerales sulfídicos (Ag₂S, acantita) y AgCl (cerargirita). Igual que el oro, con frecuencia, los minerales de plata también se encuentran intercalados en matrices de sílice (cuarzo) en tamaños de partícula que se encuentran dentro de nanómetros a micrómetros.

40 **Otros metales preciosos (Pt, Pd, Ir, Ru, Rh, Os):** normalmente, otros metales preciosos diferentes de oro o plata aparecen junto con los metales de base, tales como cobre y níquel, y son recuperados como subproductos en el refinado de estos compuestos.

Métodos convencionales para la minería de los metales preciosos

45 De manera tradicional, los metales preciosos tales como oro o plata han sido recuperados por minería de arenas pluviales (sedimento) o minería de roca dura usando gravedad y métodos pirometalúrgicos. Debido al agotamiento de los minerales ricos en metales, las técnicas hidrometalúrgicas se emplean cada vez más para recuperar metales preciosos a partir de fuentes de baja calidad. Los métodos para la recuperación de metales preciosos, en particular oro, son extremadamente intensivos y requieren el uso de máquinas pesadas así como de sustancias químicas recalcitrantes y peligrosas. Actualmente, aproximadamente 90% de los procesos industriales comunes para la recuperación de metales preciosos están basados en métodos de cianuración, ya que el cianuro es una de las muy pocas sustancias capaces de disolver oro. Con el fin de permitir que los iones de cianuro u otros compuestos tengan acceso a una gran parte del metal encerrado en sus minerales, generalmente se muelen los minerales hasta obtener tamaños de partícula pequeños. Dependiendo del mineral específico, los tamaños de partícula varían de 1-2 mm hasta diámetros tan pequeños como 70 µm obtenidos por medio de molienda fina. La pulverización incluso permite tamaños de partícula de aproximadamente 2 µm.

60 El lixiviado con cianuro se lleva a cabo a pH alcalino (pH 11-12) y los procesos químicos consumen aproximadamente 1,5-5 kg de caliza por tonelada de roca y 1,5-2,5 kg de cianuro de sodio por tonelada de roca, requiriendo tiempos de lixiviado de 18-24 horas. De manera general, los minerales de sulfuro se disuelven a velocidades mucho más lentas que los minerales no sulfídicos, un efecto que se puede solucionar por medio del empleo de disoluciones de cianuro más concentradas (12-20 kg/t) y de tiempos de lixiviado más prolongados (48-72 horas). La cianuración conduce a la solubilización de los metales objetivo, por ejemplo, por medio de

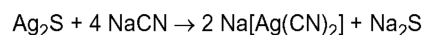
(1)



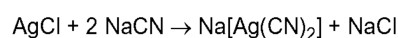
(2)



(3)

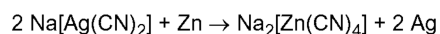
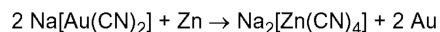


(4)



Posteriormente, el metal solubilizado se puede recuperar por medio de precipitación con cinc-polvo, como era el estándar industrial al principio de los años 50:

5



Los avances en los años 70 han conducido a la adsorción de los complejos de metal-cianuro sobre carbono activado y posteriormente sobre resinas sólidas de intercambio iónico. Estos métodos de adsorción presentan la desventaja del elevado coste. De igual forma, la desorción de metales a partir de la resina de intercambio iónico normalmente no resulta trivial y requiere el uso de reactivos nocivos (por ejemplo, tiocianato) y la regeneración de las resinas con ácidos fuertes.

10

En algunos minerales, los metales preciosos se encuentran encerrados de tal modo que la cianuración no puede tener acceso a los mismos. Típicamente, estos denominados minerales refractarios comprenden sulfuro o minerales carbonáceos o silicatos (cuarzo) y requieren un pretratamiento especial antes del lixiviado con cianuro. Ejemplos de pretratamiento típico son la oxidación del mineral por medio de *lixiviado químico* a temperaturas elevadas, *calcinación o lixiviado bacteriano*, persiguiendo todos ellos el objetivo de preparar una matriz de mineral más porosa; es decir, accesible para el tratamiento posterior con cianuro, o de retirar el carbono nativo que, de lo contrario, inmovilizaría los metales recién solubilizados. La mayoría de estos procesos se llevan a cabo bajo condiciones ácidas ricas en oxígeno, al contrario que la cianuración, que requiere un pH alcalino. Tanto el propio proceso de pretratamiento como también el cambio de pH necesario desde ácido hasta alcalino aumenta de manera significativa el coste de la recuperación de metales preciosos. Este problema se resuelve parcialmente por medio del pretratamiento de lixiviado alcalino descrito en la solicitud de patente WO 2004/042094 A1.

15

20

25

Procesado de amalgamas: el amalgamado de oro presente en las rocas molidas por medio de la adición de mercurio todavía se aplica con frecuencia en la recuperación de oro de tipo artesano. La amalgama moldeable que contiene oro es separada de la roca y el mercurio se separa del oro por medio de evaporación. Este proceso se ha llevado a cabo durante décadas, en su mayoría en Sudamérica y África por personas expuestas a condiciones nocivas, ya que se requiere 1 kg de mercurio para recuperar 1 g de oro.

30

Impacto del lixiviado convencional de metales sobre el medio ambiente y la salud

El daño que provoca el procesado de amalgama sobre el medio ambiente y la salud humana es indiscutible: hasta la fecha más de 5000 t de mercurio han sido directamente liberadas al medio ambiente (50% a la atmósfera) únicamente en Sudamérica sin esfuerzo alguno por evitar la contaminación (Korte, Spiteller et al., 2000). Incluso más severo parece el impacto de la cianuración, ya que este es el proceso técnico más importante usado globalmente en la actualidad. De media, la producción de 1 kg de oro requiere 700 kg de cianuro de sodio, lo que conduce a un volumen de 1400 m³ de disolución de cianuro de sodio de 0,05% que es necesario eliminar. De manera general, este cianuro y las aguas residuales contaminadas con metales pesados se almacenan en estanques abiertos sin tratamiento adicional o son vertidos en ríos y corrientes naturales de agua. Se ha estimado que aproximadamente 20.000 t de ácido cianhídrico se evaporan desde la superficie de los estanques abiertos de eliminación al año (Korte, Spiteller et al, 2000). Debido a que HCN tiene una vida media de 267 días, se acumulará en la atmósfera donde puede sumarse a otros compuestos activos desde el punto de vista climático (por ejemplo, CO₂ y metano). Debido al impacto ambiental severo de la cianuración, este proceso ha sido prohibido en la República Checa y en Turquía. Se ha desarrollado un código internacional para la gestión de cianuro en minería de oro por parte de United Nations

35

40

45

Environment Programme (UNEP) (denominado APELL; http://www.unep.fr/pc/apell/publications/pdf_files/apell-for-mining-pdf).

Biolixiviado

5 Se conoce la posibilidad de usar procariotas que oxidan azufre, que oxidan hierro, autótrofos, predominantemente
 10 acidófilos para recuperar metales preciosos y de base a partir de menas minerales y concentrados, [por ejemplo, (Rawlings and Johnson 2007)]. El desarrollo de esta tecnología ha sido inspirado por medio de la observación de
 que determinadas bacterias, especialmente *Thiobacilli*, son capaces de solubilizar minerales de metales pesados por
 15 medio de la oxidación de Fe(II) a Fe(III), así como también compuestos sulfídicos a sulfato. Este proceso es la causa
 principal de alterabilidad a la intemperie de los minerales sulfídicos.

Por medio de la creación de las condiciones que favorecen el crecimiento de los microorganismos que desintegran el
 15 mineral, se puede aumentar el lixiviado de metales pesados a partir de minerales sulfídicos bajo condiciones
 aerobias más de 100 veces en comparación con la alterabilidad a la intemperie sin bacterias. Desafortunadamente,
 el lixiviado microbiano no permite la oxidación directa, es decir, la solubilización de metales preciosos. No obstante,
 la degradación de minerales tales como la pirita que encierra átomos de metal precioso o asociaciones puede
 20 conducir a la liberación de los compuestos atrapados de alto valor. Aunque generalmente se usan configuraciones
 baratas *in situ* o de descarga/pila para el biolixiviado de metales de base a partir de rocas de baja calidad y
 minerales, típicamente se emplean reactores de tanque agitados más costosos (y más controlados) en el
 pretratamiento de menas de mineral para la recuperación de metales preciosos, tales como Au y Ag. Tras la etapa
 25 de desintegración bacteriana inicial, los minerales son sometidos a un proceso convencional de cianuración, lo que
 supone un peligro para el medio ambiente y problemas de salud mencionados anteriormente. El documento EP 0
 432 935 B1 describe un método que evita la adición de cianuro de sodio de calidad química por medio de la puesta
 en contacto del mineral de oro con microorganismos que son capaces de producir iones de cianuro en el cultivo.
 Este método todavía adolece del hecho de que el cianuro, producido por vía química o biológica, es un reactivo
 nocivo que requiere ser eliminado de manera apropiada de acuerdo con la legislación local.

Bioadsorción

30 Un número de microorganismos vivos, pero también de células inactivadas no viables, presentan la capacidad de
 unirse a iones de metal. En el primer caso, la unión a metal puede ocurrir por medio de adsorción a la superficie
 celular o por medio de acumulación intracelular activa de los iones de metal. En el segundo caso de células
 35 inactivadas no viables - que con frecuencia es denominado *biosorción* - se piensa que la unión del ión de metal
 ocurre de manera exclusiva por medio adsorción superficial. La capacidad de biosorción, como característica general
 de la biomasa, es el resultado de la presencia de grupos quelantes (por ejemplo, grupos carboxilo-, amida-, hidroxilo-,
 , fosfato- y tiol-) con contribución de hidratos de carbono, lípidos y proteínas que se muestran sobre la superficie
 celular. Se ha descrito que la biomasa puede acumular cantidades de metales de hasta 50% en peso de peso seco
 40 celular (Vieira y Volesky 2000). La patente de Estados Unidos 5.055.402 describe un proceso para retirar iones de
 metal de la disolución acuosa, usando una matriz preparada a partir de microorganismos que se unen a metales que
 han sido inmovilizados e inactivados térmicamente a temperaturas de 300-500 °C. El documento EP 0 432 935 B1
 describe la adsorción de complejos solubles de metal-cianuro también a partir de la disolución acuosa por medio de
 biomasa viva.

45 El documento WO 97/14818 describe un proceso de extracción de oro que comprende una etapa de flotación básica
 seguida de agitación durante 6-10 minutos en presencia de una biomasa de *Bacillus cereus* B5039 o *Chlorella*
vulgaris, seguido de una etapa de bioflotación durante 12 a 15 minutos. Se aplica un campo eléctrico de 0,5-2,0
 V/cm durante 0,5-1,0 minutos antes de terminar la agitación, y se aplica un campo eléctrico de 1,5-2,5 V/cm durante
 50 la etapa de bioflotación durante 2,0-3,0 minutos. El documento WO 97/14818 no contiene indicación sobre si algún
 microorganismo diferente de *Bacillus cereus* B5039 o *Chlorella vulgaris* puede resultar útil para el aislamiento de
 metales a partir de menas de mineral.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un proceso para aislar metales preciosos a partir de
 55 un material particulado, tal como un mena de mineral, que contiene un metal sin necesidad de lixiviado de cianuro o
 procesado de amalgama. Otro objetivo de la invención es proporcionar un proceso para aislar metales preciosos que
 son básicamente insolubles en agua a pH neutro, a partir de un material particulado que contiene el metal por medio
 de bioadsorción.

Sumario de la Invención

60 Se han llevado a cabo los objetivos anteriores por medio de un proceso libre de cianuro para aislar metal precioso
 oro a partir de un material particulado que comprende partículas de dicho metal precioso en forma elemental, que
 comprenden las siguientes etapas:

65 (i) preparar una mezcla acuosa que contiene dicho material particulado y biomasa que comprende eubacterias
 o arqueobacterias que tienen una capa-S;

- (ii) incubar dicha mezcla acuosa de la etapa (i) para permitir la unión de dicho metal precioso a dicha biomasa;
- (iii) separar la biomasa que tiene el metal unido de la mezcla acuosa de la etapa (ii); y
- (iv) aislar el metal a partir de la biomasa separada en la etapa (iii), como se define posteriormente en la reivindicación 1.

5 La invención también proporciona el uso de biomasa para aislar un metal, tal como un metal en forma elemental, a partir de un material particulado, tal como una mena de mineral, de acuerdo con la reivindicación 12. Se describe un metal obtenido o que se puede obtener por medio del proceso de la invención.

10 Los inventores de la presente invención han desarrollado un procedimiento para el aislamiento de metales preciosos a partir de material particulado, tal como menas de mineral, usando determinada biomasa. La biomasa se une al metal por medio de los componentes celulares de los organismos. Tras la separación de la biomasa del material no unido del material particulado, se puede aislar el metal a partir de la biomasa. La invención permite aislar el metal a partir del material particulado que contiene únicamente bajas cantidades de metal sin el uso de lixiviado con cianuro peligroso y/o procesado de amalgama. Por tanto, el proceso de la invención proporciona un acceso ambientalmente inocuo a metales valiosos que requiere baja energía y evita la contaminación. La presente invención supone un avance en la explotación sostenible de recursos metálicos de baja calidad, obviando el uso de agentes ambientalmente perjudiciales, en particular cianuro (Figura 1).

20 Para llevar a cabo la invención, se cultivan microorganismos que se sabe son capaces de adsorber de manera específica el metal y las asociaciones de metal de interés. El mineral usado en la etapa (i) es preferentemente triturado, molido o pulverizado antes de la puesta en contacto del mismo con el cultivo microbiano y se puede pretratar usando métodos apropiados para facilitar la liberación del metal y la solubilización, tal como el biolixiviado oxidativo o la incubación con microorganismos que producen metabolitos corrosivos. Preferentemente, el proceso
25 tiene lugar en un reactor de tanque agitado de flujo continuo o en un estanque abierto tal como el usado en las plantas de tratamiento de aguas residuales. En este entorno, los parámetros que son importantes para el crecimiento microbiano (pH, temperatura, nutrientes) pueden controlarse de forma sencilla y por tanto, se puede mantener de forma estable el consorcio microbiano en el espacio y en el tiempo. En la etapa (iii), se separan los microorganismos cargados de la suspensión de mineral, por ejemplo, recogiendo la espuma que flota sobre la parte superior de la mezcla líquida de mineral/biomasa del lodo que se deposita sobre la parte inferior del recipiente de reacción o el
30 estanque abierto agitado enriquecido con dicha biomasa. En la etapa (iv) se aísla el metal de dicha biomasa separada en la etapa (iii) por ejemplo, por medio de lavado con ácidos diluidos (por ejemplo, ácido cítrico acuoso) o bases (por ejemplo, NaOH 1 M), permitiendo la recirculación de biomasa. De manera alternativa, la biomasa se puede someter a combustión y se retiene el metal elemental. Especies microbianas que se pueden usar en el
35 alcance de la presente invención incluyen bacterias, arqueobacterias, hongos y algas.

En la invención, se puede conseguir un efecto enorme uniendo el metal de material particulado de baja calidad a la biomasa. De este modo, la biomasa separada en la etapa (iii) típicamente presenta una masa que es significativamente menor que la masa del material particulado usado en la etapa (i). En una realización, la masa de
40 la biomasa separada en la etapa (iii) es, en estado seco, como máximo 1/10 de la masa del material particulado usado en la etapa (i). En otra realización, la masa de la biomasa separada en la etapa (iii) es, en estado seco, como máximo 1/1000 o, en otra realización, como máximo 1/1000 de la masa de material particulado usado en la etapa (i). Este enorme efecto de concentración que se puede conseguir en el proceso de la invención permite el transporte de la biomasa separada en la etapa (iii), de manera opcional en estado seco, a lo largo de distancias grandes, en las
45 que el transporte de una cantidad de material particulado que contiene la misma cantidad de metal no resultaría rentable. De este modo, la invención permite la separación de la ubicación en la cual se llevan a cabo las tres etapas (i) a (iii), que puede ser la ubicación en la cual enormes cantidades de material particulado se encuentran disponibles, a partir de la ubicación en la cual se lleva a cabo la etapa (iv). De este modo, se puede usar una instalación central para llevar a cabo la etapa (iv) para dos o más sitios en los cuales se llevan a cabo las etapas (i) a
50 (iii). Por consiguiente, entre las etapas (iii) y (iv), se puede llevar a cabo una etapa de transferencia o transporte de la biomasa separada y, de manera opcional, secado en la etapa (iii) hasta una instalación en la cual se lleva a cabo al etapa (iv).

Con frecuencia, los procesos de la técnica anterior usan microorganismos inmovilizados en biorreactores que forman una matriz para bioadsorción. Los procesos de la etapa (i) a (iii) de la presente invención se llevan a cabo, de manera ventajosa, en estanques abiertos agitados en lugar de biorreactores, y no requieren la inmovilización de la biomasa sobre un vehículo. La biomasa usada en la mezcla acuosa de la etapa (i) del proceso de la invención se puede usar en suspensión sin estar inmovilizada sobre un vehículo.

60 Descripción Detallada de la Invención

En la presente invención, "metal" significa un metal en forma elemental y libre. El metal de la invención es metal precioso oro. Un metal en forma elemental presenta uniones entre los átomos de metal y estado de oxidación 0. Si el metal de la invención se encuentra en forma elemental, pueden formar partículas nanoescalares tales como
65 asociaciones de metal. Las partículas nanoescalares de dicho metal y asociaciones de metal pueden presentar ligandos que ocupan las valencias libres de los átomos metálicos ubicados sobre la superficie de las partículas de

metal nanoescalares o asociaciones. Las asociaciones de metal pueden comprender de 2 a 1000 átomos de metal. En otra realización, las asociaciones de metal pueden comprender de 3 a 500 átomos de metal. En otras realizaciones, las asociaciones de metal pueden comprender de 5 a 400 o de 20 a 300 átomos de metal. En general, las partículas nanoescalares pueden presentar un tamaño de < 500 nm, en otra realización de < 100 nm, en otra realización de < 50 nm y todavía en otra realización de < 10 nm. Típicamente, un metal en forma elemental es insoluble en medio acuoso. No obstante, el metal elemental nanoescalar o la asociación de metales se pueden dispersar o son aptos para dispersión en medio acuoso, por ejemplo, en forma de coloide.

En el proceso de la invención, el metal objeto de aislamiento puede experimentar una reacción química, por ejemplo, cuando se une o es separado de dicha biomasa. De este modo, el metal aislado en la etapa (iv) del proceso de la invención puede ser una sustancia química diferente de la forma química al comienzo del proceso de la invención. La presente invención abarca procesos en los cuales el estado químico del metal objeto de aislamiento cambia durante el transcurso del proceso. Por supuesto, es posible que el material particulado usado en el proceso de la invención contenga un metal objeto de aislamiento en dos o más compuestos o estados químicos diferentes. De manera similar, el metal aislado en la etapa (iv) puede contener dicho metal en dos o más compuestos o estados químicos diferentes. Además, el material particulado usado en el proceso de la invención puede contener dos o más tipos de metales diferentes, y el metal aislado en la etapa (iv) puede también contener dos o más tipos de metales diferentes.

El material particulado usado en la etapa (i) de la invención puede ser cualquier metal que contenga un metal objeto de aislamiento de acuerdo con el proceso de la invención. Típicamente, el material particulado es una mezcla de varios compuestos químicos. En los casos típicos, el material particulado es una mena de mineral. El material particulado puede contener cantidades elevadas de silicatos o de cuarzo. La mena de mineral puede ser un material residual de minería obtenido por medio de un proceso de aislamiento del componente deseado diferente del metal de la invención a partir de una mena de mineral. El material particulado puede, por ejemplo, ser o contener un material mineral sulfídico tal como pirita. En una realización, el metal, en particular el metal elemental de la invención, presenta una distribución extremadamente fina en el material particulado tal como un metal elemental encerrado en la estructura reticular de cristal de un mineral tal como pirita. De manera general, dicho metal elemental dispersado o distribuido de forma extremadamente fina es denominado "metal invisible"; si el metal es oro, es denominado "oro invisible".

En la etapa (i) del proceso de la invención, se prepara una mezcla acuosa a partir de dicho material particulado y la biomasa de la invención. El material particulado a usar en la etapa (i) debería molerse de forma fina. Para tal fin, la etapa (i) puede venir precedida por una etapa de molienda. El material particulado puede presentar un tamaño medio de partícula de como máximo 5 mm. De manera alternativa, el material particulado puede presentar un tamaño medio de partícula de como máximo 1 mm, de como máximo 400 μm , o de como máximo 100 μm . En otra realización, las partículas son menores que 100 μm de diámetro o menores que 50 μm , lo que se puede conseguir por medio de tamizado de un material finamente dividido. El rendimiento del proceso de la invención es mayor cuanto menor es el tamaño del material particulado usado en la etapa (i).

Típicamente, la etapa (i) se lleva a cabo en tanques grandes como reactores, por ejemplo, como los que se usan en el tratamiento de aguas residuales. Preferentemente, el reactor contiene un sistema de agitación para agitar la mezcla acuosa. El reactor puede ser un reactor de tanque agitado y se puede operar en modo discontinuo o de flujo continuo. El reactor se encuentra equipado con dispositivos para medir y controlar parámetros tales como la temperatura, pH, contenido de nutrientes etc. Dichos medios son conocidos en el arte de la microbiología. La mezcla acuosa preparada en la etapa (i) incluye medios con nutrientes requeridos para el crecimiento de la biomasa. Además, la mezcla acuosa contiene la biomasa usada para unir el metal objeto de aislamiento usando el proceso de la invención. Típicamente, la biomasa se añade al reactor en una cantidad de forma que la concentración en el reactor permita el crecimiento posterior de la biomasa. A tal fin, generalmente se desarrollan uno o más precultivos en reactores separados para mantener las cantidades suficientemente grandes de biomasa en suspensión acuosa para ser usada.

El contenido de material particulado (tal como mena de mineral) de la mezcla acuosa de la etapa (i) puede, por ejemplo, estar entre 1 y 500 kg de material particulado por m^3 de mezcla acuosa. De manera alternativa, dicho contenido se encuentra entre 5 kg y 100 kg de material particulado por m^3 de mezcla acuosa.

La presente invención hace uso de biomasa que contiene microorganismos que de forma natural - o por medio de ingeniería genética del estado de la técnica - presentan el potencial para unir de manera específica átomos de metal o asociaciones. Esta propiedad es explotada para adsorber metales liberados a partir del material particulado tal como minerales sobre la superficie de microorganismos vivos, permitiendo la separación del metal (unido a la superficie de la biomasa) del mineral y la roca restantes.

La biomasa a usar en la invención se encuentra o comprende un organismo seleccionado entre las clases de eubacterias y arqueobacterias. El organismo a usar depende del tipo de metal objeto de aislamiento, del tipo de material particulado usado, y del estado químico del metal presente en el material particulado. Organismos particularmente apropiados para un mineral dado pueden ser identificados por medio del siguiente procedimiento del

ejemplo 1 o del ejemplo 2.

La biomasa usada en la invención puede ser biomasa viable. En general, dicha biomasa crece durante el transcurso de la etapa (ii) del proceso de la invención. No obstante, no toda la biomasa presente en las etapas (i) y (ii) debe ser viable. Por ejemplo, la biomasa puede decaer parcialmente durante las etapas (i) y (ii); dicha biomasa muerta puede también presentar metal unido y por tanto puede merecer la pena la separación en la etapa (iii).

De manera sorprendente, los inventores han descubierto que las eubacterias y las arqueobacterias que presentan una capa-S tienen una elevada propensión a la unión con oro, oro notable en forma elemental finamente dispersada. Por tanto, la biomasa usada en la invención es o contiene un organismo que pertenece a las eubacterias o a las arqueobacterias y dicho organismo contiene una capa-S. Una capa-S es un montaje paracrystalino, poroso y de mono-capa de moléculas de (glico)proteína que revisten la superficie de algunas bacterias y arqueobacterias. Las estructuras reticulares de capa-S presentan simetría oblicua, cuadrada o hexagonal y están formadas por subunidades de glicoproteína idénticas con espaciados de centro a centro de 2,5 a 35 nm. Las capas-S son montajes monomoleculares de, típicamente, subunidades idénticas y presentan poros de tamaño idéntico y morfología. Las identidades de secuencia entre las proteínas de la capa-S de organismos diferentes son elevadas. Se piensa que la estructura de poro de las capas-S es un factor importante para la elevada propensión de unión de oro en forma elemental finamente dispersada. Los artículos de revisión de las capas-S son, por ejemplo, los siguientes: J. Bacteriol. 182(4), 2000, 859-868; J. Struct. Biol. 1998 15 diciembre, 124 (2-3) 276-302; Can. J. Microbiol. 2005 Septiembre; 51(9): 731-43; J. Struct. Biol. 2007 Nov; 160 (2): 115-24; FEMS Microbiol Lett. 2007 Febrero; 267 (2): 131-144. Una revisión sobre las capas superficiales de *Lactobacillus* se encuentra en FEMS Microbiology Reviews 29 (2005) 511-529.

Las eubacterias y las arqueobacterias que tienen una capa-S (además de las descritas en el presente documento) se pueden identificar de forma sencilla, por ejemplo, a partir de las bases de datos de microorganismos, las bases de datos de ADN o las bases de datos de proteínas. Por ejemplo, la base de datos de Swissprot (www.expasy.ch/sprot7) se pueden consultar para "capa-S", dando lugar a 1475 resultados de búsqueda a partir de un gran número de microorganismos diferentes en la fecha de presentación de la presente solicitud de patente. Se conocen la proteína y las secuencias de ADN que codifican las proteínas de capa-S para un número grande de eubacterias y arqueobacterias y se pueden extraer a partir de las citadas bases de datos. Algunos ejemplos son los siguientes. La proteína de capa-S de *Halobacterium salinarum* en la base de datos de Swissprot tiene un número de entrada Q9HM69. El clonado y la secuenciación del gen de la glicoproteína de superficie celular de halobacterias se describe en J. Biol. Chem. 262 (1987) 9724-9729. La proteína de capa-S de *Lactobacillus acidophilus* en la base de datos de Swissprot presenta un número de entrada de P35829. La purificación, expresión y sus secuencias se describen en J. Bacteriol. 175:6089-6096 (1993). La proteína de la capa-S de *Bacillus sphaericus* en la base de datos de Swissprot tiene el número de entrada P38537. La clonación y secuenciación del respectivo gen se describió en J. Bacteriol. 171: 4178-4188 (1989). La proteína de la capa-S de *Deinococcus radiodurans* presenta un número de entrada Swissprot P56867. La clonación y la secuenciación del respectivo gen se describieron en J. Bacteriol. 169:5216-5223 (1987).

En la presente invención, dicha biomasa comprende o consiste en un organismo, o más, seleccionado entre *Bacillus sphaericus* tal como *Bacillus sphaericus* CCM2177; *Lactobacillus* tal como *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus* tal como *Halobacterium salinarum*; *Xanthomonas* tales como *Xanthomonas campestris*; y *Shewanella* tal como *Shewanella putrefaciens*. Más preferentemente, la biomasa comprende organismos seleccionados entre *Bacillus sphaericus* tales como *Bacillus sphaericus* CCM2177; *Lactobacillus* tal como *Lactobacillus acidophilus*; y *Halobacterium* tal como *Halobacterium salinarum*.

Si el material particulado contiene mayoritariamente oro elemental u oro encerrado en la estructura reticular de pirita o arsenopirita, son organismos apropiados bacterias y arqueobacterias de los filos Firmicutes (incluyendo Bacilos, Clostridia, Mollicutes y Termolito bacterias), Proteobacterias (incluyendo α -Proteobacterias, γ -Proteobacterias y ϵ -Proteobacterias), Bacterioidetes (incluyendo Clorobi, Flavobacterias, Esfingobacterias), Actinobacterias (incluyendo Acidimicrobios y Actinobacterias), Planctomicetos, Deinococos, Fusobacterias, Euriarqueobacterias (incluyendo Arqueoglobos, Halobacterias, Metanobacterias, Metanococos, Metanomicrobios, Metanopiri, Termococos, Termoplasmata), Crenoarqueobacterias (incluyendo Termoproteos) y Nanoarqueobacterias. Se prefieren los organismos que tienen una capa-S.

Si el material particulado contiene mayoritariamente compuestos de oro tales como seleniuro de oro o telururo, se pueden incluir organismos que producen polisacáridos, preferentemente restos cargados negativamente unidos a la superficie celular, tales como miembros de filo fúngico de Basidomicetos (incluyendo Schizofilaceas y Tiffulaceas) y Ascomicetos (incluyendo Hipocreaceas). De manera alternativa, se pueden incluir cianobacterias reductoras de metal, tales como los miembros del filo Croococales (incluyendo Afanocapsa, Afanotece, Camaesifon, Chondrocisto, Croococo, Croogloecisto, Crocosfera, Cianobacteria, Cianobio, Cianodiction, Cianosarcina, Cianotece, Dactilococopsis, Gleocapsa, Gleotece, Halotece, Johannesbaptistia, Merismopedia, Microcisto, Radiocisto, Rabdododerma, Snowella, Sinecococo, Sinecocisto, Termosinecococo, Woroniquinia), Gloeobacteria, Nostocales (incluyendo Microcaetáceas, Nostocáceas, Rivulariáceas, Escitonematáceas), Oscilatoriales (incluyendo Artronema, Artrospira, Blenotrix, Crinalio, Geitlerinema, Halomiconema, Halospirulina, Hidrocoleo, Jaaginema,

Katagnimeno, Komvoforon, Leptolingbia, Limotrix, Lingbia, Microcoleo, Oscillatoria, Formidio, Planctotricoides, Planctotrix, Plectonema, Pseudanabaena, Pseudoformidio, Esquizotrix, Espirulina, Estarria, Simploca, Tricodesmio, Ticonema), Pleurocapsales (incluyendo Croococidiopsis, Dermocarpa, Dermocarpela, Mixosarcina, Pleurocapsa, Solentia, Estaneria, Xenococo), Proclorales y Estigonematales (incluyendo Capsosira, Clorogloeopsis, Fisquerela, Hapalosifon, Mastigocladopsis, Mastigocladus, Nostocopsis, Estigonema, Sinfionema y Sinfonemopsis, Umezakia, Westielopsis) o procariotas que tienen una capa-S, tales como firmicutes (incluyendo Bacillos, Clostridia, Mollicutes y Termolito bacterias), Proteobacterias (incluyendo α -Proteobacterias, γ -Proteobacterias y ϵ -Proteobacterias), Bacteroidetes (incluyendo Clorobi, Flavobacterias, Esfingobacterias), Actinobacterias (incluyendo Acidimicrobidas y Actinobacterias) Planctomicetos, Deinococos, Fusobacterias, Euriarqueobacterias (incluyendo Archeoglobos, Halobacterias, Metanobacterias, Metanococos, Metanomicrobios, Metanopiri, Termococos, Termoplasmata), Crenoarqueobacterias (incluyendo Termoproteos) y Nanoarqueobacterias.

Si el material particulado contiene mayoritariamente compuestos de paladio, se pueden incluir hongos productores de polisacáridos así como algas con capacidad reductora, tales como Basidiomicetos (incluyendo Esquizofiliceas y Tifulaceas), Ascomicetos (incluyendo Hipocreaceas), Croococales (incluyendo Afanocapsa, Afanotece, Camaesifon, Condrocistos, Croococos, Croogloeocistos, Crocosfera, Cianobacteria, Cianobio, Cianodiction, Cianosarcina, Cianotece, Dactilococopsis, Gleocapsa, Gleotece, Halotece, Johannesbaptistia, Merismopedia, Microcistos, Radiocistos, Rhabdoderma, Snowella, Sinecococo, Sinecocistos, Termosinecococo, Woroniquinia), Gleobacteria, Nostocales (incluyendo Microcaetáceas, Nostocáceas, Rivulariáceas, Escitonematáceas), Oscillatoriales (incluyendo Artronema, Artrospira, Blenotrix, Crinalio, Geitlerinema, Halomiconema, Halospirulina, Hidrocoleo, Jaaginema, Katagnimeno, Komvoforon, Leptolingbia, Limotrix, Lingbia, Microcoleo, Oscillatoria, Formidio, Planctotricoides, Planctotrix, Plectonema, Pseudanabaena, Pseudoformidio, Esquizotrix, Espirulina, Estarria, Simploca, Tricodesmio, Ticonema), Pleurocapsales (incluyendo Croococidiopsis, Dermocarpa, Dermocarpela, Mixosarcina, Plurocapsa, Solentia, Estaneria, Xenococo), Proclorales y Estigonematales (incluyendo Capsosira, Clorogloeopsis, Fisquerela, Hapalosifon, Mastigocladopsis, Mastigocladus, Nostocopsis, Estigonema, Sinfionema y Sinfonemopsis, Umezakia, Westielopsis).

Se pueden incluir microorganismos que llevan otros compuestos modificadores o de unión a metales, heterólogos u homólogos, no sean capas-S, polisacáridos o enzimas reductoras, por ejemplo, metalotioneinas, fitoquelatinas o agentes quelantes metálicos naturales de unión superficial (por ejemplo, sideróforos).

Si dicho metal es oro elemental, dicha biomasa puede comprender un organismo que pertenece al género *Bacillus* tal como *Bacillus sphaericus* CCM2177; *Lactobacillus* tal como *Lactobacillus acidophilus*; *Deinococcus* tal como *Deinococcus radiodurans*; *Halobacterium* tal como *Halobacterium salinarum*; *Escherichia* tal como *E. coli* K-12; *Arthrobacter* tal como *Arthrobacter globiformis*; *Xanthomonas* tal como *Xanthomonas campestris*; *Pseudomonas* tal como *Pseudomonas fluorescens*; *Shewanella* tal como *Shewanella putrefaciens*; *Trichoderma* tal como *Trichoderma reesei*; *Microcystis* sp. y/o *Anabaena* sp.

Si dicho metal es un compuesto de oro (tal como un compuesto de oro soluble en agua o un compuesto de oro insoluble en agua), en particular un compuesto de oro (III), dicha biomasa puede comprender *Bacillus* tal como *Bacillus sphaericus* (por ejemplo, *Bacillus sphaericus* DSM396 o CCM2177) o *Bacillus fusiformis*; *Deinococcus radiodurans*; *Corynebacterium* tal como *Corynebacterium glutamicum*; *Escherichia* tal como *E. coli* K-12; *Arthrobacter* tal como *Arthrobacter globiformis*; *Xanthomonas* tal como *Xanthomonas campestris*; *Pseudomonas* tal como *Pseudomonas fluorescens*; *Shewanella* tal como *Shewanella putrefaciens*; *Schizophyllum* tal como *Schizophyllum commune*; *Trichoderma* tal como *Trichoderma reesei*; *Sclerotium* tal como *Sclerotium rolfsii*; *Microcystis* sp.; *Anabaena* sp.; y/o *Aphanizomenon* sp.

Si dicho metal es paladio, en particular un compuesto de paladio (II), y dicha biomasa puede comprender *Shewanella* tal como *Shewanella putrefaciens*; *Schizophyllum* tal como *Schizophyllum commune*; *Trichoderma*, tal como *Trichoderma reesei*; *Microcystis* sp, *Anabaena* sp; o *Aphanizomenon* sp.

Se pueden obtener las condiciones de crecimiento apropiadas y los requisitos de nutrientes para los organismos mencionados anteriormente a partir de la técnica anterior general en microbiología. También se proporcionan condiciones de crecimiento apropiadas por medio de las colecciones de microorganismos tales como American Type Culture Collection (ATCC) o la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ) a partir de las cuales se pueden obtener los miembros de las clases de microorganismos mencionados anteriormente.

Dependiendo de la composición del material particulado, puede considerarse la combinación de dos o más microorganismos en dicha biomasa para recuperar formas químicas diferentes de metal o tipos diferentes de metales en paralelo.

En la etapa (i) del proceso de la invención, se incuba la mezcla acuosa preparada en la etapa (i) para permitir la unión de dicho metal por parte de dicha biomasa. El tiempo de incubación depende de la velocidad de unión. De manera general, el tiempo de incubación se encuentra entre 0,5 horas y 96 horas, preferentemente entre 0,5 horas y 48 horas, más preferentemente entre 1 y 48 horas, más preferentemente entre 1 hora y 24 horas y del modo más

preferido entre 3 y 24 horas. La temperatura de incubación depende mayoritariamente del tipo de biomasa usada. Se puede usar el control de la temperatura para regular el crecimiento de dicha biomasa. Durante la incubación, se controlan los parámetros de la mezcla acuosa tales como pH, contenido de nutrientes, temperatura, etc., y, en caso de resultar necesario, se controlan para mantener las condiciones de incubación deseadas.

5 En la etapa (iii), se separa dicha biomasa que presenta el metal unido de la mezcla de la etapa (ii). Se pueden usar métodos conocidos para la separación. Por ejemplo, se puede dejar sedimentar el material particulado; se puede separar la biomasa del sobrenadante por medio de centrifugación o filtración. De manera alternativa, se puede insuflar un gas tal como aire en el interior del reactor o del estanque para formar una capa de biomasa flotante; por ejemplo en una capa de espuma, sobre la superficie de la mezcla acuosa; posteriormente se puede desnatar la biomasa flotante. Dependiendo de la etapa posterior, se puede secar la biomasa separada, para facilitar el almacenamiento y/o el transporte de la biomasa antes de llevar a cabo la etapa (iv).

15 En la etapa (iv), se aísla el metal unido a la biomasa de dicha biomasa. Por ejemplo, el metal se puede someter a desorción de la biomasa en una fase líquida usando condiciones ácidas o básicas. De manera alternativa, se puede someter la biomasa a combustión para destruir y eliminar la materia orgánica de dicha biomasa. El metal se puede purificar a partir del residuo o las cenizas de la biomasa.

20 Se pueden combinar el proceso de la invención con las etapas de proceso usadas para asilar metales de los minerales de metal conocidos a partir de la técnica anterior. Con el fin de facilitar el acceso de la biomasa de la invención a las partículas metálicas o a los compuestos presentes en el material particulado, se puede usar una etapa de biolixiviado conocida en combinación con la invención. Por ejemplo, si dicho material particulado es un mineral ácido tal como pirita, se pueden usar bacterias oxidantes de sulfuro tal como *Tiobacilos* para, al menos parcialmente, degradar el mineral sulfídico. Dicho biolixiviado se describe por parte de Rawlings and Jonhson, 2007.

25 Este tratamiento se puede llevar a cabo antes de la etapa (i) de la invención o de manera concurrente con la etapa (i) de la invención por medio de la adición del organismo de biolixiviado a la disolución acuosa de la etapa (i). Además, se pueden proporcionar organismos de biolixiviado, tales como *T. ferroxidans*, *T. thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *T. organoparus*, *Thermosthrix thiopara*, *Sulfolobus acidocaldarius*, y *S. brierleyi*, con una capa-S de unión de metal, usando técnicas de ingeniería molecular conocidas en la técnica anterior. Además de las capas-S, también se pueden introducir otras estructuras de unión de metal, tales como metalotioneinas, fitoquetatinas, o polisacáridos apropiados, en el interior de los organismos con el fin de aumentar su capacidad de unión a metal. Estos organismos sometidos a ingeniería, capaces de degradar minerales, tales como pirita o arsenopirita, y capaces de unir metales liberados o compuestos de metal, se pueden usar posteriormente como biomasa en la etapa (i) de la presente invención. También se puede usar el proceso descrito en el documento de Estados Unidos 2007/107550 para el pretratamiento de los minerales recalcitrantes, en el cual se sustituye la etapa de tratamiento hidrometalúrgico por el proceso de la presente invención.

Breve Descripción de las Figuras

40 Figura 1. Recuperación convencional de metales preciosos (oro de ejemplo) frente al proceso de la presente invención.
La Figura 2 muestra una recuperación de metal por medio de cultivos celulares microbianos.

Métodos

45 Aislamiento de organismos apropiados para la presente invención

50 Se pueden aislar microorganismos, en particular bacterias, arqueobacterias, hongos y algas que presentan la afinidad de unión de metal y la especificidad requeridas, a partir de fuentes ambientales, usando técnicas microbiológicas clásicas. Las fuentes ambientales (hábitats) que contienen los organismos apropiados para la presente invención son, sin embargo no de forma exclusiva, sedimentos y aguas expuestas a contaminación por metales pesados o radionucleidos, tales como drenajes ácidos de mina, efluentes de electrogalvanizado, pilas residuales de minería, efluentes industriales y plantas de tratamiento de aguas residuales. Con frecuencia, los microorganismos viables y competitivos en estos ambientes han adoptado estrategias para unir de manera eficaz e

55 inmovilizar metales pesados bien sobre su superficie o bien en su interior con el fin de reducir su toxicidad. Típicamente, las envolturas celulares de microorganismos exhiben cargas negativas, que permiten la adsorción de metales catiónicos. Los grupos funcionales principales que contribuyen a esta carga negativa son restos de fosfato y grupos carboxílicos. De manera sorprendente, los inventores han encontrado que algunas especies microbianas también son capaces de unir sustancias metálicas de manera eficaz, es decir asociaciones de metales no cargados.

60 Las fracciones aisladas microbianas o cepas formadas por colecciones de cepas ya existentes han sido sometidas a ensayo en cuanto a su capacidad para retirar metales preciosos (específicos) de la disolución así como también por su capacidad de unión a metales. Esto se hace por medio de la incubación de cultivos en matraces a escala de laboratorio con concentraciones relevantes de metales preciosos durante varias horas (véase ejemplos 1 y 2). En el proceso de la invención, se trituran y se pulverizan, respectivamente, minerales de oro de baja calidad típicos que contienen 1-10 g de oro por t de roca. El material resultante se mezcla con los microorganismos cultivados para

obtener una suspensión de mineral de carga de partículas sólidas de 5 a 100 kg/m³, lo que corresponde de 5 mg a 1 g de oro por metro cúbico de suspensión. Por consiguiente, las concentraciones de metal de ensayo en los experimentos a escala de laboratorio deberían variar de 25 nM a 5 µM.

5 Cultivo y recolección de microorganismos para el biolixiviado libre de cianuro

La invención se puede llevar a cabo usando tanques exteriores abiertos y grandes, similares a recipientes de reacción usados en las plantas de tratamiento de aguas residuales. En estos recipientes, los microorganismos se cultivan, usando sustratos de crecimiento en masa baratos, tales como molasas. Es necesario establecer las condiciones de crecimiento específicas, por ejemplo, pH, concentración de nutrientes y composición, y tasas de aireación, para el conjunto deseado de microorganismos usados en un proyecto dado. Las técnicas para mantener de forma estable las poblaciones microbianas en sistemas abiertos son bien conocidas por los expertos en la técnica. De igual forma, la recuperación de lodos de biomasa se encuentra bien establecida.

Se sabe que las células de *Nocardia sp.* son recuperadas por medio de la proteína de capa-S haciéndolas comparativamente hidrófobas, lo que ha sido identificado como una causa principal de formación de espuma en lodos activados (Iwahori, Tokitomi et al., 2001). Mientras que en el tratamiento de aguas residuales no se desea la formación de espuma, esta propiedad bacteriana se puede usar de manera ventajosa en el alcance de la presente invención, dado que la espuma, que comprende una parte sustancial de biomasa bacteriana, puede ser desnatada fácilmente a partir de la superficie de los estanques de cultivo. La formación de espuma se puede mejorar por medio del insuflado de aire en el interior de la suspensión acuosa, lo que conducirá a la acumulación de organismos que presentan un metal unido en la superficie de la suspensión.

Los organismos que no presentan componentes de unión de metales de forma natural pueden dotarse de componentes que permiten la unión del metal de la invención por medio de ingeniería genética. Por ejemplo, se pueden introducir fragmentos de ADN que codifican genes o mecanismos que conducen a la formación de estructuras de unión de metal o de inmovilización de metal, en el interior de las cepas de tipo salvaje, usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. La presente invención hace uso de microorganismos que de forma natural - o por medio de ingeniería genética - presentan el potencial de unir átomos de metal precioso o asociaciones. Esta propiedad se explota para inmovilizar los metales liberados a partir de minerales por medio de organismos vivos, permitiendo la separación de metal (unido a la biomasa) del mineral residual y la roca.

Ejemplos de componentes naturales u obtenidos por medio de ingeniería genética de organismos que se pueden usar para unir el metal de la invención son los siguientes. Entre las clases de compuestos siguientes, se prefieren las capas-S.

Metalotioninas. Estos polipéptidos quelantes de metal han sido identificados en muchos grupos de organismos, incluyendo mamíferos, nemátodos, hongos y bacterias. Las metalotioneinas se caracterizan por un contenido de cisteína extremadamente elevado de hasta 33% configurado como asociaciones (Cys-X-X-Cys) o (Cys-X-Cys) y la ausencia de aminoácidos aromáticos e hidrófobos.

Fitoquelatinas. Típicamente, las fitoquelatinas aparecen en plantas y algas y son polipéptidos cortos y sintetizados de forma no translacional con unidades de repetición variable de gamma-glutamilcisteína (γ Glu-Cys)_nGly (n= 2-11). Las fitoquelatinas sintéticas [(Glu-Cys)_nGly] tienen la ventaja de que se pueden sintetizar por medio de la maquinaria ribosómica y que en algunos casos unen metales incluso de manera más eficaz que las fitoquelatinas naturales.

Capas-S. Las capas superficiales proteínicas para-cristalinas (capas-S) aparecen como estructuras superficiales en casi todos los grupos filogenéticos principales de bacterias y en casi todas las arqueobacterias (Sara and Sleytr 2000). Las proteínas (40-200 kDa) son segregadas y posteriormente se auto-ensamblan sobre la membrana bacteriana, formando un estructura nanoporosa muy regular (porosidad de 30-70%). Las proteínas de capa-S constituyen hasta 20% de todas las proteínas celulares. Debido a su elevado contenido en aminoácidos hidrófobos, las estructuras reticulares de capa-S en general dan lugar a paredes de células procariontas menos hidrófilas, lo que puede conducir a una mayor formación de espuma durante el cultivo. Se ha usado la inmovilización de metales sobre matrices de capa-S en nanotecnología para sintetizar nano-asociaciones metálicas de metales preciosos Au (Dieluweit, Pum et al., 1998; Györvary, Schroedter et al., 2004) y Pt y Pd (Wahl, Mertig et al. 2001).

Polisacáridos. Algunos microorganismos producen biopolímeros, por ejemplo, polisacáridos que son capaces de unir 0,1 mg a 1,4 mg/g de polímero aislado, dependiendo de los microorganismos bajo investigación y del metal específico (Gutnick and Bach 2000). De manera general, la unión ocurre por medio de interacciones electrostáticas entre grupos cargados negativamente del biopolímero y el metal cargado positivamente o por medio de quelación del metal por medio de grupos hidroxilo.

Ejemplo 1: Eliminación de iones metálicos y asociaciones de metal por medio de biomasa microbiana en disolución

65 *Configuración experimental*

Se cultivaron cepas microbianas que incluían cepas de bacterias, arqueobacterias, hongos y algas en una escala de 50 ml de acuerdo con técnicas microbiológicas estándar, usando las condiciones de crecimiento indicadas (véase la Tabla 1). En la fase temprana de crecimiento estacionario, se añadieron los metales a los cultivos hasta una concentración final de 3 μM , lo que corresponde a una cantidad total de 25 μg de oro y 14 μg de paladio, respectivamente. Se suministraron metales en forma de asociaciones de Au (Sigma, 3-5,5 nm de diámetro), HAuCl_4 (Sigma) y $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma). Las concentraciones de metal usadas imitan la cantidad de metales típicamente encontrados en los minerales de baja calidad. Se incubaron los cultivos con el mineral modelo durante 24 horas antes de recoger la biomasa por medio de centrifugación (en caso de añadir iones de metal) y filtración (en caso de añadir asociaciones de metal) con el fin de evitar la cosedimentación de las asociaciones en el último caso. Se lavaron las muestras de biomasa con agua desionizada y estéril y se analizaron por medio de ICP-MS (Espectrometría de Masa de Plasma Con Acoplamiento Inductivo) de acuerdo con DIN EN ISO 11885 para conocer su contenido de Au y Pd, respectivamente. Los datos se relacionaron con el peso seco de la biomasa presente en los cultivos. Antes del análisis de ICP-MS se desintegraron las muestras por medio de ácido nitrofluorhídrico y tratamiento de microondas, lo que conduce a la oxidación y solubilización de todos los metales presentes.

Resultados

En la etapa 1, se cultivaron organismos en medios de crecimiento estándar simples, posteriormente (etapa 2) se incubaron las células con iones de metal y asociaciones, respectivamente, antes de ser separadas de la fase líquida (etapa 3) con el fin de analizar la biomasa en cuanto a la cantidad de metal pesado acumulado (etapa 4).

De manera sorprendente, un amplio intervalo de microorganismos se convirtió en apropiado para la presente invención, es decir, la acumulación de metales a partir de minerales modelo, incluyendo organismos procariotas, hongos y algas (Figura 2). Excepto para las arqueobacterias *H. salinarum*, los cultivos de todos los microorganismos fueron capaces de acumular Au (III) en cierto modo, inmovilizando *B. sphaericus* DSM396, *C. glutamicum*, *E. coli*, *P. fluorescens* y *S. rolfesii* 40-60% de los iones de metal suministrados, y uniendo *B. fusiformis*, *S. commune*, *T. reesei* y *Aphanizomenon* incluso 80-100%.

Los perfiles de unión de metal de las especies de metal investigadas fueron distintos y característicos para cada microorganismo. No todos los organismos capaces de acumular oro iónico fueron también capaces de unir Pd(II), siendo de forma general la afinidad para los iones de paladio menor que para los iones de oro. Por consiguiente, las interacciones electrostáticas entre la célula negativamente cargada y los iones metálicos positivamente cargados no se pudieron tener en cuenta de manera exclusiva para la capacidad de unión de metal observada de los organismos estudiados, sino que existen características que confieren afinidad frente al metal específico (compuestos) (véase anteriormente). Por tanto, los organismos con perfiles de unión apropiados se pueden seleccionar de acuerdo con las necesidades específicas de la operación de minería.

Por ejemplo, *S. putrefaciens*, *S. commune* y *T. reesei*, todos ellos conocidos productores de polisacáridos, fueron capaces de recuperar 9-25% del paladio suministrado, demostrando que existen cepas microbianas con afinidad satisfactoria frente al grupo de metales VIIIb y que se pueden usar para la práctica de la presente invención.

De manera sorprendente, se encontraron alginantes particulares de asociaciones de Au(0) entre organismos (bacterianos y arqueobacterianos) conocidos por transportar capas-S. Por ejemplo, los cultivos de *B. sphaericus* CCM 2177, *L. acidophilus* y *H. salinarum* fueron capaces de acumular cantidades sustanciales (42-78%) de las asociaciones de metal suministradas. Mientras que se sabe que determinadas capas-S confieren afinidad frente a iones de metal específicos, la unión directa de las asociaciones atómicas de Au(0) por medio de biomasa microbiana no ha sido descrita todavía.

Ejemplo 2: Capacidad de unión de metal de la biomasa microbiana

Configuración experimental

Principalmente se llevaron a cabo los experimentos como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se suministró Au(III) 3 μM a los cultivos, que representaba el contenido de oro de 1 a 10 g de mineral modelo de baja calidad y Au (III) 3 mM, que imitaba el contenido de oro de un mineral modelo de alta calidad. Se normalizaron las cantidades absolutas de oro acumuladas por la biomasa determinadas por medio de ICP-MS por medio de la cantidad de biomasa (expresada como g de peso seco) presente en cada cultivo de 50 ml.

Resultados

El rendimiento de la recuperación de metal de un cultivo microbiano añadido a una suspensión de mineral únicamente no viene determinado únicamente por el volumen de cultivo añadido, sino también por medio de la densidad de biomasa de este cultivo obtenido en una disolución de nutriente dada. Con el fin de apuntar esta correlación, la Tabla 2 proporciona las capacidades de unión de Au(III) de los organismos estudiados, es decir, la cantidad de oro acumulada por una cantidad dada de biomasa, para dos concentraciones de metal diferentes.

De manera general, las cargas de metal de biomasa fueron de 100 a 800 veces más elevadas si se suministraba Au(III), indicando que en un mineral de baja calidad, la máxima capacidad de unión de metal de las células microbianas se encuentra lejos de agotarse. Únicamente en el caso de *P. fluorescens*, y *D. radiodurans*, las cargas de metal a una concentración inicial de Au(III) de 3 µM y 3 mM fueron casi idénticas, lo que sugiere que ya se había alcanzado la capacidad máxima de unión.

Se observaron las cargas de metal más elevadas en el mineral modelo de alta calidad para los procariontes *G. stearothermophilus* y *H. salinarum* con 337 y 520 mg de Au(III) unido por g de biomasa seca, respectivamente. Con el mineral modelo de baja calidad, *D. radiodurans* y *X. campestris* mostraron las cargas de oro más elevadas con más de 0,7 mg/g de biomasa seca. En comparación con el mineral de baja calidad de la vida real con un contenido de oro de 1 g/t de roca, la biomasa permitiría por consiguiente una acumulación de metal precioso de más de 700 veces.

En necesario apuntar que aunque se muestren cargas de metal bastante bajas, los hongos *S. commune* y *T. reesei* resultan candidatos prometedores para la invención descrita. Esto es debido a las elevadas densidades celulares alcanzadas por estas cepas en el medio de crecimiento empleado. Debido a que partes sustanciales del suministro de Au (31 y 100%, respectivamente) son adsorbidas por la biomasa incluso a una concentración inicial de Au (III) de 3 mM, se puede asumir que una pequeña alícuota del cultivo usado de 50 ml habría sido suficiente para acumular el metal precioso, aumentando la carga de metal de la biomasa.

Tabla 1. Cepas y condiciones de cultivo

Cepa ¹	Grupo filogenético	Características	Condiciones de cultivo
<i>Bacillus sphaericus</i> DSM 396	Bacteria, Firmicutes	capa-S	28 °C, 180 rpm, Caldo de LuriaBertani (LB)
<i>Bacillus fusiformis</i> DSM 2898T	Bacteria, Firmicutes	capa-S	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> DSM 2358	Bacteria, Firmicutes	capa-S	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Bacillus sphaericus</i> CCM 2177	Bacteria, Firmicutes	capa-S	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079	Bacteria, Firmicutes	capa-S	28 °C, 180 rpm, medio DSM 11
<i>Deinococcus radiodurans</i> DSM 20539	Bacteria, Deinococo	capa-S	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Corynebacterium glutamicum</i> HD ⁵	Bacteria, Actinobacteria	capa-S, polisacáridos	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Halobacterium salinarum</i> DSM 670	Arqueobacteria, Euriarqueobacteria	capa-S	28 °C, 180 rpm, medio DSM 97
<i>E. coli</i> K-12 ATCC 47076	Bacteria, Proteobacteria	capa LPS	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124	Bacteria, Actinobacteria	Exopolisacárido (EPS)	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Xanthomonas campestris</i> HD ⁵	Bacteria, Proteobacteria	EPS	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50106	Bacteria, Proteobacteria	capa LPS	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Shewanella putrefaciens</i> HD ⁵	Bacteria, Proteobacteria	polisacárido	28 °C, 180 rpm, LB
<i>Schizophyllum commune</i> CBS 343,81	Hongos, Basidiomicetos	EPS	28 °C, 180 rpm, medio Dons ²
<i>Trichoderma reesei</i> CBS 392,92	Hongos, Acomicetos	EPS	28 °C, 180 rpm, medio de lactosa ³
<i>Sclerotium rolfsii</i> ATCC26325	Hongos, Basidiomicetos	EPS	28 °C, 180 rpm, caldo de dextrosa y patata (PDA)
<i>Microcystis</i> sp. HD ⁶	Cianobacteria, Crococales	Capacidad reductora	28 °C, cultivos en reposo, resuspensión una vez al día, medio WC ⁴ , ciclos de 12 h día/12 h noche
<i>Anabaena</i> sp. HD ⁶	Algas, Cianobacteria, Nostocales	Capacidad reductora	28 °C, cultivos en reposo, resuspensión una vez al día, medio WC ⁴ , ciclos de 12 h día/12 h noche
<i>Aphanizomenon</i> sp. HD ⁶	Algas, Cianobacteria, Nostocales	Capacidad reductora	28 °C, cultivos en reposo, resuspensión una vez al día, medio WC ⁴ , ciclos de 12 h día/12 h noche

Cepa ¹	Grupo filogenético	Características	Condiciones de cultivo
<i>Planktothrix</i> sp. HD ^o	Algas, Cianobacterias, Oscillatoriales	Capacidad reductora	28 °C, cultivos en reposo, resuspensión una vez al día, medio WC ⁴ , ciclos de 12 h día/12 h noche

¹ Las cepas designadas como "DSM" se encuentran disponibles en DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), "ATCC" significa Colección Americana de Cultivos Tipo, "CCM" indica Colección Checa de Microorganismos, "CBS" es Centraalbureau voor Schimmelcultures (NL), y "HD" se refiere a BRAIN BioArchives.
² Dons, JJM; de Vries, OMH; Wessels, JGH (1979) Biochim Biophys Acta, 563: 100-112
³ Bailey, MJ; Askolin, S; Hörhammer, N; Tenkanen, M; Linder, M; Penttillä, M; Nakari-Setälä, T (2002) Appl Microbiol Biotechnol 58: 721-727
⁴ Guillard, RRL. and Lorenzen, CJ (1972) Journal of Phycology, 8: 10-14
⁵ Se pueden obtener las cepas correspondientes a partir de DSMZ con números de cepa DSM 20300, DSM 1050 y DSM 6067
⁶ Se pueden obtener las cepas correspondientes a partir de la Colección de Cianobacterias de Cultivos de Pasteur (PCC).

Tabla 2. Cargas de metal de biomasa a diferentes concentraciones iniciales c_0 de Au(III)

Cepa	c_0 (Au ³⁺) = 3 μ M: μ g Au(III)/g de biomasa seca	c_0 (Au ³⁺) = 3 mM: mg Au(III)/g de biomasa seca
<i>B. sphaericus</i> DSM 396	208	72
<i>B. fusiformis</i>	256	43
<i>G. estearothermophilus</i>	410	337
<i>B. sphaericus</i> CCM 2177	217	37
<i>L. acidophilus</i>	n.d.	n.d.
<i>D. radiodurans</i>	730	36
<i>C. glutamicum</i>	230	25
<i>H. salinarum</i>	35	520
<i>E. coli</i>	137	32
<i>A. globiformis</i>	84	18
<i>X. campestris</i>	770	132
<i>P. fluorescens</i>	108	0,140
<i>S. putrefaciens</i>	144	28
<i>S. commune</i>	49	25
<i>T. reesei</i>	17	13
<i>S. rolfisii</i>	3	0,750

5 Referencias

- Akcil, A. y T. Mudder (2003). "Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: process review". Biotechnol Lett 25(6): 445-50.
- Blumer, C. y D. Haas (2000). "Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis". Arch Microbiol 173(3): 170-7.
- 10 Dieluweit, S., D. PUm, y col. (1998). "Formation of a gold superlattice on a S-layer with square lattice symmetry". Supramol Sci 5: 15-19.
- Guntick, D. L. y H. Bach (2000). "Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals; new products and novel formulations". Appl Microbiol Biotechnol 54(4): 451-60.
- 15 Györfvay, E., A. Schroedter, y col. (2004). "Formation of nanoparticle arrays on S-layer protein lattices". J Nanosci Nanotechnol 4(1-2): 115-20.
- Hiebert, F. K. y P.C. Bennett (1992). "Microbial Control of Silicate Weathering in Organic-Rich Ground Water". Science 258(5080): 278-281.
- Hughes, M.A., A.L. Sharif, y col. (1988). "The molecular biology of cyanogenesis". Ciba Found Symp 140: 111-30.
- 20 Iwahori, K., T. Tokutomi, y col. (2001). "Formation of stable foam by the cells and culture supernatant of *Gordonia* (*Nocardia*) *amarae*". J Biosci Bioeng 92(1): 77-9.
- Korte, F., M. Spittler, y col. (2000). "The cyanide leaching gold recovery process as a nonsustainable technology with unacceptable impacts on ecosystems and humans: the disaster in Romania". Ecotoxicol Environ Saf 46(3): 241-5.
- 25 Liu, W., X. Xu, y col. (2006). "Decomposition of silicate materials by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture". Environ Geochem Health 28(1-2): 133-40.
- Rawlings, D.E. y D.B. Johnson (2007). "The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia". Microbiology 153: 315-324.
- 30 Sara, M. y U.B. Sleytr (2000). "S-layer proteins". J Bacteriol 182(4): 859-68.

Vieira, R. H. y B. Volesky (2000). "Biosorption: a solution to pollution?". *Int Microbiol* 3(1): 17-24.
Wahl, R., M. Mertig, y col. (2001). "Electron-beam induced formation of highly ordered palladium and platinum nanoparticle arrays on the S-layer of *Bacillus sphaericus* NCTC 9602". *Adv Mater* 13: 736-740.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso libre de cianuro para aislar el metal precioso oro de un material particulado que contiene partículas de dicho metal precioso en forma elemental, que comprende las etapas siguientes:
- 5 (i) preparar una mezcla acuosa que contiene dicho material particulado y biomasa que comprende eubacterias que tienen una capa-S o arqueobacterias que tienen una capa-S;
- (ii) incubar dicha mezcla acuosa de la etapa (i) para permitir la unión de dicho metal precioso a dicha biomasa;
- 10 (iii) separar la biomasa que tiene el metal unido de la mezcla acuosa de la etapa (ii); y
- (iv) aislar el metal de dicha biomasa separada en la etapa (iii);
- en el que dicha biomasa comprende o consiste en uno o más organismos seleccionados entre *Bacillus sphaericus* tales como *Bacillus sphaericus* CCM2177; Lactobacilo tal como *Lactobacillus acidophilus*; Halobacteria tal como *Halobacterium salinarum*; Xantomonas tal como *Xanthomonas campestris*; y Shewanella tal como *Shewanella putrefaciens*.
- 15 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de incubación (i) se lleva a cabo durante 1 a 48 horas, preferentemente durante 1 a 24 horas.
- 20 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho material particulado es una mena de mineral o un material residual de minería de mineral.
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho material particulado contiene minerales sulfídicos tales como pirita.
- 25 5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho material particulado presenta un tamaño medio de partícula de como máximo 5 mm, preferentemente como máximo 1 mm, más preferentemente como máximo 400 µm, y del modo más preferido como máximo 100 µm.
- 30 6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la etapa (iii) implica insuflar aire en el interior de dicha dispersión acuosa para acumular la biomasa que presenta un metal unido en la superficie de dicha mezcla acuosa.
7. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa (ii) comprende agitar dicha mezcla acuosa para poner dicha biomasa en contacto estrecho con las partículas de dicho material particulado.
- 35 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho material particulado se trata con bacterias oxidantes de sulfuro para biolixiviar dicha composición particulada antes de la etapa (i) o de manera concurrente con la misma.
- 40 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dichas bacterias oxidantes de sulfuro están modificadas genéticamente para expresar una capa-S sobre la superficie de dicha bacteria.
- 45 10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha biomasa comprende o consiste en uno o más organismos seleccionados entre Deinococo tal como *Deinococcus radiodurans*; Escherichia tal como *E. coli* K-12; Artrobacter tal como *Arthrobacter globiformis*; y Pseudomonas tal como *Pseudomonas fluorescens*.
- 50 11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho oro en forma elemental se encuentra presente en forma finamente dispersada o forma coloidal en dicha mezcla acuosa de la etapa (i).
- 55 12. El uso de la biomasa seleccionada entre las siguientes clases de organismos: eubacterias y arqueobacterias que contienen una capa-S para aislar el metal precioso oro de un material particulado que contiene dicho metal precioso en forma elemental; en el que dicha biomasa comprende o consiste en uno o más organismos seleccionados entre *Bacillus sphaericus* tales como *Bacillus sphaericus* CCM2177; Lactobacilo tal como *Lactobacillus acidophilus*; Halobacteria tal como *Halobacterium salinarum*; Xantomonas tal como *Xanthomonas campestris*; y Shewanella tal como *Shewanella putrefaciens*.

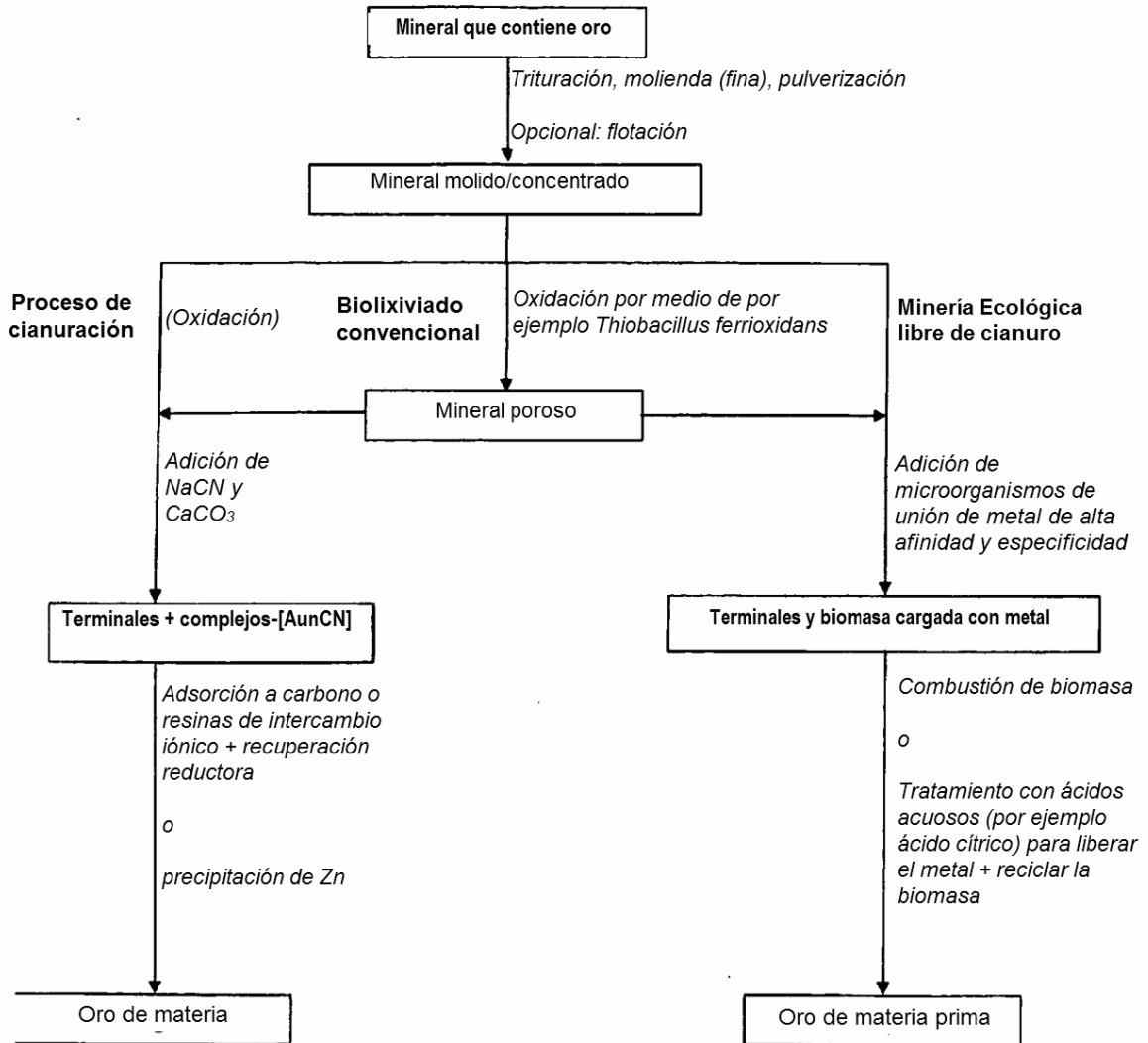


Fig. 1

Perfiles de unión (disoluciones de metal 3 μM)

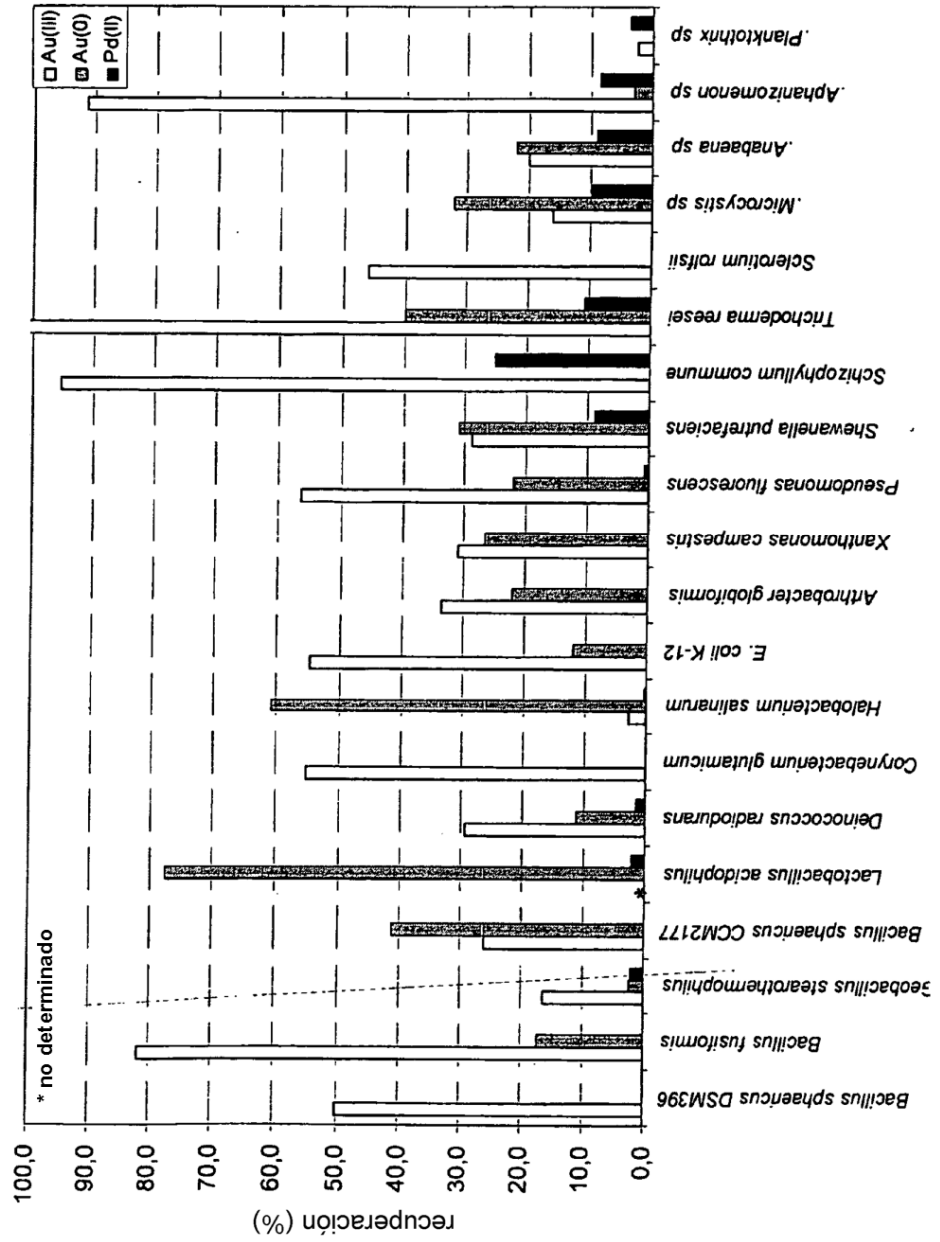


Fig. 2