

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**EFFECTO DEL PH EN EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN
DE COBRE A TRAVÉS DE UN CONSORCIO BACTERIANO
AISLADO A PARTIR DE DRENAJES ÁCIDOS DE LA
EMPRESA MINERA HUINAC S.A.C DEL DEPARTAMENTO
DE ANCASH EN CONDICIONES DE LABORATORIO**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES

Iveth Johana De Los Santos Valverde

Yessenia Stefany Sánchez Castrejón

ASESOR

Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos

Nuevo Chimbote, Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA



EFFECTO DEL PH EN EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN DE
COBRE A TRAVÉS DE UN CONSORCIO BACTERIANO
 AISLADO A PARTIR DE DRENAJES ÁCIDOS DE LA EMPRESA
MINERA HUINAC S.A.C DEL DEPARTAMENTO DE ANCASH EN
CONDICIONES DE LABORATORIO

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

Iveth Johana De Los Santos Valverde

Yessenia Stefany Sánchez Castrejón

Revisado y Aprobado por el Asesor:

.....

Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

EFFECTO DEL PH EN EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN DE
COBRE A TRAVÉS DE UN CONSORCIO BACTERIANO
AISLADO A PARTIR DE DRENAJES ÁCIDOS DE LA EMPRESA
MINERA HUINAC S.A.C DEL DEPARTAMENTO DE ANCASH EN
CONDICIONES DE LABORATORIO

AUTORES

Bach. Iveth Johana De Los Santos Valverde

Bach. Yessenia Stefany Sánchez Castrejón

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

.....
M.Sc. Ángel Castro Alvarado
Presidente

.....
Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos
Secretario

.....
Blgo. Mblgo. Eterio Alva Muñoz
Integrante

DEDICATORIA

A nuestros padres, quienes con su amor y apoyo incondicional estuvieron en cada etapa de nuestro desarrollo profesional, a los cuales estaremos eternamente agradecidas.

A nuestros hermanos, quienes formaron parte de todas las etapas de nuestra vida, brindándonos su cariño y apoyo.

A nuestros familiares, en especial a nuestras abuelitas Digna y que en vida fue Betty, por el inmenso amor que nos brindaron siempre.

A Dios, quien nos ha dado la fortaleza para seguir adelante a pesar de los obstáculos que se han presentado en el camino y así cumplir con nuestros objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Al Ingeniero Cesar Villegas Neira, por permitirnos ser parte de una experiencia increíble, al realizar el muestreo de drenajes ácidos de mina in situ en el departamento de Ancash, el cual fue posible gracias a su disposición, apoyo logístico e interés en la investigación en biotecnología ambiental.

A nuestro coasesor el Dr. Mario Esparza Mantilla, el laboratorio de Biominería y la Universidad de Antofagasta por darnos la oportunidad de trabajar en sus instalaciones y brindarnos el apoyo académico que necesitábamos en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

A nuestros amigos de la Universidad Privada del Norte - Cajamarca: Ing. Gary Farfán, Ing. Gladys Licapa Redolfo, Ing. Jorge Guerrero Vargas e Ing. Antoni Cruzado Cadenillas por compartir sus conocimientos de ingeniería de minas con nosotras.

A nuestro asesor el Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos por su asesoría e interés en la realización de nuestro trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional de Santa, nuestra alma máter, y a la cual debemos toda nuestra formación profesional.

Y a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo de investigación.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HIPÓTESIS.....	4
1.2. OBJETIVOS.....	4
1.2.1. Objetivo general.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. VARIABLES.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. PROPIEDADES, RESERVAS, PRODUCCIÓN, PROCESOS TECNOLOGICOS Y USOS DEL COBRE.....	6
2.1.1. Propiedades del cobre.....	6
2.1.1.1. Mineral oxidado.....	6
2.1.1.2. Mineral sulfurado.....	7
2.1.2. Reservas de cobre.....	7
2.1.2.1. Reservas mundiales de Cobre.....	7
2.1.2.2. Reservas nacionales de Cobre.....	8
2.1.3. Producción del cobre.....	8
2.1.3.1. Producción mundial de Cobre.....	8
2.1.3.2. Producción nacional de Cobre.....	9
2.1.4. Procesos tecnológicos.....	9
2.1.4.1. Proceso pirometalúrgico.....	9
2.1.4.2. Proceso hidrometalúrgico.....	10
2.1.5. Usos del cobre.....	12
2.2. LIXIVIACIÓN BACTERIANA.....	13
2.2.1. Generalidades.....	13
2.2.2. Biolixiviación.....	15
2.2.3. Microorganismos biolixiviantes.....	15
2.2.4. Mecanismos de biolixiviación.....	16
2.2.5. Vías de oxidación de sulfuros metálicos.....	18
2.2.5.1. Vía Tiosulfato.....	18

2.2.5.2.	Vía Polisulfuro	19
2.3.	Parámetros en el proceso de biolixiviación	20
2.3.1.	Temperatura	20
2.3.2.	pH	21
2.3.3.	Nutrientes	21
2.3.4.	Tamaño de partícula y densidad de la pulpa de mineral	22
2.3.5.	Potencial óxido- reducción (Eh).....	23
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	. Proceso de enriquecimiento, aislamiento y obtención de consorcio	24
3.1.1.	Toma y transporte de muestras	24
3.1.2.	Enriquecimiento de cultivos en medio líquido	26
3.1.3.	Aislamiento de colonias oxidantes de hierro en medio sólido	26
3.1.4.	Obtención de consorcio aislado de DAM	27
3.2.	Caracterización microbiológica del consorcio aislado de DAM	28
3.2.1.	Tinción con azul de metileno	28
3.2.2.	Tinción Gram	28
3.2.3.	Recuento y determinación de biomasa del Consorcio Bacteriano ...	29
3.3.	Adaptación del consorcio aislado de DAM a diferentes pH.....	30
3.4.	Caracterización molecular del consorcio DAM a diferentes pH	31
3.4.1.	Proceso de aislamiento de ADN genómico	31
3.4.2.	Amplificación por la PCR.....	34
3.4.3.	Evaluación mediante DGGE	36
3.5.	Proceso de Biolixiviación del consorcio a diferentes pH.....	40
3.5.1	Caracterización del mineral.....	40
3.5.1.1.	Tamizado de mineral	40
3.5.1.2.	Análisis de mineral	40
3.5.2	Adaptación de cultivos al mineral y biolixiviación de cobre	41
3.5.3	Concentración Cu y Fe total en los cultivos	42
3.5.4	Biooxidación de Fe ⁺² durante la biolixiviación	43
3.5.5	Determinación de Cu recuperado.....	44
3.6.	Análisis estadístico.....	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
4.1	Proceso de enriquecimiento, aislamiento y obtención del consorcio	45
4.1.1	Enriquecimiento de cultivos en medio líquido	45
4.1.2	Aislamiento de colonias oxidantes de hierro en medio sólido	47
4.1.3	Obtención del consorcio microbiano aislado de DAM.....	48

4.2	Caracterización microbiológica del consorcio	49
4.2.1	Tinción con azul de metileno	49
4.2.2	Tinción Gram	50
4.2.3	Recuento y determinación de biomasa del Consorcio Bacteriano ...	51
4.3	Adaptación del consorcio aislado de DAM a diferentes valores de pH ...	53
4.4	Caracterización molecular del consorcio a diferentes pH	54
4.4.1	Proceso de aislamiento de ADN genómico	54
4.4.2	Amplificación por la PCR.....	55
4.4.3	Evaluación mediante DGGE	57
4.5	Proceso de Biolixiviación del consorcio a diferentes pH	58
4.5.1	Caracterización del mineral	58
4.5.1.1	Tamizado de mineral	58
4.5.1.2	Análisis de mineral	59
4.5.2	Adaptación del consorcio al mineral y proceso de biolixiviación	60
4.5.3	Proceso de Biolixiviación	61
4.5.4	Biooxidación de Fe⁺² durante la biolixiviación	66
4.5.5	Determinación de Cobre durante el proceso de biolixiviación	69
4.6	Análisis estadístico	73
5.	CONCLUSIONES	77
6.	RECOMENDACIONES	78
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
8.	ANEXOS	89

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables: dimensiones e indicadores.....	5
Tabla 2. Reservas mundiales de metal de cobre en toneladas métricas. Fuente: USGS, 2017.....	8
Tabla 3. Bacterias usadas en Biolixiviación.	16
Tabla 4. Lista de componentes de Master mix.....	35
Tabla 5. Solución 40% desnaturalizante (6% PAG)	37
Tabla 6. Solución 60% desnaturalizante (6% PAG)	37
Tabla 7. Concentración de hierro y mineral empleados en la adaptación de los cultivos en el proceso de biolixiviación.	41
Tabla 8. Composición química del mineral en estudio.	59
Tabla 9. Promedio de las concentraciones (mg/L) de Fe total, Fe ⁺² y Fe ⁺³ en función del pH en los ensayos al final de la biolixiviación de Cu usando un consorcio microbiano aislado de DAM.	66
Tabla 10. Concentración de Cu (mg/L) durante el proceso de biolixiviación. ..	69
Tabla 11. Recuperación de Cu durante el proceso de biolixiviación en función del pH.	69
Tabla 12. Pruebas de Normalidad	73
Tabla 13. Análisis de varianza de los datos obtenidos (recuperación de Cu) en los ensayos de biolixiviación.	75
Tabla 14. Análisis de la variación en las medias de los tratamientos de biolixiviación.....	75

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso pirometalúrgico para recuperar cátodos de cobre.....	10
Figura 2. Proceso hidrometalúrgico para recuperar cátodos de cobre.....	12
Figura 3. Mecanismo directo e indirecto para la solubilización del metal.	17
Figura 4. Infraestructura de empresa minera Huinac S. A. C. ubicada en el distrito de la Merced, provincia Aija, departamento de Ancash. PM4 y PM5: punto de muestreo 4 y 5 respectivamente.	24
Figura 5. Diagrama de flujo de métodos empleados.....	25
Figura 6. Recuento de 5 cuadrados en cámara de Neubauer. Área Total = 1mm x 1mm=1mm ² . Volumen = 1 mm ² x 0,1 mm = 0,1 mm ³ = 1 x 10 ⁻⁴ mL.	30
Figura 7. Medición y acidificación de agua destilada utilizada para preparar medio 9K- Fe.	31
Figura 8. Esquema del proceso de preparación de muestras.....	32
Figura 9. Esquema general de amplificación de ADN por PCR.	34
Figura 10. Termociclador MJ Mini™ - Bio-Rad utilizado en el laboratorio de biominería de la universidad de Antofagasta.....	36
Figura 11. Evaluación cualitativa de los cultivos microbianos en medio 9K- Fe (Enriquecimiento): PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5 (matraces de izquierda a derecha). A: Primer día de cultivo B: Quinto día de cultivo C: Décimo día de cultivo D: Décimo quinto día de cultivo.....	45
Figura 12. Subcultivos en medio líquido 9K-Fe (Mantenimiento): Control negativo, PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5 (de izquierda a derecha en ambas imágenes) A: primer día de subcultivo, con coloración amarillenta debido al inóculo. B: décimo día de subcultivo, donde se aprecia que el color inicial se torna rojizo propio del crecimiento y oxidación microbiana.....	46
Figura 13. Crecimiento de colonias circulares con centro marrón y periferias amarillas-anaranjadas, en medio sólido 9K-Fe tras 2 semanas de siembra. ...	47
Figura 14. A) Consorcio microbiano con coloración típica de acidófilos oxidantes de hierro. B) Primer día de cultivo como consorcio (matraz derecho) y control negativo (matraz izquierdo). C) Quinto día de cultivo, presenta una coloración inicial amarilla debido a la oxidación microbiana del hierro presente en el medio a diferencia del control negativo.....	48

Figura 15. Tinción en fresco con azul de metileno en una muestra del consorcio aislado de DAM en medio líquido 9K-Fe, donde se observa a 100X bacilos, diplobacilos y algunos espirilos.	50
Figura 16. Tinción Gram en una muestra del consorcio aislado de DAM en medio líquido 9K-Fe, donde se distingue microorganismo con morfología de bacilos de diferentes tamaños y ciertos espirilos de tipo Gramnegativos.	51
Figura 17. Observación microscópica a 100 X del recuento de bacterias mediante una cámara Neubauer.	51
Figura 18. Crecimiento microbiano estimada a partir de conteo en cámara de Neubauer a las dos semanas de cultivo.	52
Figura 19. Crecimiento microbiano medido mediante turbidez celular a las dos semanas de cultivo.	53
Figura 20. A: Adaptación del consorcio a diferentes valores de pH (1.5, 2.0 y 2.5) con sus respectivos controles (de izquierda a derecha respectivamente). B: Desarrollo y crecimiento del consorcio oxidante de hierro, adaptado a los diferentes valores de pH a los 15 días.	53
Figura 21. Reactivación en medio 9K- Fe del consorcio adaptado a diferentes pH: 1.8, 1.5, 2.0 y 2.5 (de izquierda a derecha) en el laboratorio de biominería de la Universidad de Antofagasta.	54
Figura 22. Aislamiento de ADN genómico en gel de agarosa (1 %) bajo un transiluminador de luz UV utilizando un Marcador de peso molecular (MPM) 1 kb DNA Ladder. A: consorcio a pH 1.8 (C: control positivo). B: control negativo (CN), consorcio a pH 1.5 (C1), a pH 2.0 (C2), a pH 2.5 (C3).	55
Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) de los fragmentos obtenidos por PCR visualizado bajo un transiluminador de luz UV utilizando un Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb DNA Ladder (100- 3000pb). Control negativo (CN). Consorcio a pH 1.5 (C1), a pH 2.0 (C2), a pH 2.5 (C3), control positivo (CP).	56
Figura 24. Gel de poliacrilamida (6%) en gradiente desnaturante de urea-formamida (40%- 60%). DGGE para las regiones V3, V4 y V5 del gen ARNr 16S del dominio bacteria. Carril 1, 2, 3: consorcio a pH 1.5, 2.0 y 2.5 respectivamente.	57
Figura 25. Mineral polimetálico utilizado en el estudio, conteniendo Cu, Zn, Fe, Ag, entre otros.	59

Figura 26. Proceso de adaptación del consorcio (a pH 1.5, 2.0 y 2.5) al 1 % de mineral en estudio. A) Inicio de adaptación del consorcio en medio 9K donde el hierro fue sustituido gradualmente por el mineral. B) Cultivos del consorcio a pH 1.5, 2.0 y 2.5 (respectivamente) adaptados al mineral (dos meses después).	60
Figura 27. Crecimiento microbiano del consorcio a pH 1.5 durante el proceso de biolixiviación.....	62
Figura 28. Crecimiento microbiano del consorcio a pH 2.0 durante el proceso de biolixiviación.....	63
Figura 29. Crecimiento microbiano del consorcio a pH 2.5 durante el proceso de biolixiviación.....	64
Figura 30. Comparación del crecimiento microbiano del consorcio nativo aislado de DAM a diferentes valores de pH (1.5, 2.0, 2.5) durante el proceso de biolixiviación en 49 días de evaluación.	65
Figura 31. Curva de potencial Redox, medidos desde el inicio hasta el término de la biolixiviación.	67
Figura 32. Repeticiones de los tratamientos del proceso de biolixiviación a pH 2.5, presentando jarosita formada por la continua biooxidación.	68
Figura 33. Curva de % de recuperación de Cobre durante el proceso de biolixiviación en función del pH (1.5, 2.0, 2.5).	70
Figura 34. Comparación en la recuperación de cobre total (%Cu) entre los cultivos del consorcio nativo aislado de DAM a diferentes valores de pH (1.5, 2.0 y 2.5) durante 49 días de evaluación en el proceso de biolixiviación.....	71
Figura 35. Ensayos de biolixiviación de cobre a pH 1.5, 2.0 y 2.5 (A) y sus respectivos controles negativos (B).....	72

ABREVIATURAS

pH: Potencial de hidrogeniones
ATCC: American Type Culture Collection
DAM: Drenajes ácidos de mina
MM: Mil millones
TMF: Tonelada métrica de contenido fino
TM: Tonelada métrica
°C: Grados Celsius
OD: Densidad óptica
µm: Micrómetros
nm: Nanómetros
µL: Microlitros
mL: Mililitros
L: Litros
µg: Microgramos
g: Gramos
mg/L: Miligramos por litro
g/L: Gramos por litro
9K-Fe: medio 9K suplementado con Fe
S₀: Azufre elemental
Fe: Hierro
Fe⁺²: Ión ferroso
Fe⁺³: Ión férrico
Cu: Cobre
CO₂: Dióxido de carbono
UV: Ultravioleta
pb: Pares de bases
DNA: Ácido desoxirribonucleico
rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato
SPE: Sustancias poliméricas extracelulares

RESUMEN

La Cordillera de los Andes es la principal fuente de depósitos minerales del mundo. El Perú tiene un importante potencial geológico, convirtiendo a la minería en una de las principales actividades económicas, posicionado al Perú en el tercer lugar como productor de cobre a nivel mundial incrementando anualmente su producción de toneladas métricas de contenido fino. Sin embargo, los procesos de extracción de metales siguen siendo convencionales, en su mayoría lixiviación química para la mayor parte de recuperación de metales, siendo en menor proporción y en algunos casos nula la Biolixiviación.

Los drenajes ácidos de minas (DAM) son una de las formas más peligrosas de contaminación en el mundo, donde el componente biótico es predominantemente microbiológico. El presente trabajo se basó en el estudio de microorganismos nativos oxidantes de hierro presentes en DAM, provenientes de la compañía minera Huinac en el departamento de Ancash, para su posterior aplicación en ensayos de biolixiviación.

Se aislaron los microorganismos presentes en DAM, en condiciones mesófilas y con metabolismo quimiolitótrofo en medio de enriquecimiento líquido 9K-Fe a pH 1.8. Luego se caracterizaron microbiológicamente mediante tinción Gram y crecimiento en 9K-Fe. Posteriormente se caracterizó molecularmente mediante extracción de ADN, amplificación del gen ARNr 16S, PCR con primers universales de bacteria y DGGE donde se aprecia tres diferentes especies de bacterias presentes en el consorcio. Finalmente, se realizaron los ensayos de biolixiviación, donde se trabajó con el consorcio a pH 1.5, 2.0, 2.5, en condiciones mesófilas (21°C), agitación a 120 rpm y 5% de mineral polimetálico a un tamaño de partícula de ~75 µm, para la obtención de cobre total soluble en el medio. Los resultados mostraron que el consorcio a pH 2.0 fue el que recuperó un mayor porcentaje de Cobre total siendo un 28.42 %, en comparación con el pH 1.5 y 2.5 que recuperaron 24.94 % y 14.39 % de Cobre total respectivamente en 49 días de evaluación.

PALABRAS CLAVE: Biolixiviación, minerales polimetálicos, cobre, pH, microbiología.

ABSTRACT

The Andes Mountain Range is the main source of mineral deposits in the world. Peru has an important geological potential, becoming in the mining in the main economic activities positioned in Peru in the third place as copper producer and in the world level increasing its production of metric tons of fine content. However, the processes of metal extraction are still conventional, mostly chemical leaching for most of metal recovery, being in a smaller proportion and in some cases null the Bioleaching.

Acid mine drains (AMD) are one of the most dangerous forms of pollution in the world, where the biotic component is predominantly microbiologically. The present work was based on the study of native oxidizing iron microorganisms present in acid mine drainages, from the Huinac mining company in the district of La Merced, province of Aija in the department of Ancash, for its subsequent application in bioleaching tests.

Microorganisms present in AMD were isolated under mesophilic conditions and with chemolithotrophic metabolism in liquid enrichment medium 9K-Fe at pH 1.8. Then they were characterized microbiologically by Gram stain and 9K-Fe growth. Subsequently, it was molecularly characterized by DNA extraction, amplification of the 16S rRNA gene, PCR with universal bacteria primers and DGGE, where three different species of bacteria can be seen in the consortium. Finally, the bioleaching tests are shown, where the consortium works at pH 1.5, 2.0, 2.5, in mesophilic conditions (21 ° C), agitation at 120 rpm and 5% polymetallic mineral at a particle size of ~ 75 µm, to obtain total soluble copper in the medium. The result was a pH 2.0 and a higher percentage of Total Copper by 28.42%, compared to a pH of 1.5 and 2.5 that was recovered by 24.94% and 14.39% of Copper in total in 49 days of evaluation.

KEY WORDS: Bioleaching, polymetallic minerals, copper, pH, microbiology.

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación resultante de la producción de ácido en efluentes ricos en metales de minas activas y abandonadas es una de las más perjudiciales en el mundo (Johnson *et al.*, 2001). Los drenajes ácidos de minas (DAM) son tóxicos para los cursos de agua; el mayor impacto es debido a la actividad de los protones, el cual conduce a la disminución del pH de los receptores de agua que tienen insuficiente capacidad de neutralización, debido al pH bajo, la solubilidad de los metales de transición es mayor y por lo tanto contienen concentraciones elevadas de metales. De los cuales mayormente incluyen hierro, aluminio, manganeso, y otros metales de transición tóxicos como el cobre y el cadmio y metaloides (por ejemplo, arsénico) también están presentes dependiendo de la mineralogía de la roca huésped (Hallberg, 2010).

La recuperación de metales tales como el cobre, oro, plata, etc. a través del uso de microorganismos es referida generalmente a la biominería (Navarro *et al.*, 2013), la cual se ha desarrollado rápidamente en la última década, convirtiéndose en un área de éxito y expansión de la biotecnología (Rawlings y Johnson; 2007). La biolixiviación conocida también como lixiviación bacteriana, es la conversión biológica de un compuesto metálico insoluble a su forma soluble logrando ser extraído en agua (Rawlings, 2002). De esta manera los microorganismos usan el mineral como combustible, a través de la transferencia de electrones para sus propios propósitos de supervivencia, y liberando metales, sin requerir una aplicación externa de energía (Rodríguez *et al.*, 2001). La utilización de estos microorganismos se justifica cuando el mineral sulfurado de un yacimiento cuprífero es de baja ley, situación en la que el proceso productivo tradicional de pirometalurgia deja de ser rentable, y se buscan nuevos procesos, más baratos y eficientes (Delgado y Castillo, 2015).

Los microorganismos utilizados para la extracción de metales a partir de minerales sulfuro (como calcopirita) son bacterias quimiolitioautotróficas y, por lo tanto, solo requieren compuestos inorgánicos para el crecimiento (Bosecker, 1997). En general, los nutrientes minerales se obtienen del medio ambiente o del mineral a lixiviar. Silver y Lundren (1980) afirman que la fuente de energía,

el sulfato ferroso, es reemplazada por minerales que contienen hierro y/o azufre, y la fuente de carbono se suministra en el aire como dióxido de carbono en los procesos de biolixiviación.

Actualmente, el Perú se encuentra en el tercer lugar como productor de cobre a nivel mundial. En 2017 obtuvo una producción de 196,317 TMF (tonelada métrica de contenido fino), registrando un crecimiento de 24,79% en comparación al año anterior. Convirtiendo a la minería en una de las principales actividades económicas del mismo (MINEM, 2017). Debido a ello nuestro país ha registrado 8626 pasivos ambientales mineros a lo largo de estos años, de los cuales el departamento de Ancash ha sido considerado como uno de los departamentos con mayor índice, registrando 1251 pasivos ambientales mineros (Defensoría del pueblo, 2015).

La biolixiviación es una alternativa ventajosa a las tecnologías pirometalúrgicas por demandar menor inversión de capital y tener menores costos de operación. Por otro lado, es un proceso que no afecta considerablemente el medio ambiente, ya que es una tecnología más limpia en la que no hay emisión de SO₂, además permite utilizar desechos minerales, los cuales son considerados pasivos ambientales, y al ser de fácil aplicación puede ser empleada en países en vías de desarrollo. La lixiviación bacteriana es un excelente ejemplo de como la actividad biológica puede ser controlada y ser útil en la explotación de recursos naturales sin el uso intensivo de energía.

La detección de microorganismos lixiviantes se realiza mediante el uso de diferentes métodos clásicos, tales como recuentos microscópicos de microorganismos, cultivos dependientes de recuento viable de microorganismos y métodos indirectos. El conteo de bacterias se puede llevar a cabo usando directamente un microscopio de contraste de fase y una cámara de Neubauer o Petroff- Hausser (Cotoras y Viedma, 2011). Los cultivos dependientes pueden ser medios líquidos los cuales son enriquecidos con hierro ferroso (Fe²⁺), azufre (S) o mineral como sustrato (Pradhan *et al.*, 2008); o medios sólidos, cuyas desventajas de estos medios pueden ser: el tiempo de crecimiento ya que el proceso es lento, ser selectivo para un grupo determinado de microorganismos acidófilos y/o la incapacidad de algunas bacterias para

crecer en medio sólido (Escobar *et al.*, 2008). Los métodos independientes de cultivo han proporcionado un conocimiento detallado de toda la diversidad y filogenia de los organismos que pueblan los sistemas de DAM. Donde el método más estudiado para la determinación de qué organismos comprenden una comunidad microbiana implica determinar la secuencia de genes ARN ribosómico 16S (16S ARNr) a partir de muestras ambientales. Este enfoque proporciona información acerca de la riqueza de especies, así como las relaciones evolutivas entre linajes (Baker y Banfield, 2003).

Diversas investigaciones en biolixiviación de cobre se han realizado en otros lugares, pero no en el departamento de Ancash, debido a que cada trabajo realizado en el área de la biominería es específico para la zona y mineral estudiado. A nivel internacional han sido desarrolladas ampliamente utilizando bacterias mesófilas, termófilas moderadas (Marhual *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013), termófilas estrictas (Gericke y Pinches, 1999), hongos (Mulligan y Kamali, 2003) y consorcios bacterianos aislados de DAM (Xiang *et al.*, 2010; Romo *et al.*, 2013). Así mismo, a nivel nacional se han realizado investigaciones en biolixiviación de cobre a partir de calcopirita utilizando un consorcio nativo aislado y una cepa comercial (Tapia, 2016), efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante (Delgado y Castillo, 2015) y también se ha evaluado la solubilización de zinc a partir de esfalerita por lixiviación microbiana con cepas nativas (Saavedra, 2009).

Los DAM varían significativamente de un sitio a otro, y se extienden por una amplia gama de pH, temperatura y contenido de oxígeno; tales variaciones significan inevitablemente que una variedad de microorganismos acidófilos con diferentes propiedades fisiológicas se pueden encontrar (Hallberg, 2010). El pH es un parámetro crucial en el proceso de biolixiviación, el cual generalmente es controlado por el crecimiento bacteriano (Chen y Lin 2001).

Por todo lo expuesto, se formula evaluar ¿Cuál es el efecto del pH en proceso de biolixiviación de cobre por un consorcio microbiano aislado a partir de drenajes ácidos de la empresa minera Huinac S.A.C. del departamento de Ancash-Perú en condiciones de laboratorio?

1.1. HIPÓTESIS

El consorcio microbiano aislado de drenajes ácidos de la empresa minera Huinac S. A. C. del departamento de Ancash, incubada a temperatura ambiente y a diferentes valores de pH (1.5, 2.0 y 2.5) en el proceso de biolixiviación a pH 2.0 producirá mayor solubilización de cobre en mineral polimetálico.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes valores de pH en el proceso de biolixiviación de cobre por un consorcio microbiano aislado a partir de drenajes ácidos de mina en el departamento de Ancash en condiciones de laboratorio.

1.2.2. Objetivos específicos

- Determinar la cinética de crecimiento del consorcio microbiano aislado a partir de drenajes ácidos (DAM).
- Caracterizar microbiológicamente el consorcio microbiano aislado de DAM.
- Caracterizar molecularmente el consorcio aislado de DAM por la amplificación del gen ARNr 16S.
- Determinar la cantidad de Cu y Fe^{+2} total de los medios biolixivantes del consorcio a diferentes pH.
- Evaluar la biooxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} durante la biolixiviación del consorcio a diferentes pH.
- Determinar el efecto del pH en el % de recuperación de cobre en cultivos (consorcio a diferentes pH) durante el proceso de biolixiviación.

1.3. VARIABLES

Se definen las siguientes variables:

A) Variable Independiente:

- pH del medio biolixivante

B) Variables dependientes:

- Crecimiento consorcio bacteriano
- Biooxidación de Fe⁺²
- Concentración de Fe total
- Recuperación de Cu

Tabla 1. Operacionalización de variables: dimensiones e indicadores.

VARIABLES Y DIMENSIONES		INDICADORES
Independiente	pH del medio biolixivante.	Potencial hidrógeno del medio (pH).
Dependientes	Crecimiento del consorcio microbiano.	Número de células por unidad de tiempo (Cél/mL).
	Biooxidación de Fe ⁺² .	Cantidad de Fe oxidado (Fe ⁺² a Fe ⁺³) (mg/ L).
	Concentración de Fe total.	Cantidad de Fe en medio biolixivante (mg/ L).
	Recuperación de Cu.	Cantidad de Cu en medio biolixivante (mg/ L).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. PROPIEDADES, RESERVAS, PRODUCCIÓN, PROCESOS TECNOLÓGICOS Y USOS DEL COBRE

2.1.1. Propiedades del cobre

El cobre es un elemento con número atómico 29 y peso atómico 63.54, ocupa la primera posición del subgrupo IB en la tabla periódica de los elementos. El subgrupo IB también incluye los elementos plata y oro, y de hecho, el cobre comparte muchas características con estos metales nobles como resultado de su estructura atómica y electrónica (Ortiz, 2012).

El cobre es un metal noble, no se oxida, no se degrada, no contamina y es reciclable indefinidamente. Entre las principales propiedades del cobre se pueden destacar las siguientes: alta conductividad eléctrica, alto grado de conductividad térmica, excelente metal para procesos de maquinado (fácil de moldear y cortar), gran resistencia a la corrosión, alta capacidad de aleación metálica, muy buena capacidad de deformación en caliente y en frío, mantiene sus propiedades indefinidamente en el reciclaje y tiene propiedades bactericidas (Donoso, 2013).

El cobre se encuentra de manera dispersa en grandes áreas, mezclado con una gran cantidad de sales y otros elementos mineralógicos además de roca estéril. Estos compuestos que contienen cobre deben ser tratados debidamente para separar el metal del resto de los minerales y se presenta en la naturaleza bajo las formas:

2.1.1.1. Mineral oxidado

Los minerales oxidados de cobre siempre se encuentran en depósitos superficiales, producto de la oxidación natural en el tiempo de minerales sulfurados situados debajo de la superficie (Surco, 2012). Los principales minerales que se presentan en los yacimientos de minerales oxidados de cobre son: malaquita, azurita, brocantita, crisocola, tenorita, cuprita y cobre nativo (Cortez, 2012).

2.1.1.2. Mineral sulfurado

La calcopirita (CuFeS_2), es la principal especie mineralógica de cobre y se encuentra muchas veces asociada a la pirita (FeS_2), metales preciosos como oro y plata principalmente (Surco, 2012). Los minerales sulfurados son ocurrencias primarias de cobre obtenido por minado subterráneo y está definida por sus componentes naturales, entre las que tenemos: covelita, bornita, calcosina, entre otras (Cortez, 2012).

2.1.2. Reservas de cobre

2.1.2.1. Reservas mundiales de Cobre

El cobre es abundante en la corteza terrestre en un promedio de 50 g/t, aunque en algunos lugares el cobre alcanzó mayores concentraciones que ya se han minado en su mayor parte a lo largo de la historia (Ortiz, 2012). De acuerdo al Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS), los recursos identificados mundiales del metal de cobre se estimaron a cerca de 1.6 mil millones de toneladas, sin incluir los 700 números adicionales de aguas profundas de 700 millones de toneladas (British Geological Survey, 2007). Respecto a las reservas mundiales de cobre al 2016, éstas sumaron 720 millones de TM, similar a las reservas de 2015. El incremento en las reservas de Estados Unidos contrasta con la disminución en las reservas de China, ambas en 2 millones de TM. Los países con mayor participación fueron Chile (29.2%), Australia (12.4%) y Perú (11.3%) (U.S. Geological Survey, 2017).

Tabla 2. Reservas mundiales de metal de cobre en toneladas métricas.
Fuente: USGS, 2017.

País	Producción minera (TM)		Reservas TM
	2015	2016	
Chile	5,760	5,500	210,000
Australia	971	970	89,000
Perú	1,700	2,300	81,000
México	594	620	46,000
Estados Unidos	1,380	1,410	35,000
Rusia	732	710	30,000
China	1,710	1,740	28,000
Congo (Kinshasa)	1,020	910	20,000
Zambia	712	740	20,000
Canadá	697	720	11,000
Otros países	3,800	3,800	150,000
Total	19,100	19,400	720,000

2.1.2.2. Reservas nacionales de Cobre

El Perú concentra una gran reserva de cobre del mundo después de Chile y Australia. La USGS estima que dicha reserva alcanzó 81,000 MM de TM en 2016.

El territorio peruano contiene diversas regiones con reservas de cobre. La mayor concentración de este metal se encuentra en la zona sur en las regiones de Tacna (frontera con Chile), Moquegua, Arequipa y Cusco. En las zonas centro y norte, destacan Áncash y Cajamarca, respectivamente (LarrainVial, 2012).

2.1.3. Producción del cobre

2.1.3.1. Producción mundial de Cobre

La producción del metal sumó 19.4 millones de TM en 2016, 3.7% superior al año anterior, aumento explicado por la mayor producción de Perú y EE.UU. en 700 y 160 miles de TM, respectivamente. Chile con 5.5 millones TM (28.4% del total de la producción), Perú con 2.3 millones TM (11.9%) y

China con 1.7 millones TM (9.0%) fueron los principales productores (U.S. Geological Survey, 2017).

2.1.3.2. Producción nacional de Cobre

En lo referido a la producción nacional de los principales productos mineros durante el 2016, la producción de cobre creció en 38.4% al pasar de 1701 miles TMF a 2354 miles de TMF entre el 2015 y el 2016, debido al incremento de la producción de Cerro Verde (+104.0), Antamina (+7.7%) y Hubday Perú (+25.8%); además, por la producción de Minera Las Bambas (329.4 miles de TM). A nivel regional, la producción de cobre se concentró en Arequipa (22.3%), Ancash (19.3%), Cusco (15.1%), Apurímac (14.0%) y Junín (8.1%), que en conjunto representaron el 78.7% de la producción nacional (Osinergmin, 2017).

2.1.4. Procesos tecnológicos

Después de la extracción del mineral de cobre de la mina, el mineral es llevado a la planta donde es chancado, clasificado y molido. Dependiendo de las características mineralógicas y el contenido de cobre, se determina qué tipo de proceso se debe aplicar.

El porcentaje de cobre presente en estos minerales es conocido por los especialistas como “Ley del cobre” y su valor es variable (por ejemplo, si la ley fuese 1.2 % significa que por cada mil kilos o tonelada métrica de mineral hay 12 kilos de cobre fino), cuanto menor es la ley, menor es la cantidad de cobre contenido en el material mineralógico explotado en las minas, por esta razón gran parte de este material constituye desecho y se acumula en lugares especiales denominados botaderos una vez que el cobre ha sido debidamente separado (Donoso, 2013).

2.1.4.1. Proceso pirometalúrgico

Si se trata de un mineral sulfurado de alto contenido de cobre, sigue el proceso de flotación donde se logra concentrar principalmente la calcopirita y otros metales de valor económico considerable, tales como el oro (Au) y plata (Ag) (Surco, 2012).

La mena de cobre previamente triturada y molida es introducida en una cámara de flotación, en la que el cobre se concentra en la superficie, mientras que los fragmentos sobrantes se hunden. El concentrado (denominado carga), se introduce en un horno de reverbero que separa más impurezas, durante el proceso de fundición, se extraen los gases de desecho y el material forma en el fondo del horno un charco de hierro y cobre fundidos, llamado mata. La capa anaranjada de metal impuro en la superficie de la mata es escoria, que se drena y extrae mientras la mata de cobre sigue su proceso en un convertidor. El producto de su vaciado es conocido como “cobre blíster” el que tiene 98 % de pureza y que se debe ser refinado por métodos electrolíticos. De ese proceso se obtienen planchas “cátodos” con un contenido del 99.9 % de cobre (Rougier, 2013). Los procesos pirometalúrgicos consumen grandes cantidades de energía y suelen ser fuentes de contaminación atmosférica, en especial por dióxido de azufre, en el caso de ciertos metales se han ideado otras técnicas en las que el metal se extrae de su mena por medio de reacciones acuosas, estos procesos se conocen como hidrometalurgia (Román, 1992).

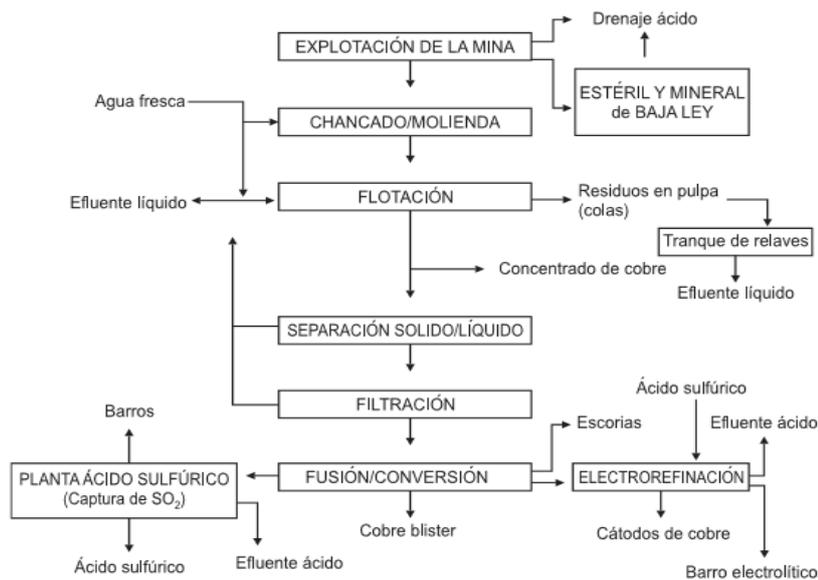


Figura 1. Proceso pirometalúrgico para recuperar cátodos de cobre.

2.1.4.2. Proceso hidrometalúrgico

Se entiende por hidrometalurgia toda una serie de procesos, cuya característica común es la utilización de agua o de disoluciones acuosas

para la preconcentración y extracción de los metales contenidos en minerales o materias metalíferas (Román, 1992). El proceso hidrometalúrgico más importante es la lixiviación, en la cual el compuesto que contiene el metal deseado se disuelve de modo selectivo. Si el compuesto es soluble en agua, el agua misma es un agente de lixiviación idóneo. Es más común que el agente sea una disolución acuosa, de un ácido, base o sal (Brown et al., 2004). La planta hidrometalúrgica integrada a la mina comprende las instalaciones necesarias para las etapas básicas del tratamiento del mineral de cobre (Surco, 2012).

a) Trituración y molienda

El mineral procedente de la mina se tritura en seco y, posteriormente pasa a un circuito de molienda húmeda, con molino de bolas, para producir una pulpa de mineral fino, con un tamaño de partícula menor a 105 micrómetros.

b) Lixiviación química

La pulpa pasa al circuito de lixiviación produciéndose la disolución del cobre contenido en el mineral, pasando el cobre a la solución acuosa. El residuo de lixiviación, que contiene los componentes no lixiviados, es filtrado obteniéndose un residuo sólido seco (estériles de tratamiento).

c) Extracción por solventes

La solución acuosa con cobre disuelto pasa al circuito de extracción con solventes, y por medio de un agente de extracción selectivo para el cobre se logra su purificación y concentración.

d) Electrodeposición

La solución acuosa con cobre, concentrada y purificada, pasa a las celdas de electrodeposición en donde el cobre se deposita sobre los cátodos de acero inoxidable. Los cátodos de cobre de alta pureza (LME Grado "A": 99,9935% Cu) resultantes son desplazados y enviados directamente a la industria de transformación.

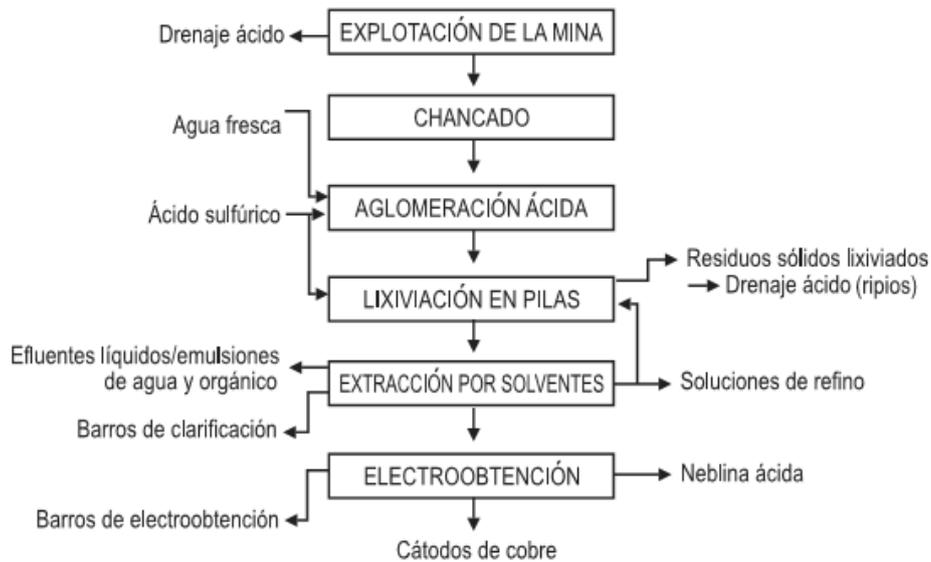


Figura 2. Proceso hidrometalúrgico para recuperar cátodos de cobre.

Los procesos metalúrgicos provocan graves alteraciones ambientales si no se toman las medidas preventivas adecuadas. La pirometalurgia, y la hidrometalurgia contaminan el aire a través de la emisión de polvos y gases tóxicos, en particular dióxido de azufre, además de la contaminación del agua y el suelo generada por residuos líquidos y sólidos con contenidos de solventes y metales pesados (como As, Cd, Co, Cr, Cu, Pb) en diversas proporciones (Coll-Hurtado *et al.*, 2002).

Por otra parte, en la recuperación de valores metálicos, un nuevo campo de la Metalurgia Extractiva llamado Biolixiviación está siendo desarrollado. Esta tecnología se refiere a la extracción acuosa de metales a partir de minerales de desecho. Para ello, se emplean microorganismos que actúan como catalizadores en las reacciones de disolución (Osinermin, 2017). Presentándose, así como una alternativa interesante al ser una tecnología relativamente simple, económica y que permite un control más estricto de la contaminación ambiental.

2.1.5. Usos del cobre

Los usos del cobre tanto industriales como domésticos están condicionados por algunas de sus propiedades:

- a) Por ser resistente a la corrosión, el cobre se usa en: Cascos de embarcaciones y plataformas marinas. Cubiertas, techumbres y desagües. Pernos, clavos. Usos decorativos interiores.
- b) Por ser conductor de electricidad, el cobre se usa en: Cables eléctricos, telefonía, electrónica, computadores, transporte, electrodomésticos.
- c) Por ser conductor térmico, el cobre se usa en: Utensilios de cocina, radiadores, paneles solares.
- d) Por ser maleable y dúctil, el cobre se usa en: Cañerías, tuberías, alambres, artesanías alfileres, botones.
- e) Por ser maleable con metales, el cobre se usa en: Monedas, quincallería, armas, instrumentos musicales.
- f) Por ser reciclable, el cobre se usa en: Industria, tuberías y techos.
- g) Por sus propiedades bactericidas, el cobre se usa en: Aire acondicionado, agricultura, herraduras de los caballos, superficies y pinturas, productos de consumo, cañerías y griferías, salmonicultura.

2.2. LIXIVIACIÓN BACTERIANA

2.2.1. Generalidades

El uso de microorganismos para facilitar la extracción y recuperación de metales preciosos y básicos de minerales primarios y concentrados, denominados genéricamente "biominería", se ha convertido en un área de la biotecnología exitosa y en expansión (Rawlings y Johnson, 2007). A diferencia de la mayoría de industrias que utilizan procesos microbianos (como las tecnologías de fermentación y la producción de fármacos), la selección y el control de los cultivos microbianos en la biominería a menudo han sido mínimos o inexistentes.

La Biominería tiene ventajas claras sobre la minería tradicional. Casi sin excepción, los procedimientos de extracción microbiana son más respetuosos

con el medio ambiente. No requieren gran cantidad de energía utilizada durante el tostado o fundición y no producen dióxido de azufre u otras emisiones gaseosas dañinas para el medio ambiente. Además, los residuos de minería y los desechos producidos a partir de procesos fisicoquímicos cuando se exponen a la lluvia y al aire pueden lixiviarse biológicamente, produciendo contaminación no deseada de ácidos y metales. Los relaves de las operaciones de biominería son menos activos químicamente, y la actividad biológica que pueden soportar se reduce al menos en la medida en que ya han sido biopolimerizados. La biominería también tiene una clara ventaja en la extracción de metales de ciertos minerales de baja ley. Por ejemplo, el cobre puede recuperarse de los minerales de baja ley y los vertederos que quedan de las operaciones mineras anteriores mediante el uso de la actividad biológica que tiene lugar durante el riego controlado del vertedero. Muchos de estos metales no son económicamente recuperables por métodos no biológicos. Donde el tipo de mineral y las características geológicas lo permitan, la recuperación de metales usando soluciones de lixiviación producidas y regeneradas por microbios se puede llevar a cabo *in situ* con obvias ventajas de costo y una mínima perturbación del entorno.

De vez en cuando el término se usa como sinónimo de biolixiviación, aunque estrictamente el último se refiere a situaciones en las que se solubiliza el metal(es) de destino durante el bioprocesamiento. La capacidad de las bacterias y arqueas acidófilas quimiolitótrofas para acelerar la disolución oxidativa de minerales sulfurados ha sido aprovechada en el desarrollo y aplicación de una biotecnología para la extracción de metales a partir de minerales sulfurados y concentrados. La Biominería se utiliza actualmente para lixiviar sulfuros de cobre y como un pretratamiento oxidativo para minerales de oro refractarios (Saavedra, 2009).

La demanda mundial de cobre está creciendo, la industria de los minerales se enfrenta cada vez más a la necesidad de procesar minerales de baja ley, sobrecargar y desvalorizar las operaciones mineras actuales (Watling, 2006). La biotecnología es un área que ha producido un aumento considerable en los últimos años, principalmente por la presencia de técnicas microbiológicas y de

biología molecular, que ayudan a aislar e identificar las especies relacionadas con la disolución de los minerales (Rawlings y Johnson, 2007).

2.2.2. Biolixiviación

La lixiviación bacteriana natural ha sido admitida durante muchos años en diversos lugares del mundo: Alemania (Siglo XVI), Río Tinto, España (Siglo XVII), etc. Sin embargo, el papel de las bacterias en los procesos de lixiviación no se conoció hasta después de 1940, desde que, en 1947, Colmer y Hinckler demostraron que un organismo específico, denominado *Thiobacillus ferrooxidans* (desde el 2000 llamado *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Kelly y Wood, 2000), era el responsable de las aguas ácidas de drenaje de las minas de carbón. Los procesos microbiológicos han sido considerados los causantes de una parte importante de la solubilización de metales en los ambientes mineros (Muñoz, 1993).

La lixiviación bacteriana, también conocida como biolixiviación, puede ser definida como un proceso natural de disolución que resulta de la acción de un grupo de bacterias específicas para lixiviar, o extraer, metales o concentrados minerales presentes en las minas. Dando como resultado una solución ácida que contiene el metal en su forma soluble (Constanza, 2006).

2.2.3. Microorganismos biolixiviantes

Los microorganismos predominantes que disuelven sulfuros metálicos (como Cu_5FeS_4 , CuFeS_2 , Cu_2S entre otros) son bacterias extremadamente acidófilas y arqueas (es decir, organismos que prosperan a valores de pH por debajo de 3) que pueden oxidar compuestos de azufre inorgánicos y/o iones de hierro (II). Varias revisiones recientes han dado una visión amplia de la diversidad microbiana dentro de los biotopos mineros (Schippers *et al.*, 2010; Hedrich *et al.*, 2011; Johnson, 2011; Dopson y Johnson, 2012). Las bacterias de lixiviación se distribuyen entre las Proteobacterias (*Acidithiobacillus*, *Acidiphilium*, *Acidiferrobacter*, *Ferrovum*); Nitrospirae (*Leptospirillum*); Firmicutes (*Alicyclobacillus*, *Sulfobacillus*); y Actinobacteria (*Ferrimicrobium*, *Acidimicrobium*, *Ferrithrix*). Dentro de todos los grupos, se pueden encontrar

microorganismos mesofílicos y moderadamente termófilos (Clark y Norris, 1996; Norris *et al.*, 2000). Las arqueas de lixiviación pertenecen principalmente a Sulfolobales, un grupo de oxidantes extremadamente termófilos, azufrados y de hierro (II) que incluyen géneros como *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* y *Sulfurisphaera* (Norris *et al.*, 2000). Además, dentro de las Thermoplasmatales, se conocen dos especies que oxidan hierro (II), *Ferroplasma acidiphilum* (Golyshina *et al.*, 2000) y *Ferroplasma acidarmanus* (Edwards *et al.*, 2000).

Tabla 3. Bacterias usadas en Biolixiviación.

BACTERIAS USADAS EN LIXIVIACIÓN				
MICROORGANISMOS	FUENTE DE ENERGÍA	MORFOLOGÍA	pH OPTIMO	TEMP. OPTIMA °C
Tiobacillus Ferrooxidans	Fierro ferroso, minerales sulfurados, azufre, tiosulfato.	No forman esporas, gram-negativa, tipo bacilar, 0.5 -1µm, con un flagelo polar.	1.7 - 3.5	28 - 30
Leptospirillum Ferrooxidans	Fierro ferroso	Células espirales, gram-negativa con flagelo polar.	3.0	30
Thiobacillus Thiooxidans	Azufre elemental; tiosulfato	No forman esporas, gram-negativa, tipo bacilar, 0.5 x 1-2 µm con un flagelo polar.	1.0 - 3.5	28 - 30
Thiobacillus thioparus	Tiosulfato, azufre elemental	No forman esporas, gram-negativa, tipo bacilar 0.5 x 1.0-3.0 µm - con un flagelo polar.	7.0 - 8.5	28 - 30
Sulfobacillus thermosulfido Oxidans	Fierro ferroso, azufre elemental, minerales sulfurados	Forman esporas, tipo bacilar 0.8 1 - 3 µm, sujeto a polimorfismo.	2.1 - 2.5	50 - 55
Sulfolobus acidocaldarius	Azufre elemental, extracto de levadura.	Células esféricas 0.8 x 1.0 µm - gram-negativa, no móviles, no contiene péptidoglican.	2.0 - 3.0	70 - 75
Sulfolobus Brierley	Azufre elemental, fierro ferroso, extracto de levadura.		2.0 - 3.0	60
Thiobacillus Organoparus o thiobacillus acidophilus	Azufre elemental, tiosulfato extracto de levadura, sales, azucres, amino ácidos.	No forman esporas, gram-negativa tipo bacilar con un flagelo.	2.0 - 3.0	28 - 30

2.2.4. Mecanismos de biolixiviación

Los mecanismos de biolixiviación se han discutido intensamente en el pasado. En la literatura anterior, se describe la biolixiviación "directa" frente a la "indirecta" (Rossi, 1990; Bosecker, 1997; Ehrlich, 2009). La lixiviación directa significa una transferencia directa de electrones desde el sulfuro metálico a la célula unida a la superficie del mineral y la lixiviación indirecta procede a través del agente oxidante del sulfuro metálico, iones de hierro (III), que son generados por hierro (II) por bacterias oxidantes, ya sea planctónicas o adheridas a la superficie del mineral

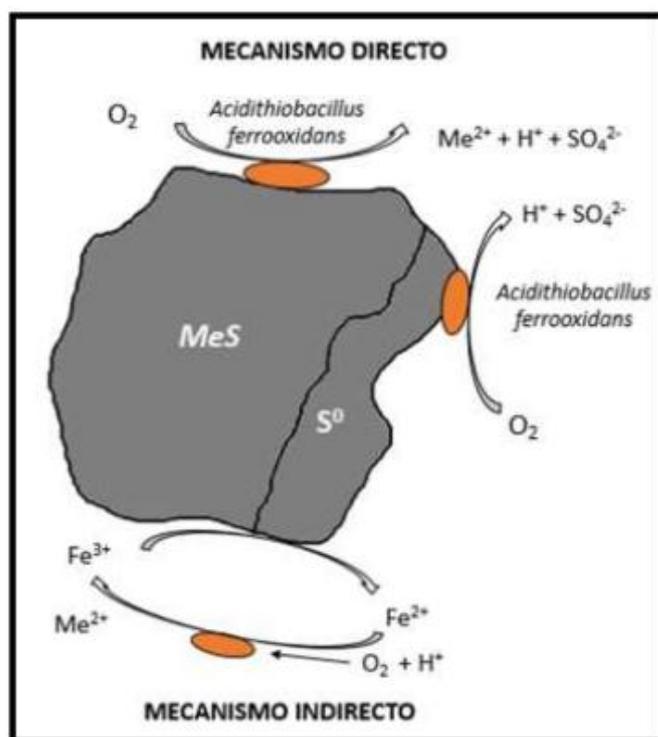


Figura 3. Mecanismo directo e indirecto para la solubilización del metal.

Sin embargo, no se ha demostrado una transmisión directa de electrones a través de enzimas, nanohilos, etc., entre el sulfuro metálico y la célula adherida por lo cual no parece existir un mecanismo directo. En cambio, las células adheridas proporcionan un compartimiento de reacción lleno de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) eficientes para la lixiviación indirecta con iones de hierro (III) (Sand *et al.*, 1995, 2001). Por lo tanto, para mejorar la comprensión de estos procesos, los términos "lixiviación de contacto" y "lixiviación sin contacto" han sido propuestos para biolixiviación por células adheridas y planctónicas, respectivamente.

Un tercer término, "lixiviación cooperativa", describe la disolución de coloides de azufre, intermedios de azufre y fragmentos minerales por células planctónicas (Tributsch, 2001; Rawlings, 2002). Estos nuevos términos pueden ser útiles para una descripción del estado físico de las células involucradas en la biolixiviación, pero no nos dicen nada sobre los mecanismos químicos subyacentes de la disolución biológica de sulfuro de metal.

2.2.5. Vías de oxidación de sulfuros metálicos

La oxidación de sulfuros metálicos puede describirse por dos vías diferentes: la vía de tiosulfato, para sulfuros metálicos insolubles en ácido y la vía de polisulfuro, para sulfuros metálicos solubles en ácido; que en realidad son vías químicas (Schippers *et al.*, 1996, 1999; Schippers y Sand 1999; Sand *et al.*, 2001).

La formación de sustancias intermedias de azufre en las dos vías de reacción depende de la mineralogía del sulfuro metálico y de las condiciones geoquímicas del entorno, principalmente el pH y la presencia de diferentes oxidantes (Schippers, 2004)

Los microorganismos juegan un papel crucial en la oxidación de sustancias intermedias de azufre, que se forman por la disolución química de los sulfuros metálicos. Bajo condiciones óxicas y ácidas relevantes para la biolixiviación, los microorganismos oxidan los iones Fe (II) a Fe (III), que sirven como oxidantes para los sulfuros metálicos y para la mayoría de sustancias intermedias de azufre. Además, los microorganismos pueden catalizar la oxidación de sustancias intermedias de azufre a ácido sulfúrico.

2.2.5.1. Vía Tiosulfato

Los representantes del grupo de los sulfuros metálicos insolubles en ácido como la pirita, molibdenita, y tungstenita (FeS_2 , MoS_2 y WS_2 , respectivamente) necesitan en cualquier caso un proceso de oxidación para disolverse. Los enlaces químicos entre átomos de azufre y un átomo de metal no se rompen hasta que se han realizado un total de 6 etapas sucesivas de oxidación de un electrón y el tiosulfato es liberado. En condiciones de biolixiviación, los iones de Fe^{+3} son el único oxidante relevante para esta reacción y, por lo tanto, se reducen a Fe^{+2} mediante la recepción de los electrones de los átomos del sulfuro metálico. De acuerdo a su primer compuesto libre de azufre, este mecanismo se denomina "vía de tiosulfato".

El Tiosulfato se oxida principalmente a través de tetrionato, el ácido monosulfónico disulfano altamente reactivo, y otras politionatos finalmente al sulfato, pero también cantidades significativas de azufre elemental (10 a 20%)

se pueden producir en la ausencia de oxidación de compuestos de azufre bacteriano (oxidación puramente química por iones de Fe^{+3} o por *Leptospirillum ferrooxidans*; Debido a la exigencia de que la extracción de electrones se efectúa por iones de Fe^{+3} y el hecho de que este alrededor de pH 2 los iones de Fe^{+2} no se oxidan abióticamente a tasas significativas, sólo las bacterias oxidantes de Fe^{+2} tales como *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* son capaces de lixiviar sulfuros metálicos insolubles en ácido bajo condiciones ácidas.

Estas bacterias son capaces de regenerar los iones de Fe^{+3} consumidos en los procesos iniciales de oxidación. En consecuencia, la cinética de lixiviación de sulfuros metálicos disueltos a través de la vía de tiosulfato está determinada principalmente por la actividad de la oxidación del Fe^{+2} bacteriano. Bajo condiciones ácidas en ausencia de bacterias y sin cantidades detectables de iones de Fe^{+3} , las tasas de lixiviación de pirita se reducen drásticamente.

2.2.5.2. Vía Polisulfuro

Los Sulfuros metálicos tales como esfalerita, galena, arsenopirita, calcopirita, y hauerita (ZnS , PbS , FeAsS , CuFeS_2 , y MnS_2 , respectivamente) se disuelven por la acción combinada de la extracción de electrones por iones de Fe^{+3} y el ataque de protones. En consecuencia, en este grupo de sulfuros metálicos los enlaces químicos entre el metal y resto de azufre pueden romperse por iones de Fe^{+3} y, además, por el ataque de protones. En consecuencia, este mecanismo se denomina "vía de polisulfuro". En el curso de la oxidación de polisulfuro, más del 90% de la fracción de sulfuro de un sulfuro metálico se transforma en azufre elemental en ausencia de bacterias azufre-oxidantes.

Los productos menores formados son tiosulfato, politionatos y sulfatos, debido a que la acción oxidante de iones de Fe^{+3} no es un requisito indispensable para la vía de polisulfuro (porque aquí los enlaces químicos entre el metal y el sulfuro se pueden romper por el ataque de protones), los sulfuros metálicos solubles en ácido también pueden ser disueltos por la actividad de las bacterias azufre-oxidantes. En ausencia de iones de Fe^{+3} , estas bacterias oxidan sulfuro libre (H_2S), lo que resulta del ataque de protones en el sulfuro metálico, a través de azufre elemental a ácido sulfúrico y, por lo tanto, regenera los protones

previamente consumidos por la disolución de sulfuro metálico. Los mecanismos biológicos y las reacciones que entran en juego durante la disolución oxidativa de sulfuros metálicos por efecto bacteriano se encuentran en controversia y aún son poco conocidos por diferentes autores que sugieren que su presencia podría aumentar la lixiviación, no tiene ningún efecto o podrían ser perjudiciales para la lixiviación de metales. El conocimiento de los mecanismos de disolución bacteriana de sulfuros se ha centrado en varios minerales de cobre, con el fin de mejorar la eficiencia de las operaciones de biolixiviación.

2.3. Parámetros en el proceso de biolixiviación

En el proceso de biolixiviación hay una serie de parámetros operativos controlados, estos deben mantenerse dentro de un cierto rango en el entorno de lixiviación mediante el cual puede optimizarse la actividad de las bacterias con la oxidación resultante de los minerales de sulfuro (Deveci *et al.*, 2003). En este sentido, los parámetros como; temperatura, acidez, disponibilidad de nutrientes, tamaño de partículas y densidad de pulpa de mineral, condiciones oxidantes, son de primordial importancia para el control y la optimización de la biolixiviación de minerales / concentrados de sulfuro (Varjani *et al.*, 2017).

2.3.1. Temperatura

La temperatura es uno de los principales factores físicos involucrados en el proceso de biolixiviación asimismo el factor biológico, el inóculo microbiano usado en su fase logarítmica, después de cultivos sucesivos (Cruz y Cotrina, 2015). Cada tipo de bacteria tiene una actividad óptima en un rango relativamente definido de temperaturas en el que estos microorganismos operan de manera más eficiente (Johnson, 1998).

Esto indica el carácter dependiente de la temperatura de los procesos de biolixiviación, de manera que la velocidad y el grado de disolución de los sulfuros aumenta con la temperatura. Por otra parte, no se puede aplicar por igual a todos los procesos de biolixiviación, debido a que estos procesos establecen un cierto rango de temperatura más allá del cual el aumento en la velocidad de disolución con la temperatura no es proporcional a la disminución de la actividad oxidante de las bacterias. Esto se puede atribuir a la posible

desnaturalización de las proteínas causada por el aumento en la tasa de muerte térmica de los microorganismos (Deveci *et al.*, 2003).

2.3.2. pH

El pH es un factor importante en la optimización del proceso de biolixiviación ya que determina el crecimiento de bacterias en el medio y en consecuencia la recuperación de metales como el cobre. Otro aspecto importante del pH, es donde el aumento de este parámetro hace que la solubilidad de hierro decrezca y así bacterias reductoras de sulfato puedan convertirse en dominantes (Sánchez *et al.*, 2011). Tal es caso donde el número de bacterias acidófilas como *Thiobacillus* aumentan al disminuir el pH, haciendo que regiones a un pH < 3 sean áreas de intensa actividad metabólica por acidófilos y, en consecuencia, la lixiviación de mineral activo, así mismo en regiones de pH mayor a 6 tienen muy poca actividad microbiana, y no se detecta lixiviación (Southam y Beveridge, 1992).

Según Deveci *et al.*, (2003) en un ambiente de biolixiviación la acidez se puede controlar mediante la oxidación de hierro, azufre y sulfuros metálicos, así como la disolución de minerales de carbonato y mediante la formación de precipitados férricos (jarosita). Estos precipitados generados con pH mayores a 2 y que muchas veces dificulta la oxidación de los sulfuros de minerales, ya que puede afectar negativamente al progreso del proceso de disolución formando una capa protectora sobre la superficie del mineral (Tapia, 2016).

2.3.3. Nutrientes

Un medio de cultivo para el aislamiento y crecimiento de bacterias es esencialmente una mezcla de compuestos químicos necesarios para proporcionar todos los elementos necesarios para la producción de masa celular y energía suficiente para la biosíntesis y el mantenimiento (Deveci *et al.*, 2003).

Los nutrientes que requiere *A. ferrooxidans* son los mismos que utiliza un autótrofo químinosintético y un gran número de medios de cultivo pueden ser encontrados en la literatura en cantidades variables para estudios de lixiviación

microbiana entre los cuales el medio "9K" a menudo puede ser el medio líquido más ampliamente utilizado (Silverman y Lundgren, 1959). En donde los compuestos de hierro y azufre pueden complementarse con sales de amonio, fosfato y magnesio (Bosecker, 1997). Brierley (1978) y Urbano *et al.* (2014) manifiestan que las fuentes nutricionales son principalmente: el magnesio para la fijación del dióxido de carbono, el fósforo para el metabolismo energético, el azufre como componente de los aminoácidos que lo contienen, entre otros.

2.3.4. Tamaño de partícula y densidad de la pulpa de mineral

Uno de los mayores requerimientos para la oxidación bacteriana dentro del proceso de biolixiviación es la disponibilidad de sustrato. Lo ideal es cuando el sustrato es soluble, tal como el sulfato ferroso (sustrato), sin embargo, cuando el sustrato es insoluble, como es el mineral sulfurado, el factor más importante y que directamente interviene en la cinética del proceso no es su concentración (w/v). Al ser insoluble, toda la materia que queda en el interior de la partícula no tiene intervención en el proceso y sólo aquella porción en contacto directo con el líquido (Misari, 2016). Por lo tanto, el factor concentración se ve reemplazado en este caso por el área de la interfase sólido-líquido, expresada convenientemente como área superficial por unidad de volumen. Es decir, el área de superficie aumentada a través de la reducción del tamaño de partícula por un mayor grado de molienda conduce a un efecto favorable en la velocidad de solubilización así mismo a una tasa y extensión de extracción más altas (Deveci *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2011).

El proceso de trituración puede no ser completa para la liberación de minerales valiosos debido a la naturaleza costosa del proceso, especialmente la molienda fina. En la práctica, la biooxidación de concentrados de oro refractario se lleva a cabo a un tamaño de partícula de $-75 \mu\text{m}$ (Dew *et al.*, 1997). El tamaño de partícula óptimo requiere un compromiso entre los costos de reducción de tamaño y la mejora de la cinética y la recuperación. En sistemas agitados, que aún no son comerciales en la biolixiviación de minerales, se requiere tamaños de partícula normalmente $-100 \mu\text{m}$, debido a que facilitan la suspensión y la homogeneidad del contenido (Tapia, 2016).

Además del tamaño de partícula, la densidad de la pulpa del mineral determina el área superficial disponible para el proceso de biolixiviación (Deveci *et al.*, 2003). Es de particular interés operar procesos de biolixiviación a altas concentraciones de sólidos debido a la economía del proceso. Sin embargo, existen ciertas limitaciones prácticas para aumentar la densidad de la pulpa (Mejía *et al.*, 2011), tal es el caso de cultivos mesófilos expuestos a altas densidades de pulpa de concentrados de sulfuros metálicos, lo cual genera inhibición y/o disminución en su actividad, esto debido a ciertos factores (menor cantidad de oxígeno disuelto, daño a la pared celular como resultado de la fricción entre las partículas minerales y los microorganismos, y efecto nocivo de los iones metálicos como Pb^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+}) (Akcil *et al.*, 2007).

La densidad operativa de la pulpa a menudo se limita a un nivel umbral de 20% de sólidos por peso en la práctica industrial de biooxidación con tanque agitado (Dew *et al.*, 1997).

2.3.5. Potencial óxido- reducción (Eh)

El potencial de óxido-reducción puede relacionarse con el crecimiento y la actividad bacteriana, un rápido incremento en este se puede deber a una buena adaptación de los microorganismos al mineral, el potencial redox indica los cambios en la concentración de Fe III y la relación de Fe (III) / Fe (II), las tasas de crecimiento de las bacterias pueden describirse de forma óptima midiendo este parámetro. Esto se debe a su propiedad de utilizar iones como fuente de energía para su crecimiento y la dificultad de dar cuenta directamente de toda la población bacteriana para determinar el crecimiento bacteriano (Xia *et al.*, 2008).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Proceso de enriquecimiento, aislamiento y obtención de consorcio

3.1.1. Toma y transporte de muestras

La toma de muestras se realizó en cinco diversos puntos de drenajes ácidos de la infraestructura de la empresa minera Huinac S. A. C. ubicada en el distrito de la Merced, provincia Aija, departamento de Ancash, en el sector occidental de la Cordillera Negra de los Andes peruanos, las coordenadas geográficas son las siguientes: 77° 40' 42" latitud Este, 9° 41' 56" latitud sur. Esta empresa perteneciente a la pequeña minería procesa 120 TM al día, dedicada a la explotación de vetas polimetálicas (plata, plomo, cobre y zinc).

Se recolectó 3 muestras significativas de 100 mL en cada punto de muestreo (PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5), en frascos de vidrio estériles con tapa rosca según Gurung y Chakraborty (2009). Se evaluaron parámetros físicos- químicos *in situ* con ayuda de un analizador de agua / portátil / multi-parámetros Multi 340i. El transporte se realizó a temperatura ambiente en coolers hasta el laboratorio de investigación de la E. A. P de Biotecnología de la Universidad Nacional Del Santa donde se realizó la primera etapa del proyecto de investigación.



Figura 4. Infraestructura de empresa minera Huinac S. A. C. ubicada en el distrito de la Merced, provincia Aija, departamento de Ancash. PM4 y PM5: punto de muestreo 4 y 5 respectivamente.

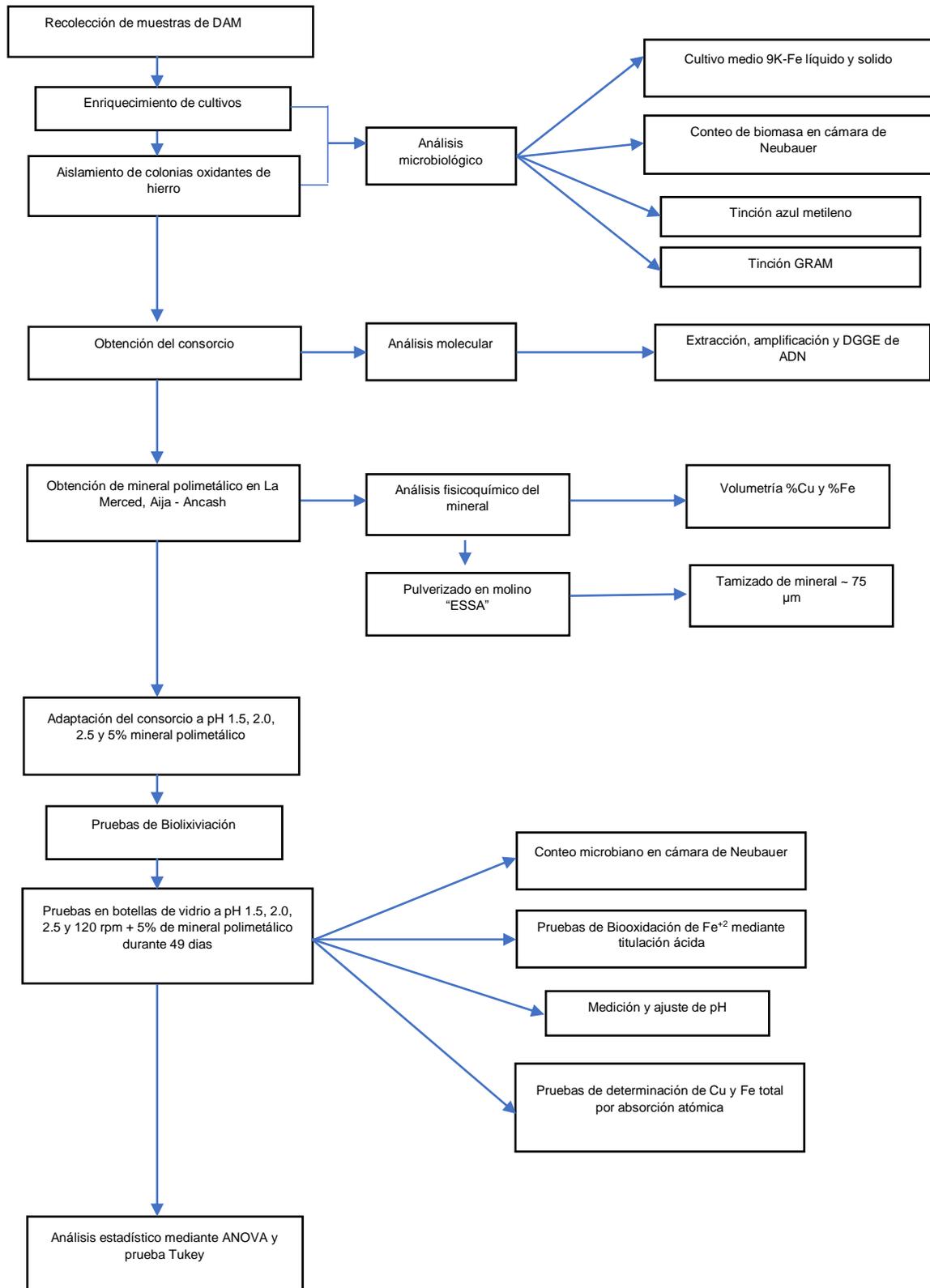


Figura 5. Diagrama de flujo de métodos empleados.

3.1.2. Enriquecimiento de cultivos en medio líquido

El medio seleccionado para el enriquecimiento de quimiolitótrofos fue el medio 9K de Silverman y Lundgren modificado según Quatrini *et al.*, (2007) que de acuerdo a literatura lo describe como el adecuado para el crecimiento de este tipo de bacterias (Yates *et al.*, 1987). Se preparó un volumen total de 1000 mL de medio líquido 9K- Fe en dos soluciones por separado; Solución A: compuesto por 0.04 g K_2HPO_4 , 0.4 g $MgSO_4$ y 0.1 g NH_4SO_4 , los que se diluyeron en 900 mL de agua destilada ácida a pH 1.8 y se esterilizó a 121°C por 20 minutos; Solución B: compuesto por 33.3 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ diluidos en 100 mL de agua destilada estéril a pH 1.8. La cual se esterilizó utilizando filtros milipore de 0.2 μm y se incorporó a la solución A cuando esta alcanzó una temperatura alrededor de 50°C, ajustando el pH final de 1.8 del medio con H_2SO_4 10 N. Se inoculó 10 mL (20% v/v volumen total del medio) de cada una de las muestras de los puntos de muestreo de DAM en 50 mL de medio 9k-Fe en matraces de 100 mL por separado, los cuales se mantuvieron a una temperatura de 30° C y 120 rpm en un agitador con su respectivo control negativo. Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas para observar el comportamiento del medio y crecimiento microbiano.

3.1.3. Aislamiento de colonias oxidantes de hierro en medio sólido

Para el aislamiento se preparó medio 9K- Fe sólido el cual se generó a partir de dos soluciones; solución A: conteniendo 1.75 g $(NH_4)_2 SO_4$, 0.029 g K_2HPO_4 , 0.058 g KCl, 0.029 g $MgSO_4 H_2O$ y 0.0084 g $Ca (NO_3)_2$, los cuales se diluyeron en 210 mL de agua destilada pH 1.8 acidificada con H_2SO_4 al 10 N, se esterilizo a 121° C por 15 minutos; Solución B: 37.3 g $FeSO_4 7 H_2O$ y 12 g de agarosa en 290 mL de agua destilada pH 1.8 acidificada con H_2SO_4 10 N, sin esterilizar para evitar la precipitación de compuestos y desnaturalización de la agarosa.

Una vez esterilizada la solución A, se filtró y mezcló con la solución B, posteriormente se llevó a una cocina hasta alcanzar una temperatura de 65°C aproximadamente. Finalmente se sirvió 20 mL de medio en una caja Petri y dejó enfriar.

Se homogenizaron los cultivos líquidos de cada punto de muestreo (PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5) y se sembraron por el método de la gota la cual consiste en colorar con una micropipeta gotas de 20 µL de cada muestra alrededor de toda la placa Petri, así mismo se utilizó un control negativo (medio sin inocular) para tener un indicador macroscópico de color y controlar las posibles reacciones químicas que pueden suceder con los compuestos del medio. Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente (21°C) y se realizaron observaciones diariamente por un periodo de 30 días.

3.1.4. Obtención de consorcio aislado de DAM

Se obtuvieron cinco muestras correspondientes a los puntos de muestreo de DAM (PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5), los cuales fueron enriquecidos en medio líquido 9K-Fe por separado, observándose el crecimiento de microorganismos mediante el cambio de coloración del medio. Asimismo, se realizó el aislamiento de colonias oxidantes de hierro de cada una de las muestras en medio sólido 9K-Fe, las cuales fueron cultivadas en medio líquido 9K-Fe durante 15 días. Observándose el crecimiento en las diversas muestras, estas fueron combinadas hasta constituir un único cultivo, consorcio DAM.

Una vez obtenido el consorcio se mantuvo en un matraz de 125 mL de capacidad conteniendo 10 mL (20% de inóculo según Gurung y Chakraborty, 2009) y 50 mL de medio 9K-Fe, a pH 1.8, temperatura ambiente (21°C) y 120 rpm en un agitador magnético. Se monitoreó por un período de dos semanas donde se llevó a cabo observaciones microscópicas realizando tinciones (Gram y con azul de metileno) verificando el crecimiento microbiano tanto del consorcio como de un control negativo.

3.2. Caracterización microbiológica del consorcio aislado de DAM

3.2.1. Tinción con azul de metileno

Para hacer un mejor seguimiento del crecimiento y visualizar la morfología de los microorganismos que constituyen el consorcio DAM se realizaron observaciones microscópicas periódicamente cada 48 h, las observaciones fueron llevadas a cabo en fresco para lo cual fue necesario agregar azul de metileno para poder mejorar el proceso debido a la dificultad y tamaño de las bacterias, para ello se concentró de la siguiente manera: Se tomó 1 mL de cada cultivo (consorcio y control negativo) en tubos eppendorf de 2 ml. Se centrifugó a 800 rpm por 10 min. Se eliminaron las sales y se tomó el sobrenadante en otro tubo de 2 mL. Se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y se tomó el pellet, los cuales se resuspendieron en 10 µL de agua ácida estéril acidificada a pH 1.8 con H₂SO₄ (Gurung y Chakraborty, 2009 y Quatrini *et al.*, 2007). Se colocó en un portaobjeto y se agregó 1 gota de azul de metileno, se homogenizó y finalmente se observó al microscopio a 100 X con aceite de inmersión.

3.2.2. Tinción Gram

La tinción Gram fue otro de los procedimientos que se realizó para lograr caracterizar la morfología celular bacteriana, para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color morado y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa o rojo grosella. Para ello se realizó el siguiente procedimiento previo para eliminar residuos y concentrar biomasa antes de preparar los frotis para seguir el protocolo habitual. Se tomó 1 mL de cada cultivo (consorcio y control negativo) en tubos eppendorf de 2mL, se centrifugó a 800 rpm por 10 min eliminando así las sales. Se tomó el sobrenadante en otro tubo eppendorf y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min, desechando el sobrenadante y quedándose con el pellet. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en 10 µL de agua

destilada estéril pH 1.8, a partir de los cuales se preparó los frotos bacterianos.

Los 10 μ L conteniendo el pellet celular se fijaron con metanol al 95% por 15 min (Mangels *et al.*, 1984; Ithoi *et al.*, 2011), luego se dejó secar al ambiente y se lavó cuidadosamente. Se agregó cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (3 gotas) y se dejó actuar por 2 min. Se lavó con el mínimo de agua eliminando el exceso de colorante. Seguido de ello se agregó lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (3 gotas) y se dejó actuar por 2 min. Se lavó con el mínimo de agua eliminando el exceso de mordente. Se decoloró con alcohol acetona hasta que el efluente se viera incoloro. Se lavó con agua para eliminar el exceso de disolvente. Se agregó safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (3 gotas) y se dejó actuar por 1 minuto. Se lavó con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste. Finalmente se dejó secar la preparación a temperatura ambiente y se observó al microscopio a 100X con aceite de inmersión.

3.2.3. Recuento y determinación de biomasa del Consorcio Bacteriano

El recuento bacteriano total se determinó por microscopía a través de una cámara de Neubauer cada 48 h durante dos semanas y se siguió el protocolo de conteo microbiano en 5 cuadrantes (Madigan *et al.*, 2012). Para ello, se extrajo 1 mL de cada cultivo (consorcio DAM y control negativo) de los matraces previamente agitados y se colocó en tubos eppendorfs de 2.0 mL de capacidad, primero se centrifugaron a 800 rpm por 5 min con el propósito de eliminar sales del medio, seguido de ello para concentrar la biomasa celular de los cultivos, el sobrenadante se pasó a otros tubos eppendorfs y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min y de esta manera se obtuvo el pellet celular, los cuales fueron resuspendidos en 10 μ L de agua ácida estéril a pH 1.8 y se colocaron en la cámara de Neubauer. Se observó a 100 X con aceite de inmersión.

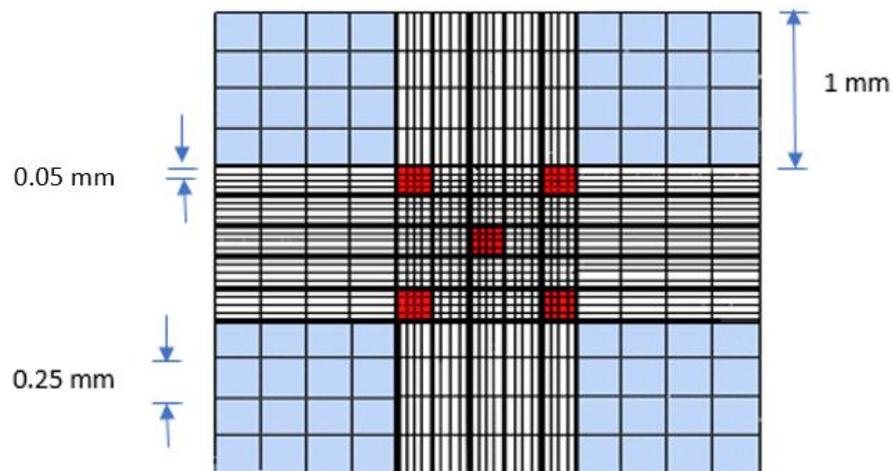


Figura 6. Recuento de 5 cuadrados en cámara de Neubauer. Área Total = $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} = 1\text{ mm}^2$. Volumen = $1\text{ mm}^2 \times 0,1\text{ mm} = 0,1\text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4}\text{ mL}$.

Finalmente se prosiguió a contar en los cuadrados coloreados de rojo en la figura 6 y se calculó la concentración celular según la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Total Células Contadas} \times 250.000}{\text{Número de Cuadrados}}$$

Así mismo, se determinó la biomasa del consorcio bacteriano midiendo la turbidez celular a 660 nm (Sugio, 2008), luego de eliminar las partículas presentes del mineral con un pretratamiento de centrifugaciones consecutivas, elaborando como referencia una curva de calibración de cél/mL respecto al tiempo a través de la técnica de conteo en cámara de Neubauer. Dicha operación se realizó con una frecuencia de 72 horas durante 15 días, donde los resultados se expresarán en unidades de absorbancia.

3.3. Adaptación del consorcio aislado de DAM a diferentes pH

Para evaluar el efecto del pH en el proceso de biolixiviación fue necesario adaptar el medio del consorcio con pH inicial (1.8) a los siguientes pH (1.5, 2.0 y 2.5) con H_2SO_4 concentrado. Se realizó dos trasposos sucesivos

semanales a nuevo medio 9K-Fe, en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL del medio, 10 mL de inóculo y acidificando los pH del medio con H₂SO₄ concentrado. Se mantuvieron a temperatura ambiente y a 120 rpm. Se monitorearon y realizaron observaciones microscópicas para evaluar el crecimiento microbiano cada 48 h.



Figura 7. Medición y acidificación de agua destilada utilizada para preparar medio 9K- Fe.

3.4. Caracterización molecular del consorcio DAM a diferentes pH

3.4.1. Proceso de aislamiento de ADN genómico

El aislamiento de ADN se realizó en el laboratorio de biominería de la Universidad de Antofagasta (Chile). Una vez obtenido concentrado celular de una población de $\sim 1 \times 10^7$ cel/ mL, se extrajo ADN genómico utilizando el kit comercial Power Soil DNA Isolation kit (MoBio) de acuerdo a las instrucciones del manual. Así mismo se realizó una corrida de electroforesis en gel de agarosa (1%) para corroborar la presencia de ADN aislado. Para ello se siguió los siguientes pasos:

a) Pre tratamiento de muestras

Cada cultivo (consorcio adaptado a diferentes pH) fueron filtrados (0.2 μm) a través del sistema de filtración al vacío BUCHI v-700, y se diluyeron en 15 mL de agua ácida (correspondiente a cada pH) estéril.

Se tomó 12 mL de cada filtrado (1.5 mL en ocho tubos eppendorf de 2.0 mL), se centrifugó a 8 000 rpm por 5 minutos y se descartó las sales. En ocho nuevos tubos eppendorf se tomó 1 mL de sobrenadante de las muestras y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se juntó el pellet de cada tubo eppendorf en uno solo, se resuspendió en 1 mL de agua estéril, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos (se realizó tres veces el lavado hasta obtener pellet más puro).

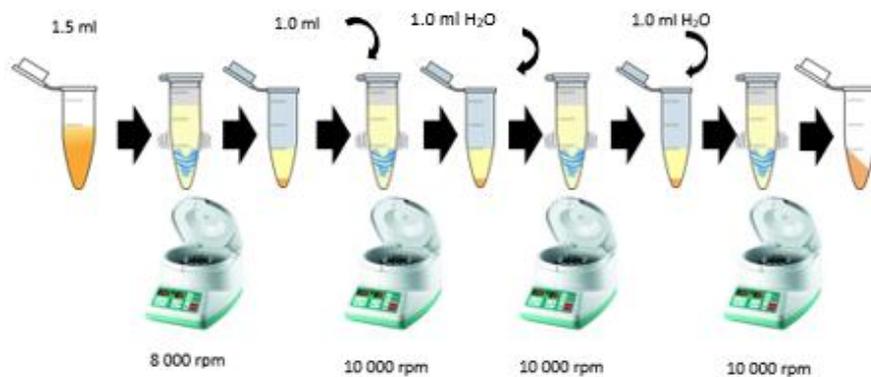


Figura 8. Esquema del proceso de preparación de muestras.

b) Aislamiento de ADN

El aislamiento se siguió según el protocolo del kit Power Soil DNA Isolation kit (MoBio), para conocer a más detalle los componentes anexo N° 08. Las tres muestras obtenidas (consorcio adaptado a pH 1.5, 2.0 y 2.5) se añadieron en tubos PowerBead y se vortexeó suavemente. Se añadió 60 μL de solución C1 se invirtió varias veces, asegurando los tubos se vortexeó a la máxima velocidad por 15 min. Se procedió a centrifugar a 10,000 x g por 30 seg a temperatura ambiente, no excediendo de 10 000 x g debido a que los tubos pueden quebrarse. Se transfirió el sobrenadante a tubos limpios

de 2 mL en donde se añadió 250 μ L de solución C2 y se vortexeo por 5 seg, se incubó a 4° C por 5 min, se centrifugó a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente, luego se transfirió no más de 600 μ L de sobrenadante a un tubo limpio de 2 mL. Se añadió 200 μ L de solución C3, se vortexeo e incubó a 4° C por 5 min, se centrifugó los tubos a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente. Se homogenizó la solución C4 y añadió 1200 μ L de solución C4 al sobrenadante y vortexeo por 5 seg. Se extrajo aproximadamente 670 μ L en un Spin Filter y centrifugó 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente. Eliminando el filtrado se añadió 670 μ L de sobrenadante a un nuevo spin filter y centrifugó a 10 000 x g por 1 min. Esto se repitió por tres veces. Se añadió 500 μ L de solución C5 y centrifugó a 10 000 x g por 30 seg a temperatura ambiente. Se descartó el fluido y volvió a centrifugar a 10 000 x g por 1 min a temperatura ambiente. Luego cuidadosamente se trasladó el filtro a un nuevo tubo limpio de 2mL, evitando salpicar la solución C5 en el spin filter se añadió 100 μ L de la solución C6 en el centro de la membrana de filtro. Se centrifugó a 10 000 x g por 30 seg a temperatura ambiente. Se descartó el spin filter y el ADN en el tubo está listo para la aplicación posterior. Finalmente se almacenó el ADN a -20° hasta su utilización.

c) Preparación gel de Agarosa (1.0%)

Se pesó 0.05 g de gel agarosa y se midió 50 mL de Tris Acetate- buffer EDTA los cuales se agregaron en un matraz de 100 mL. Se calentó al microondas, hasta observar el burbujeo y visualizar incoloro. Luego se agregó 2 μ L de Safe View y homogenizó ligeramente. Se colocó la bandeja y el peine, e incorporó la solución con agarosa. Se esperó que gelifique el gel en la caja, se retiró con cuidado el peine cuando estuvo listo el gel.

d) Electroforesis en gel de Agarosa

Una vez listo el gel se llevó la bandeja con el gel de agarosa a la cubeta de electroforesis y se llenó con tampón Tris Acetate- buffer EDTA. En cada pocillo se cargó 3 μ L de buffer de carga + 5 μ L de muestra, y 5 μ L de marcador molecular (1 kb DNA Ladder). La fuente de alimentación se

programó a 120 V por 25 minutos. Una vez iniciada la corrida se esperó el tiempo programado y llevó a un transiluminador de luz UV para observar el resultado.

3.4.2. Amplificación por la PCR

El ADN genómico aislado fue utilizado para la amplificación de las regiones V3 V4 y V5 del gen ARNr 16S del dominio bacteria de los cultivos (consorcio adaptado a los tres diferentes pH) mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos para bacteria 341F y 907R.

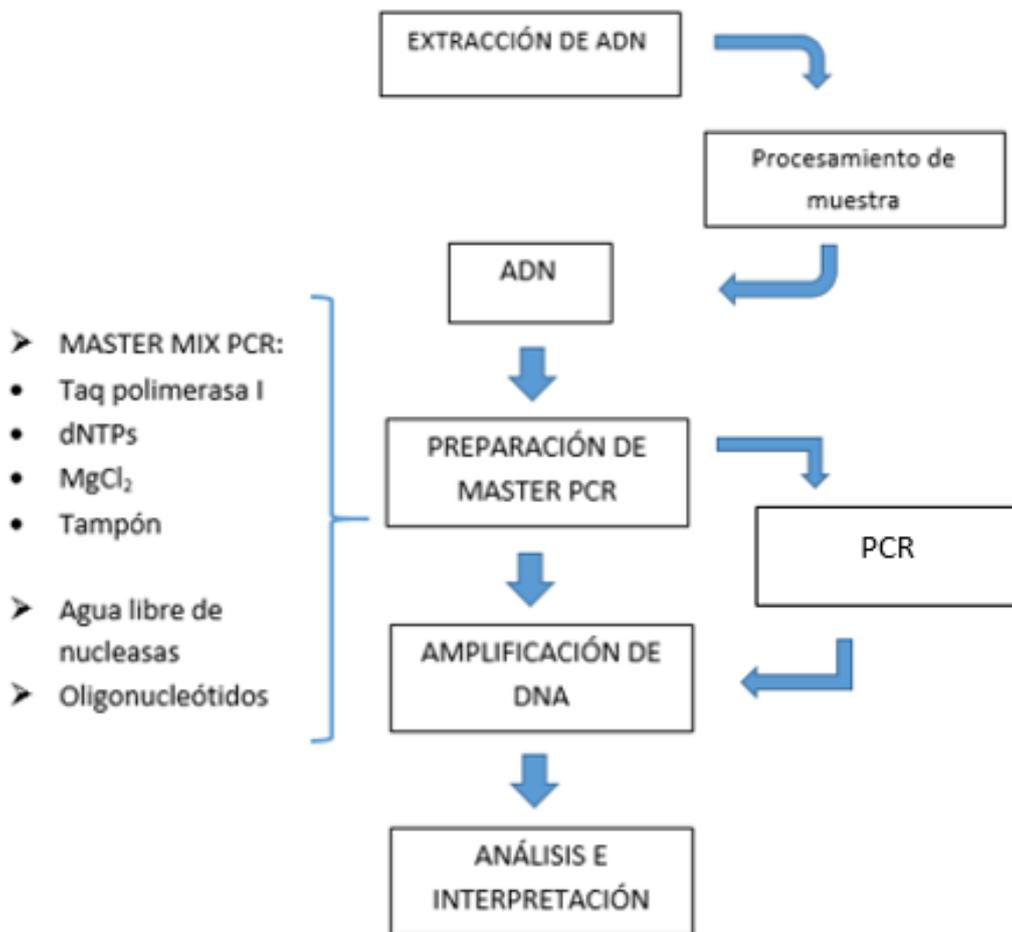


Figura 9. Esquema general de amplificación de ADN por PCR.

a) Preparación Master mix

En un tubo de PCR se agregó las siguientes cantidades (tabla 4) de los reactivos que constituyen el master mix. Se homogenizó cuidadosamente un volumen de 230 μL para un promedio de 10 reacciones.

Tabla 4. Lista de componentes de Master mix.

REACTIVOS	CONCENTRACION FINAL	VOLUMEN (10 Rx)
Agua milQ	--	132,5 μL
Buffer color Green 5X	1X	50 μL
MgCl ₂ (1-4mM)	2,5 mM	20 μL
Primer 341F (0,1-1 μM)	0,1-1 μM	10 μL
Primer 907R (0,1-1 μM)	0,1-1 μM	10 μL
dNTPs (10 mM)	0,2 Mm dNTPs	5 μL
Taq polimerasa	0,025U/ μL	2,5 μL
Volumen total		230 μL

b) PCR y programa

Se agregó 23 μL de Master mix a cada tubo de PCR, y 1 μL de cada muestra de ADN aislado. Se colocó los tubos en el termociclador MJ Mini™ - Bio-Rad, en donde el programa consistió en desnaturalización inicial a 95° C por 5 minutos, 35 ciclos sucesivos de desnaturalización a 95° C por 40 segundos, alineamiento a 57° C por 40 segundos y extensión a 72° C por 50 segundos. Por ultimo extensión final a 72° C por 10 minutos. Al finalizar el programa los productos de amplificación se cargaron en un gel de agarosa 1,5% así mismo un marcador de peso molecular de 100 pb (CS cleaver) y visualizados bajo un transiluminador de luz UV.



Figura 10. Termociclador MJ Mini™ - Bio-Rad utilizado en el laboratorio de biominería de la universidad de Antofagasta.

3.4.3. Evaluación mediante DGGE

Los productos amplificados por la PCR se colocaron en geles de poliacrilamida al 6% (rango de 200- 400 pb), conteniendo un gradiente desnaturante de 40-60%. La corrida del DGGE se realizó en el sistema DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad) a 60°C y 100V, durante 7 horas. Los geles fueron teñidos con GelRed y visualizados bajo luz UV en el transiluminador.

a) Soluciones desnaturizantes

Se preparó una solución desnaturante de baja densidad (40 %) y una de alta densidad (60%) (Tablas 5 y 6). Ambas soluciones desnaturizantes se filtraron usando un filtro con diámetro de poro de 0.45 μm y almacenó por 30 días a 4° C.

Tabla 5. Solución 40% desnaturalizante (6% PAG)

Reactivo	Volumen (mL)
Acril-bisacrilamida 40% (37.5:1)	15
Buffer TAE 50 X	2
Formamida	16
Urea	16.8 gr
Agua destilada	Aforar a 100
total	100

Tabla 6. Solución 60% desnaturalizante (6% PAG)

Reactivo	Volumen (mL)
Acril-bisacrilamida 40% (37.5:1)	15
Buffer TAE 50 X	2
Formamida	24
Urea	25.2 gr
Agua destilada	Aforar a 100 mL
total	100

b) Montaje del sistema

Se lavó los vidrios, los espaciadores y el peine con agua corriente, y posteriormente con agua destilada. Se limpió los vidrios con isopropanol y enjuagó con agua destilada las jeringas, mangueras, conectores, adaptadores y aguja del sistema formador de gradiente. Se alineó los espaciadores a lo largo de los bordes del vidrio más grande, colocando encima el vidrio pequeño y sujetándolos juntos con las pinzas de sujeción, sin apretar las tuercas. Se colocó el ensamble en la base para geles, de

forma tal que el vidrio con saliente (el más grande) se situó del lado opuesto a la junta de goma. Se introdujo la tarjeta de alineamiento entre ambos vidrios y verificó que el ensamble esté correcto, de esta forma se apretó las tuercas con las pinzas de sujeción. Se verificó que el ensamble estuviera nivelado en la superficie con una burbuja niveladora. Se ajustó el sistema formador de gradiente a la graduación 15 para jeringas de 30 mL usando vidrios de 16 x 16 cm. Se probó el ensamble con agua MilliQ y corroboró que no había ninguna fuga. Se agregó el agua e introdujo una tira de papel filtro para secar los cristales.

Nota: Antes de vaciar las soluciones desnaturizantes en la cavidad de los cristales, se agregó los catalizadores requeridos para la polimerización de la acrilamida/bis-acrilamida.

c) Preparación de gel de Poliacrilamida

Se preparó por separado en tubos Falcon de 50 mL las soluciones desnaturizantes (20 mL c/u) con los catalizadores de polimerización; 70 μ L de PSA (persulfato de amonio) al 10% y 10 μ L TEMED (tetrametilendiamina) y se mezcló por inversión. Se llenó las jeringas con las soluciones de alta y baja densidad, eliminando el aire que pudiera estar presente y se ajustó a un volumen de 17 mL. Se colocó las jeringas en posición correcta en el sistema formador de gradiente: alta densidad en High density solution (top filling) y baja densidad en Low density solution (top filling).

Las mangueras se conectaron y se hizo girar la rueda del sistema formador de gradiente hasta llenar la cavidad de los cristales con las soluciones desnaturizantes. Formándose el gradiente lineal de urea y formamida. El peine se colocó y esperó a que concluya la polimerización (~ 60 minutos).

d) Pre calentamiento del buffer de corrida

Se enjuagó el tanque con agua destilada y preparó 7 litros de TAE 1X (140 mL de TAE 50X + 6.860 L de Agua MilliQ), se pre calentó el buffer a una temperatura cercana a los 60 °C y vertió en el tanque de electroforesis. Una vez polimerizado el gel se retiró cuidadosamente el peine. Se enjuagó cada pozo cuidadosamente con el buffer de corrida y colocó el ensamble con el gel en el marco sujetador. Así mismo se preparó otro ensamble de vidrios (vidrio grande y pequeño unidos con las pinzas de sujeción) y colocó en el marco sujetador, en el lado opuesto en el que se encuentra el ensamble con el gel polimerizado. Este ensamble permitió formar una cavidad superior en el marco sujetador. Se colocó el marco sujetador (con el gel y el ensamble de vidrios) dentro del tanque de electroforesis en la posición correcta.

e) Cargado de muestras y Electroforesis

Se cargaron 16 µL de cada producto de PCR (muestras) en los pocillos centrales del gel, utilizando una micropipeta de 20 µL y puntas finas con filtro. La carga del producto se realizó de forma lenta y homogénea. Se colocó el módulo de electroforesis y control de temperatura y se verificó que esté funcionando correctamente. Se programó el equipo para mantener una temperatura constante de 60°C durante la electroforesis. Se tapó el módulo de control y conectó los cables a los electrodos de la fuente de poder.

f) Tinción

La tinción fue llevada a cabo con GelRed 10.000X (concentración final de 3X) con agua miliQ en un volumen de 100 mL. En una bandeja se colocó el gel sobre uno de los vidrios, el cual se forró con papel metálico, colocando cuidadosamente la tinción en una jeringa sobre todo el gel. Después de una hora de tinción, el gel se lavó con agua destilada y se retiró cuidadosamente para ser visualizado bajo un transiluminador.

3.5. Proceso de Biolixiviación del consorcio a diferentes pH

3.5.1 Caracterización del mineral

3.5.1.1. Tamizado de mineral

El mineral de estudio fue obtenido de la mina Huinac, la misma empresa minera de la cual se aisló el consorcio ubicada en el departamento de Ancash. El mineral (roca) fue disminuido de tamaño primero dentro de un costal con una comba, seguido de ello se pulverizó pasando por un molino de anillo "ESSA" de la escuela de ingeniería de mina de la universidad Nacional de Trujillo, finalmente el mineral fue pasado a través de una malla Nº 200 donde se obtuvo un tamaño de partícula ~75 µm.

3.5.1.2. Análisis de mineral

La composición elemental de la muestra de mineral se analizó según Ma *et al.*, (2017) mediante espectroscopia de emisión atómica por plasma inductivamente acoplado (ICP-OES), donde se tomó una muestra representativa del mineral y se mandó a realizar el análisis en el Laboratorio de procesamiento de minerales de la Universidad Nacional de Trujillo.

EL empleo de la ICP-OES permite realizar un análisis simultáneo de elementos con una adecuada sensibilidad debido al alto grado de automatización que ofrece, así como reproducibilidad y rapidez de trabajo (Mauri *et al.*, 2010; Argota *et al.*, 2013; Otero, 2009). El principio de funcionamiento de un ICP-OES consiste en la determinación cuantitativa de elementos a niveles de traza en muestras de disolución ácida y acuosa, la solución es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el nebulizador donde es transformado en un aerosol. Este aerosol es conducido a la zona de ionización que consiste en un plasma generado al someter un flujo de Ar a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. Las altas temperaturas del plasma descomponen la muestra completamente, los átomos son excitados para emitir radiación electromagnética (luz). Los iones generados emiten una radiación a la longitud de onda característica de cada uno de los elementos presentes en la muestra, la cual es transmitida a través del sistema óptico

al detector, donde la señal se convierte en intensidad (Skoog y Leary, 1994). La información cualitativa implica identificar la presencia de emisión a las longitudes de ondas características de los elementos de interés, mientras la información cuantitativa se obtiene relacionando la intensidad de emisión con la concentración en una curva de calibrado (Otero, 2009).

3.5.2 Adaptación de cultivos al mineral y biolixiviación de cobre

Los cultivos (consorcio a diferentes pH) fueron adaptados al mineral polimetálico según Xia *et al.*, (2008) progresivamente hasta alcanzar el 5% (p/v) del volumen total del medio (10 mg en 200 mL), de tal manera que se sustituyó todo el hierro ferroso (Fe^{2+}) presente en el medio 9K-Fe con el mineral, esto con la finalidad de que pueda ser utilizado como única fuente de energía por los microorganismos. El traspaso de cultivo a cultivo en medio 9K para la adaptación del consorcio inició con una concentración de 10 % (p/v) de Fe^{2+} y 1 % (p/v) de mineral, hasta que terminó solo con la adición de 5 % (p/v) de mineral y sin adición de Fe^{2+} (0%). Tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 7. Concentración de hierro y mineral empleados en la adaptación de los cultivos en el proceso de biolixiviación.

Fe²⁺		MINERAL	
% (p/v)	g	% (p/v)	g
10	0.66	1	2
7.5	0.50	2	4
5	0.33	3	6
2.5	0.16	4	8
0	0	5	10

Una vez adaptado, se realizó el conteo celular del consorcio en cámara de Neubauer para registrar la cantidad de biomasa con la que empezó el proceso. La biomasa del consorcio fue de 2.8×10^6 .

Los ensayos se realizaron en botellas de vidrio de 1L por triplicado para cada valor de pH 1.5, 2.0 y 2.5, con sus respectivos controles negativos. Se colocó en cada uno 5% de mineral y se detalla a continuación:

Cultivo consorcio:

180 mL de medio 9K + 20 mL de cultivo consorcio pH 1.5 + 10 g de mineral ~75 μ m

180 mL de medio 9K + 20 mL de cultivo consorcio pH 2.0 + 10 g de mineral ~75 μ m

180 mL de medio 9K + 20 mL de cultivo consorcio pH 2.5 + 10 g de mineral ~75 μ m

Controles negativos:

200 mL de medio 9K + 10 g de mineral ~75 μ m

Se colocaron los 18 matraces en un agitador a 120 rpm y a temperatura ambiente por un periodo de 49 días. Asimismo, se realizaron conteos en cámara de Neubauer por triplicado, ensayos de biooxidación de hierro (de Fe⁺² a Fe⁺³) mediante titulación con dicromato de potasio al inicio y final de la biolixiviación, medición de pH y potencial redox con una frecuencia de 96 h. Finalmente se recolectaron las muestras respectivas para los ensayos de Cu y Fe total.

3.5.3 Concentración Cu y Fe total en los cultivos

El método usado para la determinación de Cobre y Hierro total en solución fue espectroscopía por absorción atómica (AA) Aligent Serie 200, utilizando llama aire-acetileno como combustible (Sugio *et al.*, 2008), se usó una lámpara de cátodo hueco de Cu y otra de Fe. Las absorbancias de las muestras se leyeron directamente a una longitud de onda de 324.8 para Cu y 248.3 para Fe.

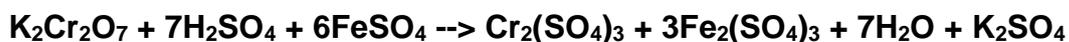
Para ello las repeticiones de los diferentes tratamientos (cultivos conteniendo el mineral más el consorcio a diferentes pH 1.5, 2.0 y 2.5)

fueron agitados durante 1 min, incluyendo los controles negativos, seguido de ello los cultivos se dejaron precipitar por 15 min y del sobrenadante se tomaron un volumen de 5 mL requerido para el análisis. En donde se utilizaron soluciones patrones tanto para Cu y Fe, que contenían el elemento a determinar en concentraciones conocidas. La espectroscopía de absorción atómica es un método para la detección y la determinación de elementos químicos, particularmente de elementos metálicos. Los compuestos para su examen se tienen que romper en los átomos que los constituyen, ello se realiza por pulverización en una llama a alta temperatura. Un rayo luminoso de una cierta longitud de onda producido por un tipo especial de lámpara, se dirige a lo largo del eje longitudinal de una llama plana y hacia un espectrofotómetro. Simultáneamente la solución de la muestra es aspirada hacia el interior de la llama. Antes de entrar en ésta la solución es dispersada formando una niebla de gotitas muy finas, que se evaporan en la llama dando inicialmente la sal seca y luego el vapor de la sal, el cual se disocia por lo menos en parte, en átomos del elemento que se desea determinar (Walton y Reyes, 1983).

3.5.4 Biooxidación de Fe⁺² durante la biolixiviación

La concentración de hierro ferroso en solución se determinó volumétricamente con titulación frente al dicromato de potasio (Akcil *et al.*, 2007), los cultivos fueron agitados manualmente, se dejaron precipitar por 15 minutos y se extrajo una alícuota de 5 mL del sobrenadante y se filtró con papel filtro Whatman N° 42, se le adicionó 10 mL de solución extractiva (H₂SO₄ 98%, H₃PO₄ 88% y Agua destilada) y 3 gotas de difenilamina ácida, posteriormente, se tituló con la solución de Dicromato de potasio 0,01 N hasta el viraje de color traslúcido a violeta oscuro. Se realizó el mismo procedimiento a cada uno de los cultivos de los tratamientos y a sus respectivos controles negativos.

Para calcular el hierro ferroso (g/L) se consideró lo siguiente, que 1 gota (aproximadamente) de Dicromato de potasio equivalente a 0.065 g/L Fe⁺², siguiendo la siguiente reacción:



3.5.5 Determinación de Cu recuperado

Para determinar el Cobre recuperado al final del proceso de biolixiviación se realizó el mismo procedimiento llevado a cabo al inicio, donde cada tratamiento se analizó en solución a través de espectroscopía por absorción atómica (Sugio *et al.*, 2008). Los cultivos conteniendo el mineral más el consorcio a diferentes pH (1.5, 2.0 y 2.5) fueron agitados durante 1 min, incluyendo los controles negativos, seguido de ello los cultivos se dejaron precipitar por 15 min y del sobrenadante se tomó un volumen de 5 mL requerido para el análisis.

Por último, por diferencia entre datos finales e iniciales de cada cultivo (consorcio trabajado a diferentes pH) se obtuvieron los resultados (g/mL) de cobre recuperado en cada tratamiento.

3.6. Análisis estadístico

Se realizará gráficos de tendencia correspondiente al tiempo de evaluación del crecimiento bacteriano del consorcio (cél/mL), potencial redox (mV). Así como de la concentración de cobre del proceso de biolixiviación, determinación de hierro férrico y ferroso durante la biooxidación (Fe⁺² a Fe⁺³). Con el fin de analizar el efecto del pH en proceso de biolixiviación de cobre, se realizará un análisis ANOVA de un factor para comparar la varianza de las medias que hay entre los tres grupos (pH del medio: 1.5, 2.0 y 2.5) y la que existe dentro de cada grupo (repeticiones) y se procesará mediante el software SPSS 23.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Proceso de enriquecimiento, aislamiento y obtención del consorcio

4.1.1 Enriquecimiento de cultivos en medio líquido

Las muestras colectadas de los diversos puntos de muestreo (PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5) fueron enriquecidas con medio líquido 9k suplementado con hierro (Fe^{+2}): 0.04 g/L de K_2HPO_4 , 0.4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0.1 g/L de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, y 33.3 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a pH 1.8, cultivadas a 120 rpm y temperatura ambiente. Estos cultivos fueron monitoreados y evaluados frente a un control negativo.

Según Mejía *et al.*, (2011) en esta etapa de enriquecimiento se logra aumentar la concentración celular y obtener una población idónea para inocular a los subcultivos posteriores $\sim 10^8$ cél/mL, estimada a partir de conteo en cámara de Neubauer.

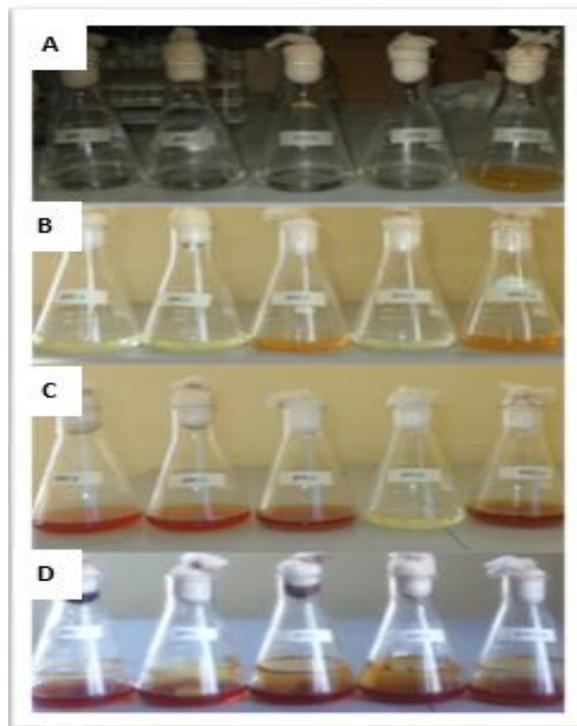


Figura 11. Evaluación cualitativa de los cultivos microbianos en medio 9K- Fe (Enriquecimiento): PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5 (matraces de izquierda a derecha). A: Primer día de cultivo B: Quinto día de cultivo C: Décimo día de cultivo D: Décimo quinto día de cultivo.

En la figura 11 se muestra la evaluación cualitativa del crecimiento de microorganismos acidófilos oxidantes de hierro (Fe^{+2} a Fe^{+3}) de los cultivos provenientes de las diversas muestras de DAM, donde los cultivos pasan de una coloración transparente en el primer día (inoculación) (A) a una coloración amarillenta en el quinto día (B), seguida por una coloración anaranjada en el décimo día (C) y finalmente una coloración rojiza en el décimo quinto día (D) presentando también jarosita. De igual modo Gurung y Chakraborty (2009) indican que el color rojizo es una característica que exhiben los microorganismos en medio 9K-Fe, esto se llevó a cabo verificando el desarrollo y crecimiento microbiano no solo a través de observaciones macroscópicas sino también microscópicas donde se aprecian bacterias con morfología de bacilos característicos de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*, con la diferencia que este último no es capaz de utilizar la oxidación del ion ferroso como fuente de energía (Cabrera *et al.*, 2005).



Figura 12. Subcultivos en medio líquido 9K-Fe (Mantenimiento): Control negativo, PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5 (de izquierda a derecha en ambas imágenes) A: primer día de subcultivo, con coloración amarillenta debido al inóculo. B: décimo día de subcultivo, donde se aprecia que el color inicial se torna rojizo propio del crecimiento y oxidación microbiana.

Asimismo, los cultivos fueron mantenidos a través de dos subcultivos quincenales en medio 9K-Fe tal como se aprecia en la Figura 12, donde se observan en el primer día de subcultivo con una coloración amarillenta, lo cual indica una población microbiana existente debido al traspaso del cultivo de

enriquecimiento previo (A) y al décimo día de subcultivo se observa una coloración rojiza típica de la actividad microbiana oxidantes de hierro (B).

4.1.2 Aislamiento de colonias oxidantes de hierro en medio sólido

A partir de los cultivos contenidos en medio líquido (PM1, PM2, PM3, PM4 y PM5), se sembró con la técnica de la gota en una placa de medio 9K-Fe sólido (1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente). Asimismo, se utilizó un control negativo (medio sin sembrar) como indicador macroscópico. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente, realizando observaciones diariamente.

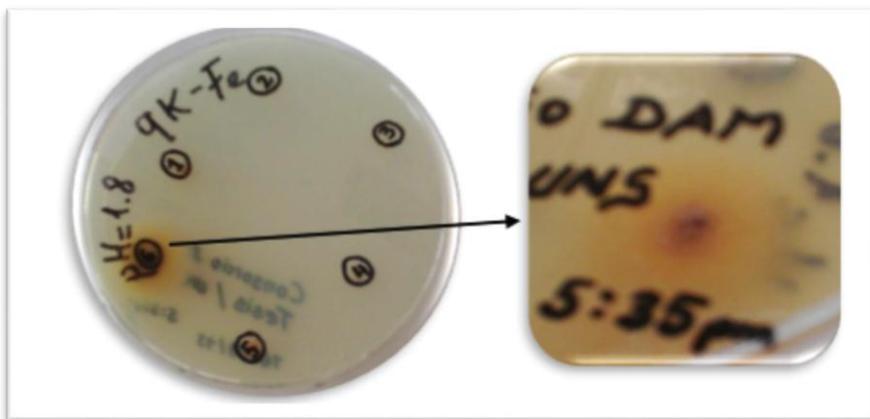


Figura 13. Crecimiento de colonias circulares con centro marrón y periferias amarillas-anaranjadas, en medio sólido 9K-Fe tras 2 semanas de siembra.

Las observaciones macroscópicas de la placa (figura 13) a las dos semanas de siembra nos muestran la morfología de las colonias, siendo circulares con centro marrón y periferias amarillas-anaranjadas, estas mismas características fueron observadas por Jiang *et al.*, (2009) en el aislamiento de cepas oxidantes de hierro y azufre. En este caso el cultivo PM2 muestra un mayor crecimiento alrededor de la placa a comparación de PM1 y PM5 donde se observó colonias muy pequeñas con la misma morfología.

Por otro lado, en el aislamiento y caracterización filogenética de microorganismos acidófilos nativos de aguas ácidas de drenaje en una mina de cobre abandonada en Noruega, se observaron dos morfologías distintas de colonias de bacterias oxidantes de hierro (fácilmente reconocibles como

resultado de la deposición y acumulación de precipitados de hierro férrico). El tipo más numeroso era muy pequeño (0,5 mm), redondo y de forma completa, similar a las colonias formadas por *Leptospirillum ferrooxidans*. Sin embargo, estas bacterias eran células rectas en forma de vara (1 ± 2 mm de largo), en lugar de varillas curvadas y espirillas, que son características de *L. ferrooxidans* (Johnson *et al.*, 2001).

4.1.3 Obtención del consorcio microbiano aislado de DAM

Para la obtención del consorcio, inicialmente fueron necesarios el enriquecimiento y purificación a través de subcultivos quincenales en el proceso, así pues, Lavallo *et al.*, (2005) y Yang Yu *et al.*, (2008) incorporando estas etapas obtuvieron resultados positivos en el aislamiento de bacterias oxidantes de hierro. Tras enriquecer y purificar las muestras de los diferentes puntos de muestreo por separado, se mezclaron en un solo matraz con la finalidad de conformar así un consorcio microbiano eficaz el cual se utilizará para los ensayos de biolixiviación (Figura 14A), del cual se inoculó nuevamente a medio líquido 9K-Fe (Figura 14B), incubado a las mismas condiciones iniciales y evaluado junto a un control negativo.

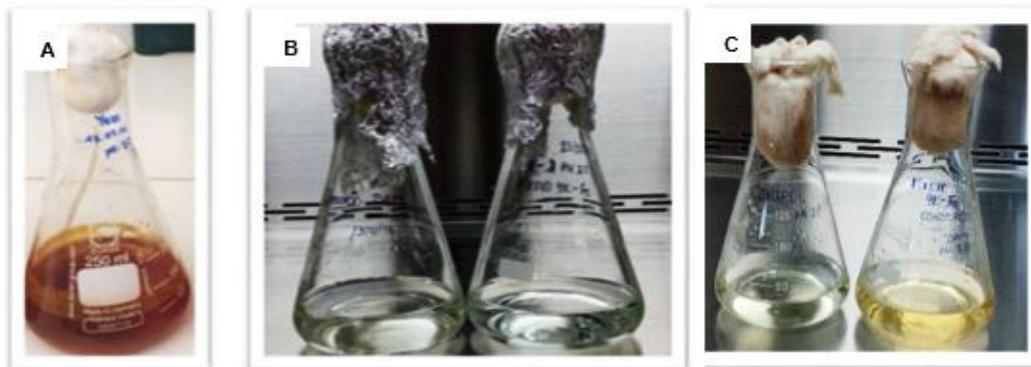


Figura 14. A) Consorcio microbiano con coloración típica de acidófilos oxidantes de hierro. B) Primer día de cultivo como consorcio (matraz derecho) y control negativo (matraz izquierdo). C) Quinto día de cultivo, presenta una coloración inicial amarilla debido a la oxidación microbiana del hierro presente en el medio a diferencia del control negativo.

El desarrollo y crecimiento del consorcio microbiano se monitoreo realizando no solo observaciones macroscópicas sino también microscópicas con recuento en cámara de Neubauer $\sim 1 \times 10^7$ cel/ mL, para poder mantener el consorcio mediante subcultivos.

4.2 Caracterización microbiológica del consorcio

4.2.1 Tinción con azul de metileno

La tinción con azul de metileno nos permitió visualizar de manera más clara a las bacterias de una muestra en fresco, lográndose observar las características microscópicas, donde encontramos en su mayoría bacilos pequeños y alargados, diplobacilos y algunos espirilos cortos, todas estas bacterias en movimiento junto a cristales del medio 9K-Fe (Figura 15). Así mismo en un estudio realizado por Sand *et al.*, (1992) se aislaron cepas oxidantes de hierro de cultivos con muestras provenientes de la mina Ilba (Rumanía), que a través de microscopía reveló la presencia de bacterias *A. ferrooxidans* con morfología de barras, mientras *L. ferrooxidans* en los cultivos jóvenes (hasta 4 días de antigüedad) consistían principalmente en células vibroides, mientras que los cultivos más antiguos (de 1 a 2 semanas de edad) contenían principalmente células en espiral con hasta cuatro giros. Considerándose ampliamente que *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* son los microorganismos que controlan la velocidad de generación del drenaje ácido de la mina, en donde estudios de hibridación fluorescente *in situ* mostraron que en Iron Mountain, California, *A. ferrooxidans* se encuentra en comunidades periféricas (a pH superior a 1.3 y temperatura inferior a 30° C y *L. ferrooxidans* es abundante como organismo planctónico en ambientes con pH más bajo (Schrenk *et al.*, 1998), exhibiendo estas características microscópicas de *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans*, las bacterias del consorcio en medio 9K-Fe cultivadas a pH 1.8 a temperatura ambiente (~21°C) provenientes de muestras extraídas de drenajes ácidos de la mina.

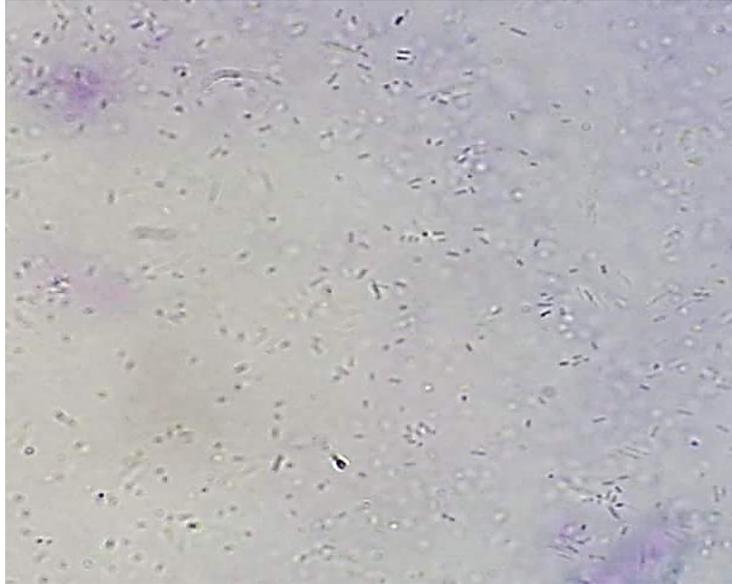


Figura 15. Tinción en fresco con azul de metileno en una muestra del consorcio aislado de DAM en medio líquido 9K-Fe, donde se observa a 100X bacilos, diplobacilos y algunos espirilos.

4.2.2 Tinción Gram

La tinción Gram se realizó de acuerdo al protocolo para tinción de bacterias, con una fijación previa de las células con metanol (Figura 16), que de acuerdo a Mangels *et al* (1984) la fijación con metanol es superior a la fijación por calor, observándose una morfología de las células sin distorsión y poco residuo de fondo. Esta tinción se usó para determinar si los microorganismos presentes en el consorcio eran grampositivos o gramnegativos y observar la morfología de las células. Determinándose así que la muestra del consorcio aislado de DAM posee un conjunto de microorganismos de tipo gramnegativos con morfología de bacilos y diplobacilos de diferentes tamaños, así mismo, pero en pequeña cantidad espirilos. Su observación se hizo a un aumento de 100X en microscopio óptico.

Este resultado nos muestra similitud con *A. ferrooxidans*, una bacteria Gram negativa que se caracteriza generalmente por cinco propiedades, tales como: bacteria oxidante quimiolitotrófica, autótrofa, aeróbica, mesófila y acidófila. Así mismo estos microorganismos son generalmente abundantes en drenajes ácidos de minas de hierro (Dong Jim King *et al*, 2008).

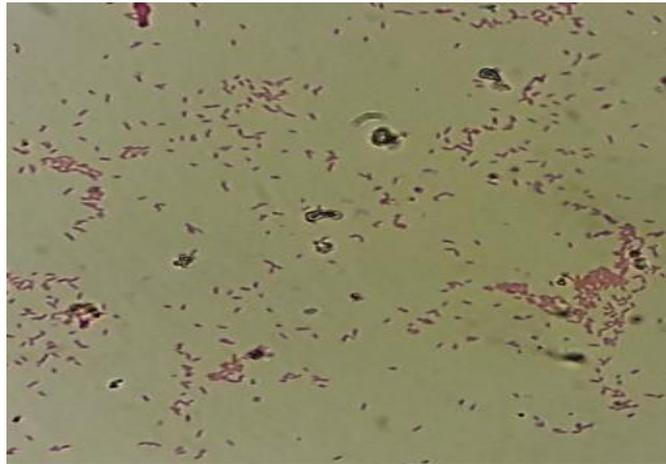


Figura 16. Tinción Gram en una muestra del consorcio aislado de DAM en medio líquido 9K-Fe, donde se distingue microorganismo con morfología de bacilos de diferentes tamaños y ciertos espirilos de tipo Gramnegativos.

4.2.3 Recuento y determinación de biomasa del Consorcio

Bacteriano

En el recuento total de bacterias por microscopía (Figura 17) se obtuvo $\sim 2.2 \times 10^6$ cél/ mL a las dos semanas de cultivo donde el conteo fue cada 48 h, lográndose aumentar la concentración celular y obtener así una población idónea para inocular los ensayos, estimada a partir de conteo en cámara de Neubauer (Mejia *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2016; Pérez, 2016), demostrando así la rápida adaptación de las bacterias presentes al medio 9K-Fe.

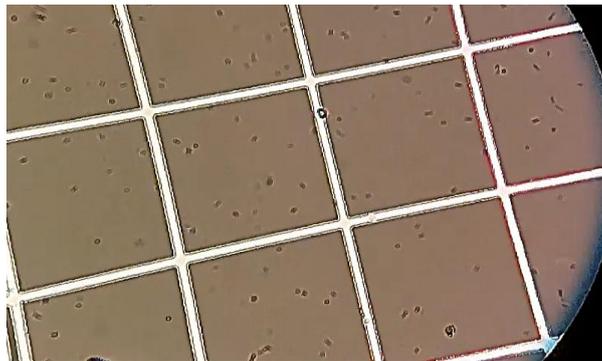


Figura 17. Observación microscópica a 100 X del recuento de bacterias mediante una cámara Neubauer.

Estos conteos se graficaron expresados en unidades logarítmicas de cél/ mL versus el tiempo, para establecer la curva de crecimiento microbiano, tal como se muestra en la figura 18.

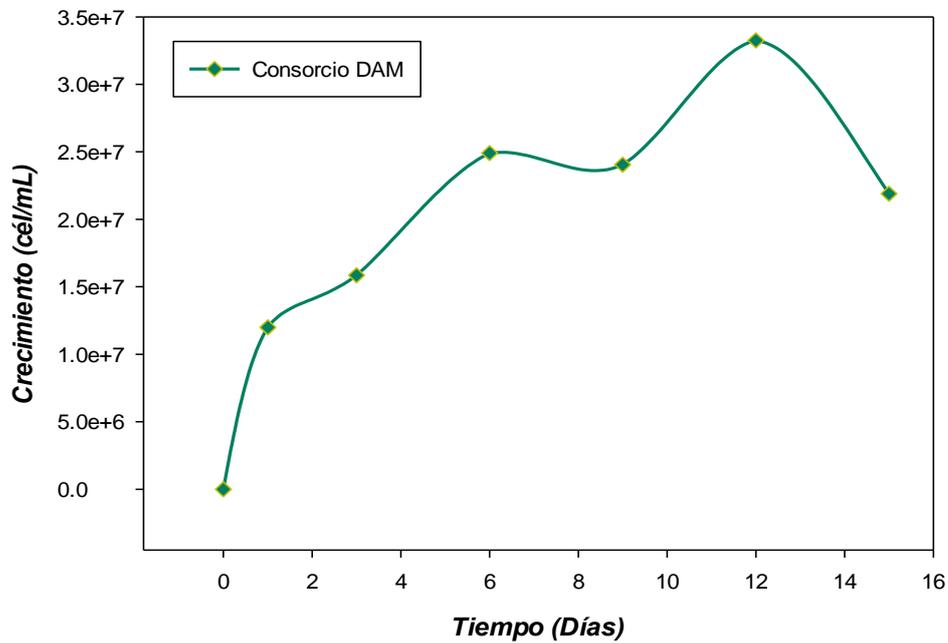


Figura 18. Crecimiento microbiano estimada a partir de conteo en cámara de Neubauer a las dos semanas de cultivo.

Por otra parte, el consorcio bacteriano también fue medido mediante turbidez celular a 660 nm, con una frecuencia de 72 horas durante 15 días, donde los resultados se expresaron en unidades de absorbancia, tal como se muestra en la figura 19.

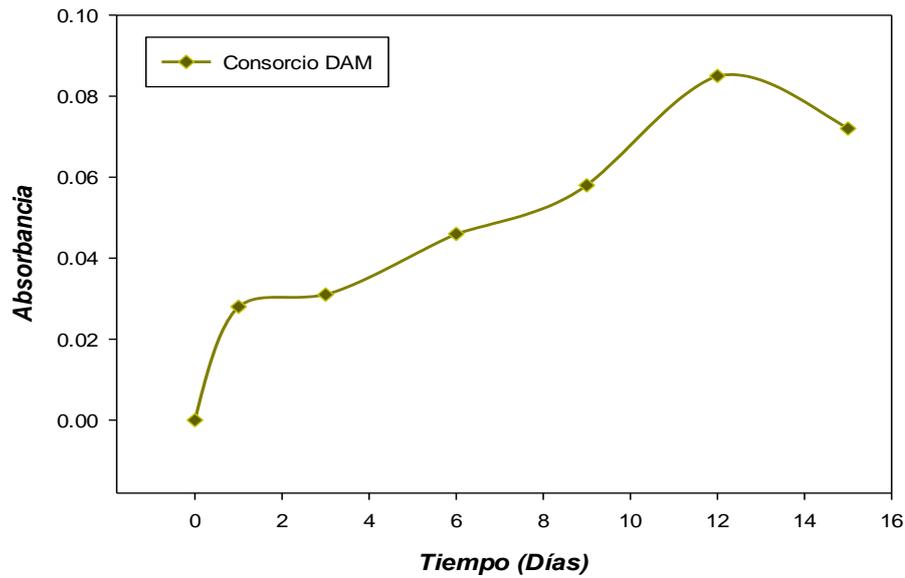


Figura 19. Crecimiento microbiano medido mediante turbidez celular a las dos semanas de cultivo.

4.3 Adaptación del consorcio aislado de DAM a diferentes valores de pH

Después del desarrollo del consorcio cultivado a pH inicial 1.8, se procedió a adaptar el consorcio inoculando en nuevos medios de cultivo 9K- Fe a pH (1.5, 2.0 y 2.5), esto con la finalidad de evaluar el efecto de estos pH en los ensayos de biolixiviación



Figura 20. A: Adaptación del consorcio a diferentes valores de pH (1.5, 2.0 y 2.5) con sus respectivos controles (de izquierda a derecha respectivamente). B: Desarrollo y crecimiento del consorcio oxidante de hierro, adaptado a los diferentes valores de pH a los 15 días.

Para ello se verificó el crecimiento celular a través de observaciones microscópicas y recuento en cámara de Neubauer presentando una biomasa celular de cada cultivo de $\sim 10^7$ cél/ mL al cabo de los 15 días, por otra parte se realizó observaciones macroscópicas donde inicialmente los cultivos en medio 9K- Fe tuvieron una coloración amarillenta muy baja debido al color procedente del inóculo (consorcio inicialmente cultivado en medio 9K- Fe a pH 1.8) después de estas dos semanas se visualizó una coloración rojiza en todos los cultivos a pH (1.5, 2.0 y 2.5) como indicador de la oxidación microbiana de hierro ferroso a férrico. Del mismo modo Frattini *et al.*, (2000) nos indica que los cultivos iniciadores que proporcionaron inóculo para los estudios de crecimiento ajustados a pH 1.8 minimizan la formación de jarosita, estos cultivos incubados en medio 9K a temperatura ambiente y en un agitador a 150 rpm presentan un cambio de color de amarillo a rojizo.

4.4 Caracterización molecular del consorcio a diferentes pH

4.4.1 Proceso de aislamiento de ADN genómico

La extracción del ADN genómico del consorcio adaptado a diferentes pH (1.8, 1.5, 2.0 y 2.5) se realizó utilizando el kit comercial Power Soil DNA Isolation kit (MoBio), teniendo una concentración celular de una población de $\sim 1 \times 10^7$ cel/ mL de los cultivos reactivados en medio 9K- Fe (figura 21).



Figura 21. Reactivación en medio 9K- Fe del consorcio adaptado a diferentes pH: 1.8, 1.5, 2.0 y 2.5 (de izquierda a derecha) en el laboratorio de biominería de la Universidad de Antofagasta.

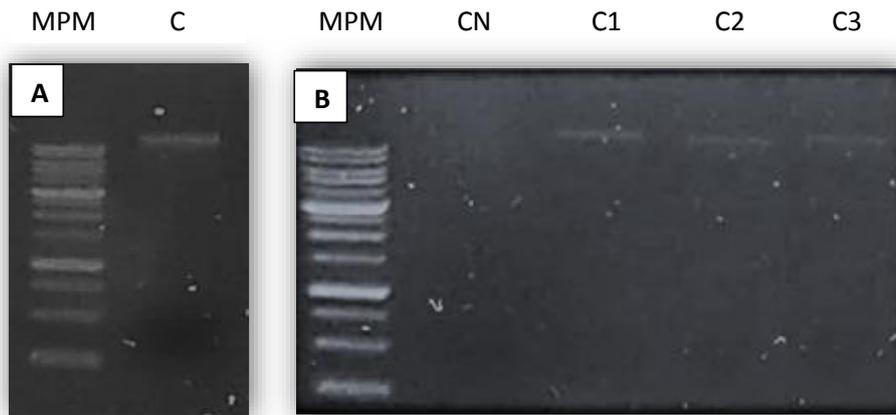


Figura 22. Aislamiento de ADN genómico en gel de agarosa (1 %) bajo un transiluminador de luz UV utilizando un Marcador de peso molecular (MPM) 1 kb DNA Ladder. A: consorcio a pH 1.8 (C: control positivo). B: control negativo (CN), consorcio a pH 1.5 (C1), a pH 2.0 (C2), a pH 2.5 (C3).

En la figura 22 A se observa notoriamente el ADN genómico aislado del consorcio a pH 1.8 (utilizado como control positivo), así mismo se corroboró el ADN genómico en la figura 22 B del consorcio adaptado a diferentes pH (1.5, 2.0 y 2.5), estos evaluados en el efecto del pH durante el proceso de biolixiviación. De esta manera análisis de ADN obtenido a partir de muestras directas o soluciones de lixiviación o después de cultivos de laboratorio fueron investigados para identificar la composición de las poblaciones bacterianas en los sistemas de biolixiviación (Goebel y Stackebrandt, 1994; Pizarro *et al.*, 1996).

4.4.2 Amplificación por la PCR

La amplificación de ADN del consorcio adaptado a diferentes pH, usando los oligonucleótidos para bacteria, nos brinda resultados positivos.

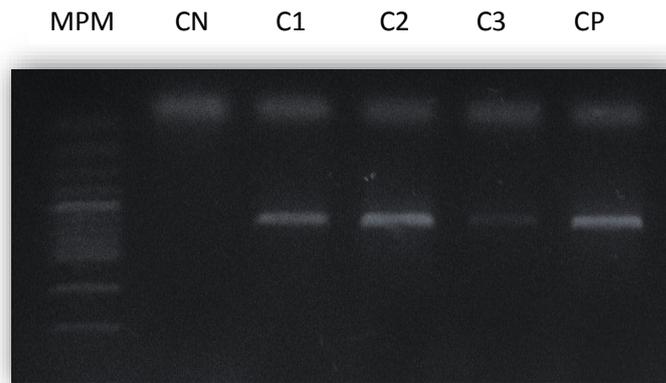


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) de los fragmentos obtenidos por PCR visualizado bajo un transiluminador de luz UV utilizando un Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb DNA Ladder (100-3000pb). Control negativo (CN). Consorcio a pH 1.5 (C1), a pH 2.0 (C2), a pH 2.5 (C3), control positivo (CP).

En la figura 23, se muestra la amplificación de las regiones V3 V4 y V5 del gen ARNr 16S para el dominio bacteria de los cultivos (consorcio adaptado a los tres diferentes pH), estos obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los oligonucleótidos para bacteria 341F y 907R para amplificar un fragmento de ADNr de 550 pb. En el cual el extremo 5' del oligonucleotido 341F, se añadió una secuencia adicional rica en GC de 40 nucleótidos (GC-pinza) para obtener un comportamiento de fusión estable de los fragmentos de ADN en el DGGE (Muyzer *et al.*, 1993).

Los tamaños de las regiones espaciadoras amplificadas a partir de ADN obtenidos de las muestras, se compararon con los tamaños de los obtenidos a partir de cultivos de las principales especies bacterianas aisladas de los sistemas de biolixiviación (Pizarro *et al.*, 1996), estos resultados ilustran la diversidad bacteriana en sistemas de biolixiviación y la presión selectiva generada por diferentes condiciones de crecimiento. Por otra parte estudios revelan la presencia de un pequeño número de especies bacterianas en muestras cultivadas, incluyendo la que se encuentran comúnmente *Thiobacillus ferrooxidans*, otros autótrofos, tales como *Thiobacillus thiooxidans*

y *Leptospirillum ferrooxidans*, y con frecuencia también heterótrofos que pertenecen al género *Acidiphilium* (Goebel y Stackebrandt, 1994).

4.4.3 Evaluación mediante DGGE

El perfil tras la corrida de una DGGE para fragmentos de ARNr 16S del dominio bacteria de los cultivos biolixiviantes, se colocaron en geles de poliacrilamida al 6% (rango de 200- 400 pb), conteniendo un gradiente desnaturante de 40-60%, en el cual nos revela la presencia de 3 grupos predominantes para bacterias.

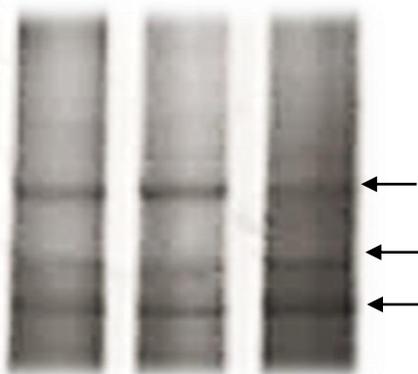


Figura 24. Gel de poliacrilamida (6%) en gradiente desnaturante de urea- formamida (40%- 60%). DGGE para las regiones V3, V4 y V5 del gen ARNr 16S del dominio bacteria. Carril 1, 2, 3: consorcio a pH 1.5, 2.0 y 2.5 respectivamente.

Los resultados del perfil por DGGE para las regiones amplificadas para V3, V4 y V5 del gen ARNr 16S del dominio bacteria del consorcio microbiano procedente de ambientes mineros empleado en el proceso de biolixiviación a diferentes pH, esto con la finalidad de su posterior identificación, visualizándose tres bandas lo cual indica tres diferentes especies bacterianas dominantes dentro del consorcio (indicado con las flechas en la figura 24). Es así como amplificaciones por PCR a partir de genes ARNr 16S de poblaciones bacterianas naturales, utilizando cebadores específicos de genes, producen mezclas de productos de longitud idéntica, pero diferentes en la secuencia de nucleótidos. DGGE separa estos productos de PCR sobre la base de

diferencias en el comportamiento de fusión en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente lineal de desnaturalizantes de ADN, dando de este modo una visualización directa de los participantes dominantes en las poblaciones microbianas (Muyzer y De Waal, 1994; Muyzer et al., 1995). Yu, *et al.*, (2014) reafirman que DGGE detecta diferencias en el comportamiento de fusión de pequeños fragmentos de ADN (200-700 pb) que difieren en una sola sustitución de base. Está establecido que DGGE ofrece un método rápido independiente de cultivo para detectar e identificar poblaciones predominantemente dirigidas a PCR (Casamayor *et al.*, (2000).

El método para la determinación de organismos que comprenden una comunidad microbiana implica secuenciar los genes 16S de ARN ribosómico (ARNr 16S) a partir de muestras ambientales. Esto proporciona información sobre la variedad de especies, así como las relaciones evolutivas entre linajes (Baker y Banfield, 2003). Por otro lado, se requiere recuperar las bandas obtenidas en el gel, reamplificar y secuenciar para determinar las relaciones filogenéticas de las bacterias en estudio. La secuenciación de un fragmento DGGE requiere la elución del fragmento del Desnaturalizante y posterior reamplificación (Muyzer *et al.*, 1995).

4.5 Proceso de Biolixiviación del consorcio a diferentes pH

4.5.1 Caracterización del mineral

4.5.1.1 Tamizado de mineral

El mineral en estudio (polimetálico) una vez obtenido fue disminuido de tamaño, pulverizado y pasado por un molino de anillo “ESSA” en la escuela de ingeniería de mina de la universidad Nacional de Trujillo.

El procedimiento de tamizado del mineral polimetálico, el cual fue utilizado en los ensayos de biolixiviación, fue necesario primero reducir de tamaño al mineral inicial (rocas) utilizando una comba, seguido de ello se prosiguió al pulverizado, se homogenizó con el propósito de obtener una muestra más representativa, se pesó en una balanza y finalmente se tamizó con el fin de asegurar la distribución del tamaño de partícula aproximadamente en

75 μm utilizando mallas Tyler N° 200. Siendo el tamaño de partícula un factor fundamental en el proceso de biolixiviación, así como en la adaptación de los microorganismos al mineral (Mejía *et al.*, 2011). Debido a que facilitan la suspensión y la homogeneidad del contenido, en sistemas agitados que aún no son comerciales en biolixiviación de minerales, se requiere tamaños de partícula normalmente menores a 100 μm (Tapia, 2016).

4.5.1.2 Análisis de mineral

Se realizó un análisis químico de multielementos por espectrofotómetro de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) para cuantificar los elementos químicos de interés presentes en la muestra de mineral polimetálico, donde se encontró elementos como cobre, zinc, plata y hierro, tal como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Composición química del mineral en estudio.

ELEMENTO	PORCENTAJE
Cu	1.3
Zn	11
Fe	26
Ag	840/ TM



Figura 25. Mineral polimetálico utilizado en el estudio, conteniendo Cu, Zn, Fe, Ag, entre otros.

Los minerales peruanos se caracterizan por ser polimetálicos y complejos (Lovera *et al.*,2009) contienen principalmente valores recuperables de cobre y plata, dependiendo de la mineralogía del mineral (Pérez, 2008), por ello según los resultados del análisis de ICP-OES, el mineral en estudio (figura 25) muestra un contenido de cobre con una ley de 1.3 %.

4.5.2 Adaptación del consorcio al mineral y proceso de biolixiviación

Para iniciar la biolixiviación con el fin de evaluar el proceso a diferentes valores de pH, se adaptó el consorcio aislado al mineral progresivamente, los cuales se llevaron a cabo mediante subcultivos conteniendo cada uno de ellos un volumen de 200 mL en botellas de vidrio de 500 mL de capacidad.

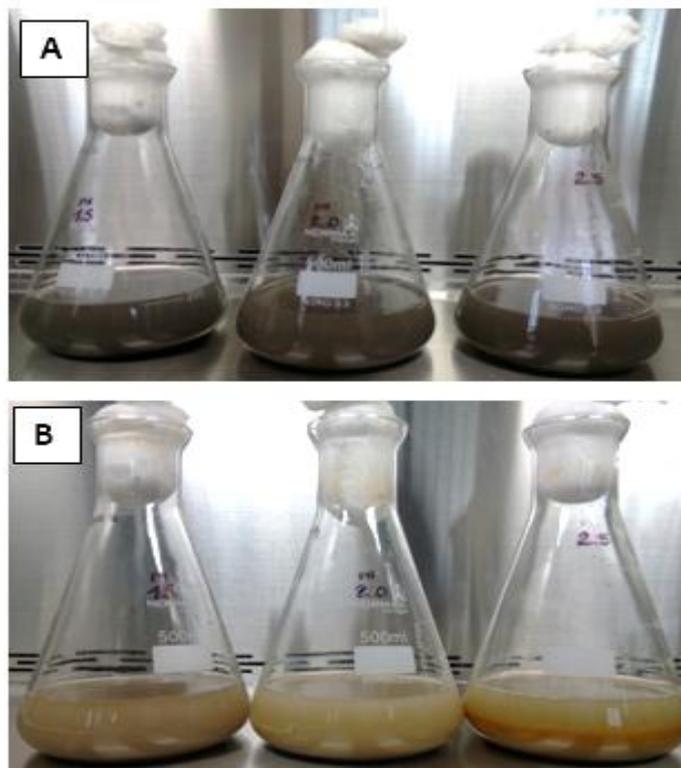


Figura 26. Proceso de adaptación del consorcio (a pH 1.5, 2.0 y 2.5) al 1 % de mineral en estudio. A) Inicio de adaptación del consorcio en medio 9K donde el hierro fue sustituido gradualmente por el mineral. B) Cultivos del consorcio a pH 1.5, 2.0 y 2.5 (respectivamente) adaptados al mineral (dos meses después).

El consorcio aislado de drenajes ácido de mina fue inicialmente adaptado al mineral antes del proceso de biolixiviación a diferentes pH, para el cual la densidad de pulpa se fue incrementando en cada subcultivo realizado, partiendo de una concentración inicial de 1, 2, 3, 4 y finalmente 5 %, así mismo se fue reduciendo la cantidad de hierro del medio de cultivo hasta un 0 %. La adaptación de microorganismos al mineral en estos procesos es un método que consiste en una serie de cultivos sucesivos en los cuales se disminuye la fuente de energía principal y se incrementa la densidad de pulpa, obligando de esta manera a los microorganismos a crecer a expensas de la disolución del mineral (Haghshenas *et al.*, 2009; Mejía *et al.*, 2011), esto debido a que los cultivos mesófilos expuestos a altas densidades de pulpa de concentrados de sulfuros metálicos resulta limitar el proceso biolixivante de las bacterias generando inhibición o disminución en su actividad (Cabrera *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2008).

Según Xia *et al.*, (2008) manifiesta que existe una diferencia significativa en el proceso de biolixiviación entre bacterias adaptadas y no adaptadas, la adaptación de bacterias *A. ferrooxidans* (realizado llevando a cabo subcultivos en medio 9K conteniendo hierro libre, incrementado la densidad de la pulpa de calcopirita de 1% a 5%) mostraron una mayor tolerancia al estrés de cizallamiento debido a la pared celular más fuerte que podría mantener una mayor actividad oxidante bajo una alta densidad de pulpa y alto vórtice. Además, hubo diferencias en la acumulación y distribución de cobre en bacterias adaptadas y no adaptadas al comienzo del crecimiento.

Por otro lado, el comportamiento en el pH fue muy estable para todos los ensayos (1.5, 2.0 y 2.5) en el proceso de adaptación, presentando un ligero incremento al inicio de todas las etapas, justificando la adaptación del microorganismo al mineral, el cual se estabiliza rápidamente (Bevilaqua *et al.*, 2002). Este comportamiento da indicios de una buena adaptación y actividad bacteriana.

4.5.3 Proceso de Biolixiviación

El proceso de biolixiviación de los cultivos (consorcio a pH 1.5, 2.0 y 2.5) se realizó por triplicado con sus respectivos controles negativos en botellas de

vidrio de 1000 mL, conteniendo 200 mL de medio 9K, 5% de mineral y 10% de inóculo en un agitador a 120 rpm y a temperatura ambiente por un periodo de 49 días en el laboratorio de ingeniera ambiental de la Universidad Privada del Norte.

Para la determinación del crecimiento microbiano de los cultivos conformados por el consorcio a diferentes valores de pH y sus respectivos controles, se realizó el conteo de microorganismos presentes con cámara de Neubauer cada 7 días durante 49 días de evaluación en el proceso de biolixiviación.

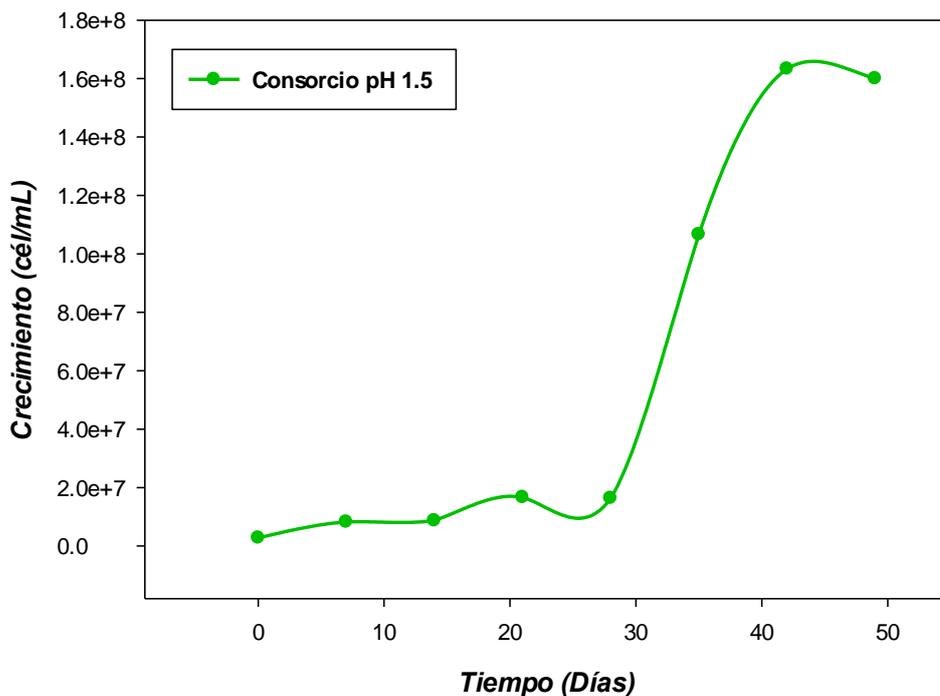


Figura 27. Crecimiento microbiano del consorcio a pH 1.5 durante el proceso de biolixiviación.

La Figura 27, muestra el crecimiento microbiano del consorcio nativo aislado de DAM y cultivado en medio líquido 9K-Fe + 5% de mineral a pH 1.5, temperatura ambiente y agitación a 120 rpm, con un recuento celular de $1,60 \times 10^7$ células/mL a los 49 días de evaluación.

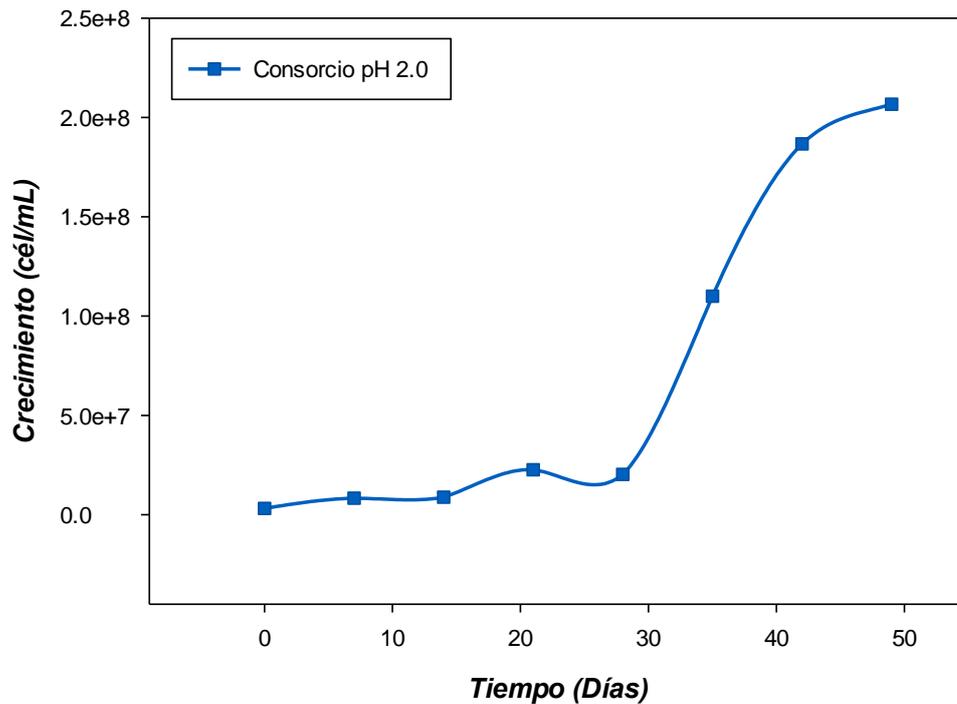


Figura 28. Crecimiento microbiano del consorcio a pH 2.0 durante el proceso de biolixiviación.

La Figura 28, muestra el crecimiento microbiano del consorcio nativo aislado de DAM y cultivado en medio líquido 9K-Fe + 5% de mineral a pH 2.0, temperatura ambiente y agitación a 120 rpm, con un recuento celular de $2,06 \times 10^7$ células/mL a los 49 días de evaluación, siendo este el mayor crecimiento durante el proceso, dicho crecimiento está descrito por un modelo de crecimiento exponencial. Se puede observar una mejor respuesta por parte del consorcio a pH 2.0.

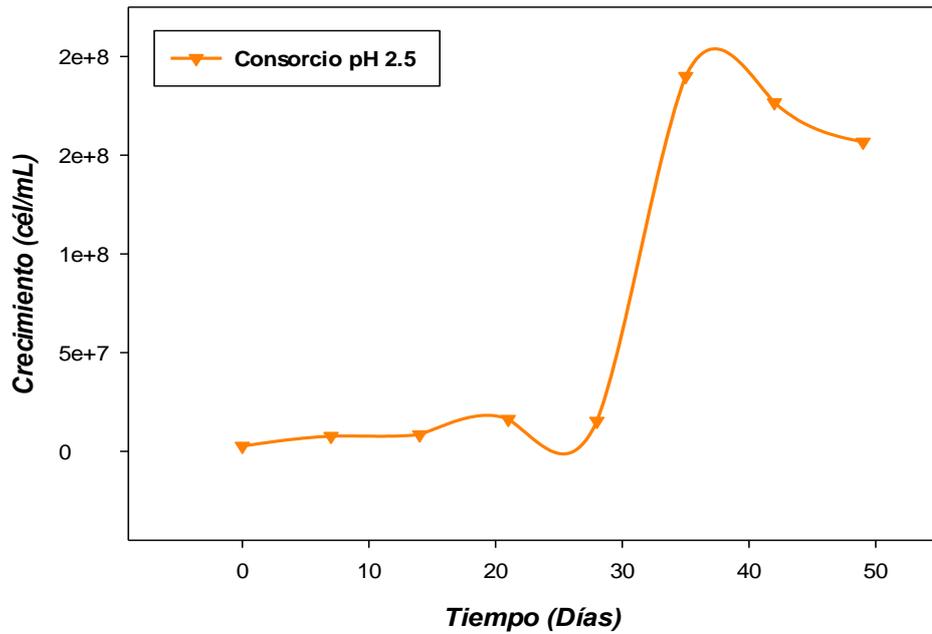


Figura 29. Crecimiento microbiano del consorcio a pH 2.5 durante el proceso de biolixiviación.

La Figura 29, muestra el crecimiento microbiano del consorcio nativo aislado de DAM y cultivado en medio líquido 9K-Fe + 5% de mineral a pH 2.5, temperatura ambiente y agitación a 120 rpm, con un recuento celular de $1,56 \times 10^7$ células/mL a los 49 días de evaluación, siendo este el menor crecimiento durante el proceso.

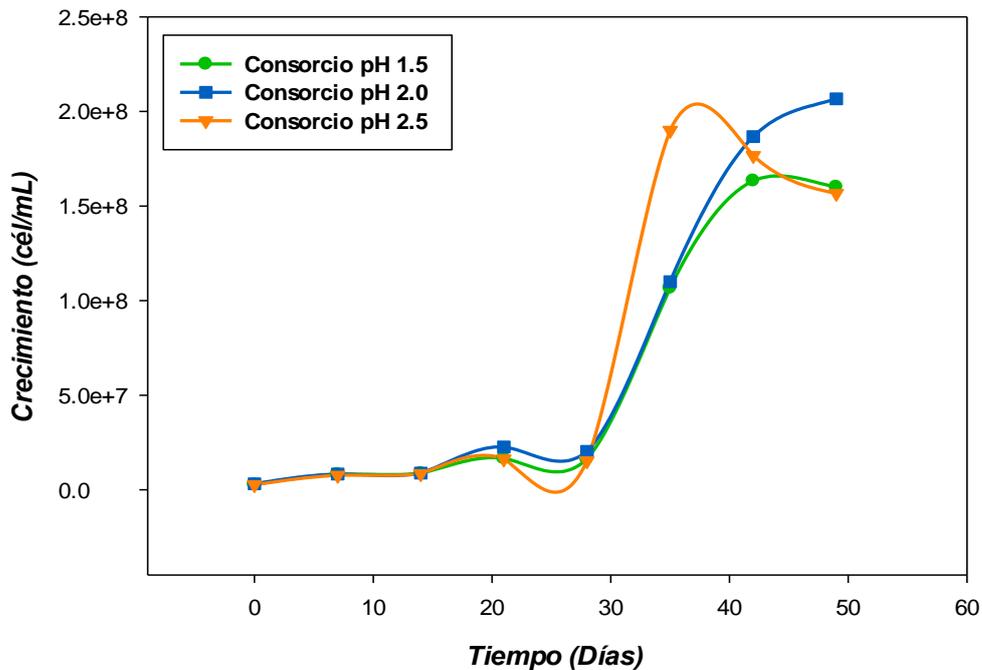


Figura 30. Comparación del crecimiento microbiano del consorcio nativo aislado de DAM a diferentes valores de pH (1.5, 2.0, 2.5) durante el proceso de biolixiviación en 49 días de evaluación.

La figura 30, muestra el crecimiento microbiano (cél/mL) durante el proceso de biolixiviación, donde se observa la comparación del crecimiento del consorcio a diferentes valores de pH, siendo los cultivos a pH 2.0 los que obtuvieron una biomasa de 2.06×10^7 células/mL hasta el día 49, mayor a los otros cultivos tanto a pH 1.5 con $1,60 \times 10^7$ células/mL como a pH 2.5 con $1,56 \times 10^7$ células/mL.

El crecimiento, actividad de los microorganismos y la comunidad microbiana se ven afectados por el pH del medio, el cual es un parámetro muy importante durante el proceso de biolixiviación (Yu, *et al.*, 2014). El pH en el sistema de biolixiviación cambia todo el tiempo, a veces alrededor de 1.0 hasta más de 3.0. Un entorno con pH extremadamente bajo (inferior a pH 0,8) inhibe la actividad microbiana, incluida la baja tasa de crecimiento, la baja actividad oxidativa y la baja tasa de lixiviación (Watling *et al.*, 2013). Por lo tanto, es necesario un pH adecuado para el crecimiento de los microorganismos.

4.5.4 Biooxidación de Fe⁺² durante la biolixiviación

A continuación, en la tabla N° 9, se muestra la comparación entre los tres grupos de estudio (pH 1.5, 2.0 y 2.5) a los 49 días de evaluación de la biooxidación de Hierro durante el proceso de biolixiviación.

Tabla 9. Promedio de las concentraciones (mg/L) de Fe total, Fe⁺² y Fe⁺³ en función del pH en los ensayos al final de la biolixiviación de Cu usando un consorcio microbiano aislado de DAM.

pH	Fe total	[Fe+2]	[Fe+3]
1.5	3586.4	970.3	2616.1
2.0	3577.2	557.8	3019.4
2.5	3607.2	1030	2577.2

Los microorganismos biolixivantes emplean el CO₂ atmosférico como fuente de carbono y obtienen energía mediante la oxidación de hierro ferroso (Fe⁺²) a hierro férrico (Fe⁺³), produciendo ácido sulfúrico y Fe⁺³ como subproductos de su metabolismo, dando lugar a la solubilización y lixiviación de metales pesados y preciosos a partir de minerales como pirita, calcopirita, arsenopirita entre otros (Tapia, 2016). Claro está que antes de que ocurra un proceso de biolixiviación tiene que ocurrir la biooxidación de hierro. La biooxidación de hierro es un proceso que ocurre antes de la biolixiviación, es un pretratamiento para la extracción de cobre, en este proceso ciertos microorganismos oxidan sulfuros. Por lo tanto, existe una correspondencia directa entre la biooxidación de hierro y la biolixiviación de cobre (Delgado y Castillo, 2015). Esto constata que en presencia de bacterias hay un transporte constante de electrones en sistemas de lixiviación, como *A. ferrooxidans*, cuya función principal es la transformación de Fe⁺² a Fe⁺³ (Kodali *et al.*, 2004) y mantener un alto potencial redox (Xia *et al.*, 2008).

La figura 31, muestra datos medidos de potencial redox (Eh), parámetro que influyó en la biooxidación de Hierro, en el tiempo que duró la biolixiviación del cobre.

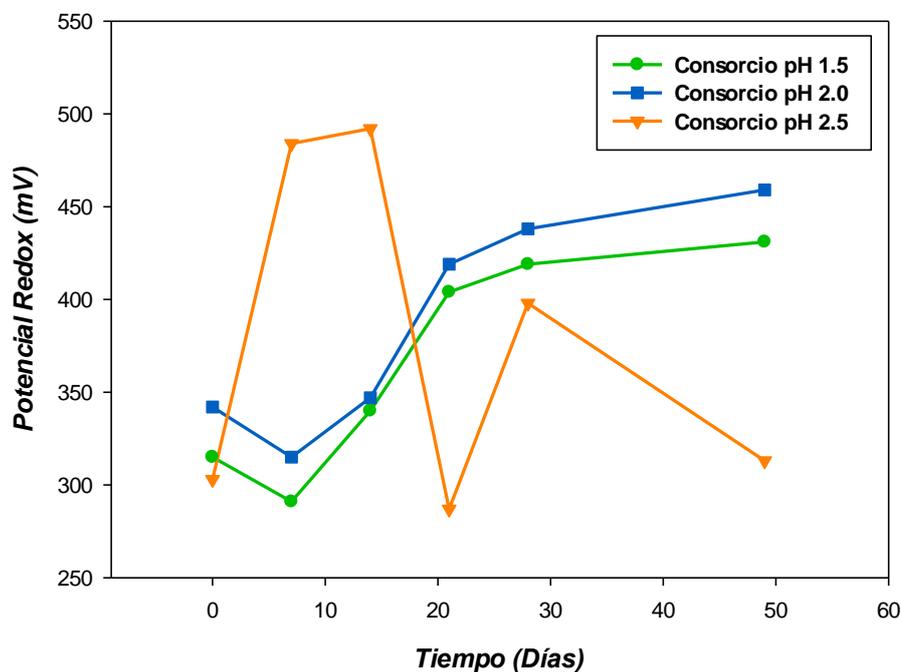


Figura 31. Curva de potencial Redox, medidos desde el inicio hasta el término de la biolixiviación.

Según los datos obtenidos nos muestra un aumento de Eh a partir del día 14 para el pH 1.5 y 2.0, indicios de una buena actividad oxidativa y de que las bacterias respondieron favorablemente a las etapas de adaptación, esto puede deberse a que los iones de hierro en solución no afectaron la actividad oxidativa de los microorganismos, debido a que en el proceso de disolución de minerales, el exceso de iones de hierro (aumento de la concentración de hierro férrico) tiene un efecto negativo en la velocidad de disolución de cobre (Zhou *et al.*, 2009).

Mientras tanto a pH 2.5 a los 7 días presentó un mayor aumento de Eh para luego decaer hasta el término del proceso de biolixiviación, indicando que la acumulación de iones de hierro si afectaron aparentemente la actividad oxidativa de los microorganismos, esto tendría relación con la presencia de

jarosita en los ensayos de biolixiviación a pH 2.5 (Figura 32). La jarosita son precipitados generados con pH mayores a 2 que se forma gradualmente por la continua oxidación de los microorganismos y recubre la superficie del mineral restante sin reaccionar, lo cual restringe la lixiviación del mineral de sulfuro. Por ello es importante una concentración adecuada de ion ferroso inicial, ya que favorece la disolución de sulfuros de cobre (Kaibin Fu *et al.*, 2014).



Figura 32. Repeticiones de los tratamientos del proceso de biolixiviación a pH 2.5, presentando jarosita formada por la continua biooxidación.

El potencial de óxido-reducción puede relacionarse con el crecimiento y la actividad bacteriana (Mejia *et al.*, 2011), tal como se evidenció en nuestros ensayos, donde a pH 2.0 se obtuvo mayor crecimiento microbiano, seguido del pH 1.5 y finalmente a pH 2.5 se obtuvo la menor tasa de crecimiento (figura 30). Otro aspecto importante es el pH, donde el aumento de este parámetro hace que la solubilidad de hierro decrezca (Sánchez *et al.*, 2011).

4.5.5 Determinación de Cobre durante el proceso de biolixiviación

Comparación entre los grupos de estudio: consorcio a pH 1.5, 2.0, 2.5 y sus respectivos controles en la determinación de Cobre total durante el proceso de biolixiviación.

Tabla 10. Concentración de Cu (mg/L) durante el proceso de biolixiviación.

GRUPOS	Concentración de Cu (mg/L)					
	0 días X ± S	7 días X ± S	14 días X ± S	21 días X ± S	28 días X ± S	49 días X ± S
Consorcio pH 1.5	0.767 ± 0.011	1.797 ± 0.006	5.381 ± 0.002	9.880 ± 0.437	100.886 ± 0.126	162.130 ± 0.582
Consorcio pH 2.0	0.387 ± 0.005	2.271 ± 0.012	6.333 ± 0.068	17.031 ± 0.577	112.359 ± 1.748	184.690 ± 5.853
Consorcio pH 2.5	0.659 ± 0.003	1.182 ± 0.006	3.214 ± 0.023	5.399 ± 0.127	62.379 ± 1.122	93.533 ± 1.381
Control pH 1.5	0.058 ± 0.006	0.060 ± 0.003	0.063 ± 0.002	0.067 ± 0.002	0.083 ± 0.003	0.068 ± 0.001
Control pH 2.0	0.061 ± 0.005	0.062 ± 0.062	0.069 ± 0.001	0.069 ± 0.003	0.085 ± 0.011	0.070 ± 0.003
Control pH 2.5	0.091 ± 0.005	0.093 ± 0.006	0.093 ± 0.005	0.094 ± 0.006	0.099 ± 0.004	0.095 ± 0.004

La tabla N°10 muestra los promedios y desviaciones estándar de la concentración de cobre total por efecto de la biolixiviación de cobre a partir de mineral polimetálico mediante el uso de un consorcio nativo aislado de DAM desde el día 0 hasta el día 49 de evaluación, en botellas de vidrio agitadas a 120rpm y a temperatura ambiente (21°C), calculados por el método de absorción atómica en solución ácida.

Tabla 11. Recuperación de Cu durante el proceso de biolixiviación en función del pH.

Días	Consorcio pH 1.5	Consorcio pH 2.0	Consorcio pH 2.5
	(% Cu Total)	(% Cu Total)	(% Cu Total)
0	0.12	0.06	0.10
7	0.28	0.35	0.07
14	0.83	0.97	0.49
21	1.52	2.62	0.83
28	15.52	17.29	9.60
49	24.94	28.41	14.39

La tabla N°11, nos muestra los porcentajes de recuperación de cobre del consorcio nativo aislado de DAM a pH 1.5, 2.0 y 2.5 durante los 49 días del proceso de biolixiviación, se puede observar que tanto el consorcio a pH 1.5 y 2.0 recuperan gran porcentaje de cobre total al termino del proceso, siendo el consorcio a pH 2.0 el que obtuvo la mayor recuperación de cobre (28.41).

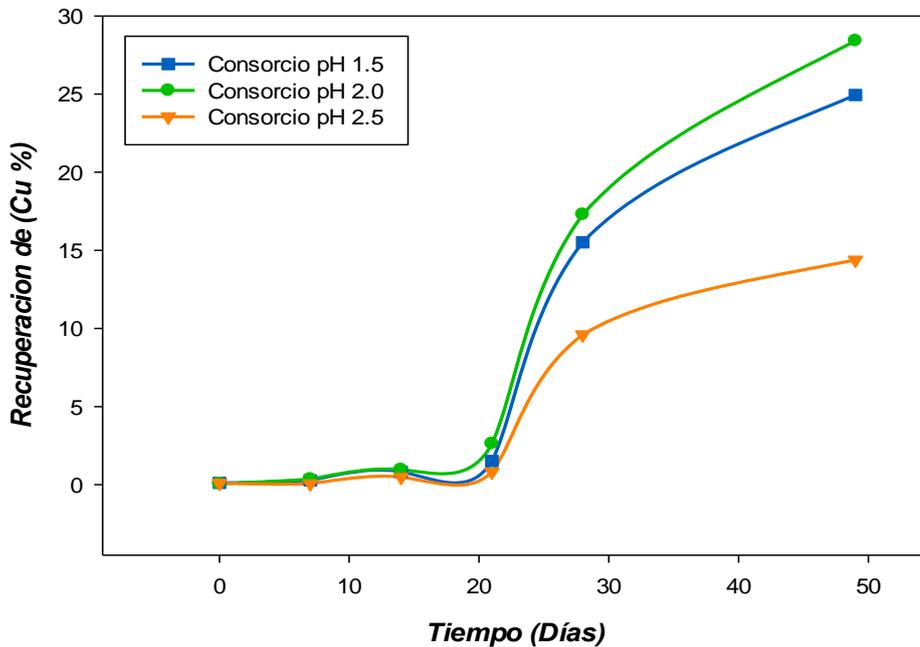


Figura 33. Curva de % de recuperación de Cobre durante el proceso de biolixiviación en función del pH (1.5, 2.0, 2.5).

La figura 33 muestra una curva del comportamiento del porcentaje de recuperación de Cu del mineral polimetálico. A partir del día 21 se aprecia que para los tres tratamientos hay una mayor recuperación y siendo el consorcio aislado de DAM a pH 2.0 el que obtuvo una mayor recuperación de Cu a los 49 días del proceso de biolixiviación seguido del pH 1.5 y 2.5, observándose así que los rendimientos de biolixiviación de cobre de los cultivos coincidían con su patrón de crecimiento respectivo (Akcil *et al.*, 2007).

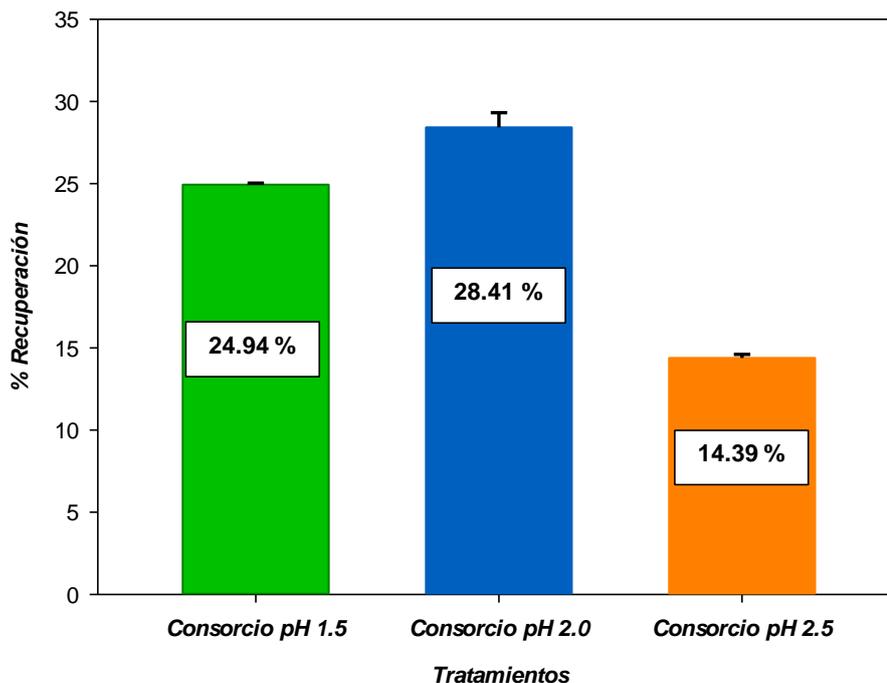


Figura 34. Comparación en la recuperación de cobre total (%Cu) entre los cultivos del consorcio nativo aislado de DAM a diferentes valores de pH (1.5, 2.0 y 2.5) durante 49 días de evaluación en el proceso de biolixiviación.

La figura 34, nos muestra la comparación de recuperación de Cu total (%) durante el proceso de biolixiviación de mineral polimetálico durante un periodo de evaluación de 49 días, se puede observar que el consorcio a pH 2.0 obtuvo un mayor valor de Cu (28.41 %) con respecto a pH 1.5 con un valor de Cu (24.94 %) y pH 2.5 que solo recuperó (14.39 % de Cu).

La concentración de sólidos, la temperatura, el oxígeno, el pH, el potencial de oxidación, la cepa bacteriana y la concentración celular son factores que juegan un papel importante en la optimización del proceso de biolixiviación (Liu *et al.*, 2008). Siendo el pH el parámetro individual más importante que influye en la solubilización de metales durante la biolixiviación (Sreekrishnan *et al.*, 1993). Así pues, MacDonald y Clark (1970) demostraron que la disminución del pH en el medio reduce la temperatura óptima para el crecimiento y oxidación de hierro por bacterias quimiolitotróficas; por ende, reduce el porcentaje de recuperación de cobre en el proceso de biolixiviación. Dong-Jim King *et al.*, (2008) evaluaron

el efecto del pH en el crecimiento y en la tasa de oxidación de hierro en el proceso de biolixiviación en un rango de 1.5, 1.75, 2.0, 2.25 y 2.5, donde la tasa de oxidación de hierro y recuperación de cobre fue mayor a pH 2.0, lo cual corrobora nuestros resultados obtenidos.

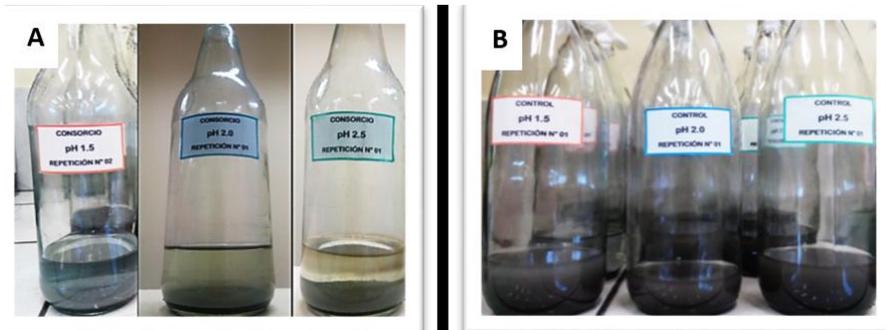


Figura 35. Ensayos de biolixiviación de cobre a pH 1.5, 2.0 y 2.5 (A) y sus respectivos controles negativos (B).

En la figura 35 se aprecia la comparación del consorcio aislado de DAM a diferentes pH (1.5, 2.0 y 2.5) (A) en los ensayos de biolixiviación de cobre y sus respectivos controles negativos (B), donde se observó un cambio de color debido a la recuperación de cobre por acción microbiana, mostrándose así que cultivos conformados por consorcios muestran mejores resultados que cultivos puros, tal como (*A. Ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* y *A. Thiooxidans*) mostraron mayor extracción de cobre (62.1% Cu) como consorcio que individualmente (Akcil *et al.*, 2007). Otro estudio se encontró que el consorcio integrado por *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* lixivía el 70% de cobre a partir calcopirita (Romo *et al.*, 2013).

4.6 Análisis estadístico

Prueba de homogeneidad o normalidad de la muestra

Los datos de los grupos se sometieron a un análisis mediante el programa estadístico IBM SPSS Statistics 23.0 para verificar si las muestras provienen de una población con distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk e indicar inicialmente:

- **Criterio para determinar Normalidad:**
 - **P-valor $\geq \alpha$ Aceptar H_0** = Los datos provienen de una distribución normal.
 - **P-valor $< \alpha$ Aceptar H_i** = Los datos no provienen de una distribución normal.
- **Prueba de Normalidad:**

Tabla 12. Pruebas de Normalidad

	PH	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CU-00	1,5	,369	3	.	,789	3	,089
	2	,175	3	.	1,000	3	1,000
	2,5	,314	3	.	,893	3	,363
CU-49	1,5	,314	3	.	,893	3	,363
	2	,368	3	.	,791	3	,093
	2,5	,182	3	.	,999	3	,936

La tabla muestra los resultados de la prueba Shapiro-Wilk, demostrando que el grupo de cobre (Cu) a los 0 días, en todos sus pH muestra un valor Sig. $\alpha > 0.05$, aceptamos H_0 , esto significa que la muestra proviene de una población con distribución normal.

Mientras que en el grupo de cobre (Cu) a los 49 días, en todos sus pH muestra un valor Sig. $\alpha > 0.05$, aceptamos H_0 , esto significa que la muestra proviene de una población con distribución normal.

Como los datos de los dos grupos tienen distribución normal, se puede realizar pruebas paramétricas para comparar las medias de ambas

muestras, entonces se procede a realizar el análisis descriptivo y la prueba paramétrica ANOVA de un factor.

Análisis descriptivo de las variables.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
pH 1.5	3	24,9433	,08505	,04910	24,7321	25,1546	24,88	25,04
pH 2.0	3	28,4167	,89891	,51898	26,1837	30,6497	27,38	28,98
pH 2.5	3	14,3900	,21517	,12423	13,8555	14,9245	14,18	14,61
Total	9	22,5833	6,34338	2,11446	17,7074	27,4593	14,18	28,98

Fuente: Elaboración propia. SPSS

La tabla permite observar los valores mínimo, máximo y mediano de la carga máxima expresada en miligramos (ml), determinándose que existe en efecto una alta dispersión dentro de cada grupo. Se observa además que en forma comparativa el pH 2 al día 49 siempre presentó valores medianos por encima del pH 1 y pH 2.5.

Análisis estadístico ANOVA de un factor

Tabla 13. Análisis de varianza de los datos obtenidos (recuperación de Cu) en los ensayos de biolixiviación.

ANOVA

Recuperación

Ensayos Biolixiviación	Suma de cuadrados	gL	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	320,184	2	160,092	557,445	,000
Dentro de grupos	1,723	6	,287		
Total	321,907	8			

La tabla N° 13 nos muestra la prueba de comparación de medidas repetidas para evaluar el efecto del pH en el proceso de biolixiviación de cobre a partir de un consorcio aislado de DAM. El estadístico de Fisher presenta un valor de $F=557,445$ el cual indica que existe cambio altamente significativo ($P<0,05$) entre los pH trabajados (1.5, 2.0 y 2.5) en la recuperación de Cobre durante los 49 días de evaluación.

Tabla 14. Análisis de la variación en las medias de los tratamientos de biolixiviación.

HSD Tukey^a

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
pH 2.5	3	14,3900		
pH 1.5	3		24,9433	
pH 2.0	3			28,4167
Sig.		1,000	1,000	1,000

En la tabla N°14, se muestra la prueba de Tukey, que indica la presencia de tres grupos (1.5, 2.0 y 2.5) siendo la prueba con el consorcio nativo aislado de DAM a pH 2.0 el que mostro un mayor porcentaje de recuperación de cobre total con un valor de 28. 4167, mientras que la prueba con el consorcio nativo aislado de DAM a pH 1.5 presento un valor de 24.9433 y la prueba con el consorcio nativo aislado de DAM a pH 2.5 presento un menor porcentaje de recuperación de cobre con un valor de 14.3900.

5. CONCLUSIONES

- Se elaboró una curva de crecimiento del consorcio microbiano aislado de drenajes ácidos de mina con la finalidad de registrar el comportamiento del consorcio microbiano para su posterior utilización en los ensayos de biolixiviación de Cobre.
- Se caracterizó microbiológicamente el consorcio microbiano aislado de drenajes ácidos de mina con ayuda de observaciones macroscópicas y microscópicas tanto en medio líquido y sólido 9K- Fe, los cuales nos mostraron características que son suficientes para la identificación presuntiva de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*.
- Se determinó la cantidad de Cobre y Hierro total en las soluciones de biolixiviación mediante espectroscopia por absorción atómica, utilizando llama aire-acetileno como combustible y lámparas de cátodo hueco de Cu y Fe a una longitud de onda de 324.8 y 248.3 respectivamente; donde la concentración de Cobre fue de 162.130, 184.690 y 93.533 mg/L y la concentración de Hierro fue 3586.4, 3577.2 y 3607.2 mg/L para los pH 1.5, 2.0 y 2.5 respectivamente.
- El consorcio aislado de DAM permitió determinar el efecto del pH en el % de recuperación de cobre, donde se mostró que el consorcio a pH 2.0 fue el que recupero un mayor porcentaje de Cobre total siendo un 28.42 %, en comparación con el pH 1.5 y 2.5 que recuperaron 24.94 % y 14.39 % respectivamente en 49 días de evaluación, contribuyendo así a la recuperación de uno de los metales de mayor interés económico en el país.
- El drenaje ácido de minas de la empresa minera Huinac S.A.C constituye una fuente de biodiversidad importante para ser valorizada biotecnológicamente, ya que los microorganismos aislados (consorcio DAM) realizan el proceso de biolixiviación de mineral polimetálico logrando recuperaciones de Cu, permitiendo ejecutar en Perú (Ancash) procesos biotecnológicos de extracción de cobre, a bajo costo y amigable al medio ambiente.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis mineralógico por Difracción de Rayos X para poder identificar y cuantificar que especies mineralógicas pudiera presentar el mineral de estudio.
- Optimizar los parámetros de cultivo como la temperatura y agitación para obtener una mayor recuperación de cobre total en un menor intervalo de tiempo.
- Re-amplificar y secuenciar el ADN recuperado de cada una de las bandas individuales obtenidas en electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización para la identificación de especies bacterianas del consorcio.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akcil, A., Ciftci, H., & Deveci, H. (2007). Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcopyrite concentrate. *Minerals Engineering*, 20(3), 310-318.
- Argota-Pérez, G., Argota-Coello, H., Rodríguez-Amado, J., & Fernández-Heredia, Á. (2013). Determinación de Cu, Zn, Pb y Cd por espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado en órganos de la especie *Gambusia punctata* (Poeciliidae). *Revista Cubana de Química*, 25(1).
- Baker B. J, Banfield J.F. (2003). Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 139-152.
- Bevilaqua, D., Leite, A., García, Jr O., Touvinen, O. (2002). Oxidation of Chalcopyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in shake flasks. *Process Biochemistry*, 38: 587-592.
- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology reviews*, 20(3-4), 591-604.
- Brierley, C. L., & Le Roux, N. W. (1978). Bacterial leaching. *CRC critical reviews in microbiology*, 6(3), 207-262.
- Brown, T. L., LeMay Jr, H. E., Bursten, B. E., & Burdge, J. R. (2004). *Química*. Pearson Educación.
- Cabrera, G., Gómez, J., Cantero, D. (2005). Kinetic study of ferrous sulphate oxidation of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metal ions. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 301-306.
- Casamayor, E. O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C., & Muyzer, G. (2000). Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), 499-508.

- Chen, S. Y., & Lin, J. G. (2001). Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of pH. *Chemosphere*, 44(5), 1093-1102.
- Clark, D. A., & Norris, P. R. (1996). *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov.: mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology*, 142(4), 785-790.
- Coll-Hurtado, A., Salazar, M. T. S., & Morales, J. (2002). *La minería en México*. UNAM.
- Corrales, L. C., Sánchez, L. C., León, A. S., Quintero, V. S., Díaz, J. Z., & Cortes, P. S. (2006). Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del Departamento de Boyaca. *Nova*, 4(5), 57-63.
- Cortez, F. (2012). Diseño y construcción de una planta de LIX-SX-TF-EW de mineral de cobre para la producción de 30 ton/mes de cátodos de cobre (tesis de pregrado). Universidad Jorge Basadre Grohmann, Tacna- Perú.
- Cotoras, D., & Viedma, P. (2011). A rapid and simple method for detecting active acidophilic microorganisms in copper bioleaching processes. In *Proceedings of the 6th International Seminar on Copper Hydrometallurgy*.
- Delgado Cruz, S. V., Castillo Cotrina D. (2015). Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante. *Revista Ciencia & Desarrolla*, 20: 59-64.
- Deveci, H., Akcil, A., & Alp, I. (2004). Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. *Hydrometallurgy*, 73(3), 293-303.
- Dew, D. W., Lawson, E. N., & Broadhurst, J. L. (1997). The BIOX® process for biooxidation of gold-bearing ores or concentrates. In *Biomining* (pp. 45-80). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Domínguez, J. C. P., & Cobos, O. F. H. (2008). Análisis termodinámico de especies cianuradas de oro, plata y cobre sometidas a cementación con zinc y aluminio. *Scientia et Technica*, 14(38), 155-160.

- Donoso, M. (2013). The copper market worldwide: trends, risks, characteristics and potential future growth. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*. 21(2), 2013, 248-261.
- Dopson, M., & Johnson, D. B. (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2620-2631.
- Edwards KJ, Bond PL, Gihring TM, Banfield JF (2000) An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. *Science* 287:1796–1799.
- Ehrlich HL. (2009) *Geomicrobiology*, 5th edn. CRC, Boca Raton.
- Escobar, B., Bustos, K., Morales, G., & Salazar, O. (2008). Rapid and specific detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* by PCR. *Hydrometallurgy*, 92(3-4), 102-106.
- Frattini C, Leduc L, Ferroni G. (2000). Strain variability and the effects of organic compounds on the growth of the chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77 (1), 57-64.
- Fu, K., Lin, H., Luo, D., Jiang, W., & Zeng, P. (2014). Comparison of bioleaching of copper sulphides by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *African Journal of Biotechnology*, 13(5).
- Goebel B, Stackebrandt E. (1994). Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl. Environ. Microbiol*, 60 (5), 1614-1621.
- Golyshina, O. V., Pivovarova, T. A., Karavaiko, G. I., Kondratéva, T. F., Moore, E. R., Abraham, W. R., ... & Golyshin, P. N. (2000). *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(3), 997-1006.

- Gurung A, Chakraborty R. (2009). The role of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in alleviating the inhibitory effect of thiosulfate on the growth of acidophilic *Acidiphilium* species isolated from acid mine drainage samples from Garubathan, India. *Can. J. Microbiol*, 55, 1040- 1048.
- Haghshenas, D. F., Alamdari, E. K., Bonakdarpour, B., Darvishi, D., & Nasernejad, B. (2009). Kinetics of sphalerite bioleaching by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy*, 99(3-4), 202-208.
- Hallberg K.B. (2010). New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy*, 104, 448 -453.
- Hedrich S, Schlömann M, Johnson DB (2011) The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology* 157:1551–1564.
- Ithoi I, Ahmad AF, Mak JW, Nissapatorn V, Lau YL, Mahmud R. (2011). Morphological characteristics of developmental stages of *Acanthamoeba* and *Naegleria* species before and after staining by various techniques. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 42(6),1327-38.
- Jiang Chengying, Liu Yanyang, Guo Xu and Liu Shuang-Jiang. (2009). Isolation and characterization of ferrous-and sulfur-oxidizing bacteria from Tengchong solfataric region, China. *Journal of Environmental Sciences*, 21,1247-1252.
- Johnson D. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27, 307-317.
- Johnson, D. B., Rolfe, S., Hallberg, K. B., & Iversen, E. (2001). Isolation and phylogenetic characterization of acidophilic microorganisms indigenous to acidic drainage waters at an abandoned Norwegian copper mine. *Environmental Microbiology*, 3(10), 630-637.
- Kelly DP, Wood AP (2000) Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera of *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:511–516.

- Kim, D. J., Pradhan, D., Park, K. H., Ahn, J. G., & Lee, S. W. (2008). Effect of pH and temperature on iron oxidation by mesophilic mixed iron oxidizing microflora. *Materials transactions*, 49(10), 2389-2393.
- Kodali, B., Rao, B., Narasu, L., Pogaku, R. 2004. Effect of biochemical reactions in enhancement of rate of leaching. *Chemical Engineering Science*, 59: 5069-5073.
- LarrainVial. (2012). *Minería en el Perú. Realidad y Espectativas*. Edit. El Comercio S.A. Lima. Perú.
- Lavalle L, Chiacchiarini P, Pogliani C and Donati E. (2005). Isolation and characterization of acidophilic bacteria from Patagonia, Argentina, 40, 1095-1099.
- Lovera, D., Bustamante, A., Quiñones, J., Arias, V., Puente, L., Terrel, M., & Concepción, L. Comportamiento de los iones metálicos lixiviados en la cementación del cobre. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalurgica y Geográfica*, 12(24), 26-32.
- Lundgren, D. G., & Silver, M. (1980). Ore leaching by bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 263-283.
- Lundgren, D. G., & Silver, M. (1980). Ore leaching by bacteria. *Annual reviews in microbiology*, 34(1), 263-283.
- Ma, L., Wang, X., Feng, X., Liang, Y., Xiao, Y., Hao, X., & Liu, X. (2017). Co-culture microorganisms with different initial proportions reveal the mechanism of chalcopyrite bioleaching coupling with microbial community succession. *Bioresource technology*, 223, 121-130.
- MacDonald, D. G., & Clark, R. H. (1970). The oxidation of aqueous ferrous sulphate by *Thiobacillus ferrooxidans*. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 48(6), 669-676.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2012). *A Brief Journey to the Microbial World*. MADIGAN, MT et al.–*Brock Biology of Microorganisms*. 13^a Ed. Benjamin Cummings, 24-46.

Mangels J, Cox M, Lindberg L. (1984). Methanol Fixation An Alternative to Heat Fixation of Smears Before Staining. *DIAGN MICROBIAL INFECT DIS*, 2, 129-137.

Mauri, A., Llobat, M., Herráez R. (2010). Laboratorio de análisis instrumental. Universitat de València - 304 páginas

Mejía, E., Ospina, J. D., Osorno, B. L., Márquez, M. A., & Morales, A. L. (2011). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1).

Ministerio de Energía y Minas (2017). Estadística de Producción Metálica.

Misari, F. (2016). BIOLIXIVIACIÓN Tecnología de la Lixiviación Bacteriana de Minerales. Lima, Perú: IAKOB Comunicadores y Editores S.A.C.

Munoz, J. A., Gonzalez, F., Ballester, A., & Blazquez, M. L. (1993). Bioleaching of a Spanish uranium ore. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(1-3), 109-119.

Muyzer G, De Waal E. C, Uitterlinden A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.

Muyzer G, De Waal EC (1994) Determination of the genetic diversity of microbial communities using DGGE analysis of PCR-amplified 16S rDNA. In: Stal LJ, Caumette P (eds) *Microbial mats, structure, development and environmental significance*, 207–214.

Muyzer G, Teske A, Wirsén C, Holger W. Jannasch. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments, *Arch Microbiol*, 164, 165–172.

Navarro C, Von Bernath D and Jerez C. (2013). Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: Importance for Biomining and Bioremediation. *Biol Res*, 46, 363-371.

Olson, G. J., Brierley, J. A., & Brierley, C. L. (2003). Bioleaching review part B. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 249-257.

Ortiz, A. (2012). Lixiviación Ácida de Minerales Oxidados de Cobre (Crisocola) con poca disolución de Fe al utilizar KHSO₄. (tesis de pregrado). Universidad Autónoma de México, México DF- México.

Osinergmin (2017). Reporte semestral de monitoreo del mercado de productos mineros. Gerencia de Políticas y Análisis Económico – GPAE.

Otero, J. (2009). Desarrollo de nuevos métodos de extracción en fase sólida para la preconcentración de metales traza en el agua de mar: evaluación de un soporte de C-18 y de polímeros de impronta iónica. Aplicación al estudio de la Ría de Arousa. Univ Santiago de Compostela.

Pérez, N. (2016). Aislamiento y determinación de bacterias biooxidantes del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* presentes en las aguas residuales de las unidades mineras de Recuay – Huaraz (tesis de pregrado), Lima- Perú.

Pizarro, J., Jedlicki, E., Orellana, O., Romero, J., y Espejo, R. (1996). Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(4), 1323-1328.

Pradhan N, Nathsarma K. C, Rao K. S, Sukla L. B, Mishra B. K. (2008). Heap bioleaching of chalcopyrite: a review. *Minerals Engineering*, 21(5), 355-365.

Quatrini, R., Lefimil, C., Veloso, F. A., Pedroso, I., Holmes, D. S., & Jedlicki, E. (2007). Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Nucleic acids research*, 35(7), 2153-2166.

Rawlings, D. E. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 65-91.

Rawlings, D. E., & Johnson, D. B. (2007). The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153(2), 315-324.

- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., & Muñoz, J. A. (2003). Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite, and sphalerite. *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 131-141.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., & Sand, W. (2003). Bioleaching review part A. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(3), 239-248.
- Romo, E., Weinacker, D. F., Zepeda, A. B., Figueroa, C. A., Chavez-Crooker, P., & Farias, J. G. (2013). Bacterial consortium for copper extraction from sulphide ore consisting mainly of chalcopyrite. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 523-528.
- Sánchez I, Rodríguez N, Amils R. y Sanz J.L. (2011). Microbial diversity in anaerobic sediments at río tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl. Environ. Microbiol*, 77 (17), 6085–6093.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P. G., & Schippers, A. (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 159-175.
- Sand, W., Rohde, K., Sobotke, B., & Zenneck, C. (1992). Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1), 85-92.
- Schippers, A., & Sand, W. (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied and environmental microbiology*, 65(1), 319-321.
- Sistema de Información Geográfica del Ministerio de Ambiente (SIGMINAN), Pasivos Ambientales Mineros 2012.
- Skoog, D. A. y Leary, James J. (1994). *Análisis Instrumental*, Armenia: McGraw-Hill, 84-481.
- Southam, G., & Beveridge, T. J. (1992). Enumeration of thiobacilli within pH-neutral and acidic mine tailings and their role in the development of secondary mineral soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1904-1912.

Sugio, T., Wakabayashi, M., Kanao, T., & Takeuchi, F. (2008). Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain D3-2 active in copper bioleaching from a copper mine in Chile. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(4), 998-1004.

Surco, M. (2012). Optimización del proceso de aglomeración y lixiviación en una planta de lixiviación de cobre (tesis de pregrado). Universidad Nacional De Ingeniería, Lima- Perú.

Tapia S. (2016). Biolixiviación de Cobre a partir de Calcopirita utilizando un consorcio nativo aislado del mineral comparado con una cepa *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 (tesis de pregrado). Universidad Católica de Santa María, Arequipa- Perú.

Tributsch, H. (2001). Direct versus indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 177-185.

U.S. Geological Survey, (2017). Mineral commodity summaries 2017: U.S. Geological Survey, 202 p., <https://doi.org/10.3133/70180197>.

Urbano, V. R., Guerrero, J., & Sáez, M. (2014). Biohidrometalurgia en la recuperación de valores metálicos. *Industrial Data*, 4(2), 007-010.

Walton, H. F., & Reyes, J. (1983). Análisis químico e instrumental moderno. Reverté.

Watling, H. R. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—a review. *Hydrometallurgy*, 84(1-2), 81-108.

Watling, H. R., Collinson, D. M., Shiers, D. W., Bryan, C. G., & Watkin, E. L. J. (2013). Effects of pH, temperature and solids loading on microbial community structure during batch culture on a polymetallic ore. *Minerals Engineering*, 48, 68-76.

Xia, L., Liu, X., Zeng, J., Yin, C., Gao, J., Liu, J., ..& Qiu, G. (2008). Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite. *Hydrometallurgy*, 92(3), 95-101.

Yates J, Colmes D. (1987). Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol*, 169(5), 1861-1871.

Yu, R., Shi, L., Gu, G., Zhou, D., You, L., Chen, M., & Zeng, W. (2014). The shift of microbial community under the adjustment of initial and processing pH during bioleaching of chalcopyrite concentrate by moderate thermophiles. *Bioresource technology*, 162, 300-307.

Yu, Y. A. N. G., Lin, Q. I. A. N., Shi, W. Y., Hong, P. E. N. G., ..& Qiu, G. Z. (2008). Isolation and characterization of acidophilic bacterium from Gaofeng Mine in China. *Transactions of nonferrous metals society of China*, 18(5), 1253-1257.

Zhou, H.B., Zeng, W.M., Yang, Z.F., Xie, Y.J., Qiu, G.Z. (2009). Bioleaching of chalcopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor. *Bioresour. Tech.* 100 (2), 515–520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.033>.

8. ANEXOS

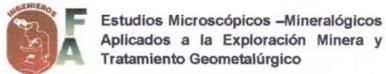
Anexo N°1

- Descripción de parámetros en los puntos de muestreo tomados de los drenajes ácidos de mina.

Punto de muestreo	Código	Parámetros			Descripción
		pH (unidad de pH)	Temperatura (°C)	Conductividad (ms/sm)	
Oro Negro (Quebrada Huinac)	PM1	2.64	5.5	4.38	E: 205176 ± 3 m N: 8927250 ± 3 m COTA: 4319 m.s.n.m ZONA: 18 L
Bocamina Nivel 5	PM2	2.51	5.2	6.15	E: 207378 ± 5 m N: 8927017 ± 5 m COTA: 4282 m.s.n.m ZONA: 18 L
Bocamina Nivel 6	PM3	2.68	5.0	6.90	E: 0205406 ± 3 m N: 8926889 COTA: 4232 m.s.n.m ZONA: 18 L
Bocamina Nivel 3	PM4	6.46	6.5	2.31	E: 0205425 m N: 8926478 m COTA: 4146 m.s.n.m ZONA: 18 L
Beta Esperanza Amapola	PM5	2.80	14	4.63	Muestra colectada al interior de un socavón de aproximadamente 1 km

Anexo 2

- Análisis químico de multielementos por ICP-OES, donde se identificó los 34 elementos químicos de la tabla periódica en la muestra de mineral polimetálico.



INFORME DE LABORATORIO

ANÁLISIS QUIMICO POR ICP OPTICO DE UNA MUESTRA DE ROCA.

PARA:

IVETH JOHANA DE LOS SANTOS VALVERDE

CSM-235-2015_Rev.0 / IL-OTSM-112-2015_Rev.0

Noviembre, 2015.



MSc. José Andrés Yparraguirre
CIP N° 128651
Gerente de Laboratorio



Ing. Fanny Blas Rodríguez
CIP N° 84066
Gerente General

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. METODOLOGÍA.....	3
III. INFORME TECNICO	3
IV. RESULTADOS DE ENSAYOS QUÍMICOS	5
a.- Análisis por ICP_OPTICO (34 elementos):.....	5
V. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	6



I. INTRODUCCIÓN

A solicitud de IVETH JOHANA DE LOS SANTOS VALVERDE, se ha realizado el Análisis Químico de multielementos por ICP-OES para identificar los 34 elementos químicos de la tabla periódica para una muestra.

La muestra fue recepcionado en nuestro Laboratorio. El muestreo fue realizado por el cliente, siendo este proceso el más importante ya que los resultados de los análisis dependen directamente del tipo de muestreo realizado.

II. METODOLOGÍA

El espectrofotómetro de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES).- Este instrumento permite realizar simultáneamente la determinación de 32 elementos: Ag, Pb, Cu, Zn, Fe, Mo, As, Al, Sb, Co, Mn, Cr, V, Ni...etc. en muestras de aguas, suelos, sedimentos y muestras solidas geoquímicas. La meta del ICP es hacer que los elementos emitan su onda específica de luz la cual puede ser medida. El hardware del ICP está diseñado para generar plasma, el cual es un gas en el que hay átomos presentes en estado ionizado.

Para asegurar el control de calidad en los análisis, las muestras son medidas acompañadas de blancos de reactivo, blancos de proceso, duplicados y material de referencia certificado.

III. INFORME TECNICO

Análisis:	MULTIELEMENTOS
Metodología:	ICP-OES
Tipo de Muestra:	ROCA
Número de Muestras:	1
Fecha de Recepción:	23/10/2015
Fecha Inicio:	24/10/2015
Fecha Fin:	11/11/2015

Tabla N° 1.- Metodología y condiciones de la muestra.



Límites de detección del ensayo químico por ICP-OES.

ID Muestras Lab	ELEMENTOS QUIMICOS										
Elemento	Al	Sb	As	S	Ba	Be*	Bi	Cd	Ca	Co	Cu
Unidad	%	ppm	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm	ppm
Límite Cuantificación Inferior	0.01	5	5	0.01	0.5	0.5	5	0.25	0.01	0.25	2.5
Límite Cuantificación Superior	5	2500	5000	15	5000	5000	500	5000	15	5000	10000

Tabla N° 2

ID Muestras Lab	ELEMENTOS QUIMICOS										
Elemento	Cr	Sc*	Sn	Sr	P	Ga*	Fe	Li	Mg	Mn	Hg*
Unidad	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm	%	ppm	ppm
Límite Cuantificación Inferior	0.5	0.25	5	0.1	50	0.5	0.01	1	0.01	0.5	5
Límite Cuantificación Superior	10000	2500	2500	10000	10000	5000	15	5000	15	10000	5000

Tabla N° 3

ID Muestras Lab	ELEMENTOS QUIMICOS											
Elemento	Mo	Ni	Ag	Pb	K	Se*	Na	Ti	Te*	Ti	V	Zn
Unidad	ppm	ppm	gr/tn	ppm	%	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Límite Cuantificación Inferior	0.25	0.25	0.23	2.5	0.01	10	0.01	5	5	10	2	1
Límite Cuantificación Superior	10000	5000	90	10000	15	2500	15	2500	2500	10000	10000	10000

Tabla N° 4

*Elementos sin alcance de acreditación

** Semicuantitativo

Partes por millón (ppm) es una unidad de medida con la que se evalúa la concentración. Se refiere a la cantidad de unidades de una determinada sustancia (agente, etc) que hay por cada millón de unidades del conjunto. Por ejemplo en un millón de granos de arroz, si se pintara uno de negro, este grano representaría una (1) parte por millón. Se abrevia como "ppm". 10,000ppm equivalen a 1%.

A continuación se detalla el Informe con los resultados de Ensayos Químicos de la muestra.

IV. RESULTADOS DE ENSAYOS QUÍMICOS

a.- Análisis por ICP_OPTICO (34 elementos):

ELEMENTOS QUÍMICOS																	
ID Muestras Lab	Al	Sb	As	S	Ba	Be*	Bi	Cd	Ca	Co	Cu	Cr	Sc*	Sn	Sr	P	Ga*
Elementos	%	ppm	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	%	ppm
Mineral de Hierro	0.02	1582	7960	>10	<1	<0.5	92	684	0.41	3	>1	10	<0.5	124.00	1.9	0.03	132

ELEMENTOS QUÍMICOS																	
ID Muestras Lab	Fe	La	Mg	Mn	Mo	Nb	Ni	Ag	Pb	K	Se*	Na	Tl	Te*	Ti	V	Zn
Elementos	%	ppm	%	ppm	ppm	ppm	ppm	gr/tn	ppm	%	ppm	%	ppm	ppm	%	ppm	%
Mineral de Hierro	>15	<0.5	0.1	4643	<1	<1	1	>90	>10000	0.02	<10	<0.01	4	33	<0.01	6	>1

*Elementos sin alcance de acreditación

Observación: Siguiendo el protocolo recogido en nuestro manual de calidad, FA INGENIEROS E.I.R.L., guardará bajo condiciones controladas la muestra durante un periodo determinado de 30 días calendario después de la finalización del análisis. Una vez transcurrido este periodo la muestra será eliminada. Si desea información adicional o cualquier aclaración, no dude en ponerse en contacto.



V. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

1. La muestra presenta altos contenidos de plata (Ag) que superan el límite de cuantificación >90gr/tn. Se recomienda realizar un análisis de absorción Atómica para conocer a detalle la cantidad exacta de plata contenida en la muestra.
2. La muestra presenta altos contenidos de cobre, Zinc y hierro que exceden el límite de cuantificación con un resultado >1% y >15%, por lo que se recomienda realizar un Análisis Volumétrico para determinar la cantidad exacta de dichos elementos químicos.
3. Se recomienda realizar Análisis Mineralógico por Difracción de Rayos X para poder identificar y cuantificar que especies minerales pudiera presentar la muestra.
4. Posiblemente exista minerales como arsenopirita (FeAsS), pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2) y cobres grises ($\text{Ag,Cu,Zn,Fe}_{12}(\text{As,Sb})_4\text{S}_{13}$) dentro del material enviado.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE MINERALES

CERTIFICADO DE ANÁLISIS QUÍMICO

Solicitado por
Tipo de muestra
Muestras recibidas
Asunto
Características y condiciones
Fecha de recepción

: Yessenia Sánchez Castrejón
 : Mineral
 : 01
 : Análisis químico
 : Bolsa sin lacrar
 : 31-01-2017

RESULTADOS

Método	ME-FA	ME ICP-OES					
Elemento	Au	Ag	As	Cu	Fe	Pb	Zn
Unidades	g/TM	g/TM	%	%	%	%	%
M-1	4.18	840.0	0.67	1.304	25.92	3.43	11.62

ME-FA: Método de ensayo – Fire Assay
 ME ICP PES: Método de ensayo - plasma acoplado inductivamente, Geología.
 g/TM (gramos por tonelada)

Fecha de emisión de reporte: Trujillo, 01 de febrero de 2017


Ing. Juan Vega González
 Jefe de Laboratorio
 CIP 79515



Ciudad Universitaria Av. Juan Pablo II S/N Urb. San Andrés Telf. 208295

- Datos de los ensayos de determinación de Cu y Fe durante el proceso de biolixiviación a pH 1.5, 2.0 y 2.5 y controles negativos.

LABORATORIO DE MINERALOGÍA DE LA UNIVERSIDAD PRIVADA DEL NORTE- CAJAMARCA

DATOS DEL CLIENTE/USUARIO

Usuario : Iveth De Los Santos Valverde/Yessenia Sánchez Castrejón
 N° RUC/DNI : 70525045/47460501
 Dirección : Urb. El Carmen
 Departamento/Provincia/Distrito: Ancash/Santa/Chimbote
 Persona de contacto : Iveth De Los Santos – Yessenia Sánchez
 Correo : ivethjoana22@gmail.com, stefany_2412@hotmail.com

DATOS DE LA MUESTRA

Fechas y hora de muestreo :

Fecha	Hora
19/09/2017	18:41
26/09/2017	16:54
03/10/2017	18:16
10/10/2017	18:30
17/10/2017	18:47
07/11/2017	17:01

Tipo de Muestreo : **Representativo**
 N° Muestras por fecha : **18 muestras por fecha**
 Ensayos Realizados : **Análisis por espectrofotometría**

Breve descripción del estado de la muestra :

Las muestras son tomadas de los ensayos realizado cumpliendo con cantidades mínimas de volumen para las pruebas.

Responsable de la toma de muestra :

Las muestras fueron tomadas por los tesisistas y con ayuda del encargado del laboratorio.

Procedencia de la muestra : **Ensayos de biolixiviación.**

DATOS DE MEDICIÓN DEL EQUIPO

Método	Fe (Llama)
Elemento-Matriz	Fe
Tipo de Instrumento	Llama
Unidades de Conc.	mg/L
Modo de instrumento	Absorbancia
Modo de muestreo	Manual
Modo de Calibración	Concentración
Modo de medida	Integración
Réplicas Patrones	3
Réplicas muestras	3
Factor de Expansión	1.0
Lectura Mínima	Desactivado
Suavizado	7 puntos
Cifras decimales	3
Longitud de onda	248.3 nm
Anchura de rendija	0.2 nm
Ganancia	65%
Corriente de Lámpara	5.0 mA
Posición de Lámpara	4
Corrección de fondo	Activado

Método	Cu (Llama)
Elemento-Matriz	Cu
Tipo de Instrumento	Llama
Unidades de Conc.	mg/L
Modo de instrumento	Absorbancia
Modo de muestreo	Manual
Modo de Calibración	Concentración
Modo de medida	Integración
Réplicas Patrones	3
Réplicas muestras	3
Factor de Expansión	1.0
Lectura Mínima	Desactivado
Suavizado	7 puntos
Cifras decimales	3
Longitud de onda	324.8 nm
Anchura de rendija	0.5 nm
Ganancia	38%
Corriente de Lámpara	4.0 nA
Posición de Lámpara	3
Corrección de fondo	Activado

DATOS DE MEDICIÓN DEL EQUIPO

19/09/2017				
Ensayos	Resultados de Cu		Resultados de Fe	
	Medición (mg/L)	LCM (mg/L)	Medición (mg/L)	LCM (mg/L)
M1	0.760	0.280	34.248	0.15
M2	0.761	0.280	35.765	0.15
M3	0.779	0.280	34.654	0.15
M4	0.392	0.280	35.523	0.15
M5	0.382	0.280	35.651	0.15
M6	0.387	0.280	34.559	0.15
M7	0.658	0.280	35.123	0.15
M8	0.657	0.280	35.756	0.15
M9	0.662	0.280	34.653	0.15
M10	0.053	0.280	33.987	0.15
M11	0.056	0.280	34.657	0.15
M12	0.065	0.280	34.108	0.15
M13	0.056	0.280	34.765	0.15
M14	0.066	0.280	33.984	0.15

M15	0.060	0.280	34.231	0.15
M16	0.097	0.280	33.891	0.15
M17	0.087	0.280	34.739	0.15
M18	0.090	0.280	34.509	0.15

26/09/2017				
Ensayos	Resultados Cu		Resultados Fe	
	Medición (mg/L)	LCM (mg/L)	Medición (mg/L)	LCM (mg/L)
M1	1.802	0.280	34.876	0.15
M2	1.790	0.280	33.789	0.15
M3	1.800	0.280	34.761	0.15
M4	2.271	0.280	35.178	0.15
M5	2.259	0.280	34.925	0.15
M6	2.282	0.280	34.026	0.15
M7	1.186	0.280	35.029	0.15
M8	1.175	0.280	35.873	0.15
M9	1.186	0.280	34.523	0.15
M10	0.058	0.280	33.657	0.15
M11	0.059	0.280	34.534	0.15
M12	0.063	0.280	33.723	0.15
M13	0.065	0.280	35.453	0.15
M14	0.062	0.280	35.534	0.15
M15	0.060	0.280	33.526	0.15
M16	0.099	0.280	35.856	0.15
M17	0.088	0.280	35.743	0.15
M18	0.092	0.280	35.684	0.15

03/10/2017				
Ensayos	Resultados de Cu		Resultados de Fe	
	Medición (mg/L)	LCM (mg/L)	Medición (mg/L)	LCM (mg/L)
M1	5.383	0.280	35.457	0.15
M2	5.379	0.280	35.873	0.15
M3	5.381	0.280	34.623	0.15
M4	6.269	0.280	35.634	0.15
M5	6.404	0.280	34.893	0.15
M6	6.325	0.280	35.765	0.15
M7	3.187	0.280	35.583	0.15
M8	3.223	0.280	35.874	0.15
M9	3.231	0.280	35.896	0.15

M10	0.061	3587.3
M11	0.065	3565.3
M12	0.063	3483.4
M13	0.068	3498.7
M14	0.070	3565.3
M15	0.069	3493.6
M16	0.098	3563.4
M17	0.089	3565.2
M18	0.092	3564.2

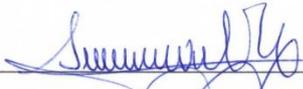
10/10/2017		
	Resultados de Cu	Resultados de Fe
Ensayos	Medición (mg/L)	Medición (mg/L)
M1	9.561	3596.4
M2	9.701	3647.3
M3	10.378	3597.8
M4	17.346	3675.3
M5	16.365	3687.0
M6	17.382	3586.9
M7	5.523	3576.4
M8	5.269	3587.9
M9	5.404	3678.4
M10	0.065	3698.2
M11	0.069	3585.7
M12	0.068	3534.6
M13	0.071	3478.4
M14	0.071	3576.4
M15	0.066	3687.3
M16	0.099	3553.4
M17	0.088	3546.9
M18	0.096	3587.3

17/10/2017		
	Resultados Cu	Resultados Fe
Ensayos	Medición (mg/L)	Medición (mg/L)
M1	100.742	3676.5
M2	100.974	3562.3
M3	100.942	3698.4
M4	114.002	3640.8
M5	110.523	3556.6

M6	112.553	3635.7
M7	63.420	3524.5
M8	61.191	3623.5
M9	62.526	3556.7
M10	0.080	3686.6
M11	0.086	3656.5
M12	0.083	3565.8
M13	0.094	3590.4
M14	0.088	3656.4
M15	0.072	3558.6
M16	0.095	3689.7
M17	0.099	3546.5
M18	0.102	3587.3

07/11/2017		
	Resultados Cu	Resultados Fe
Ensayos	Medición (mg/L)	Medición (mg/L)
M1	16.279 *	3540.7
M2	16.169 *	3608.9
M3	16.191 *	3609.6
M4	18.835 *	3537.5
M5	18.778 *	3509.3
M6	17.794 *	3684.5
M7	9.494 *	3576.4
M8	9.348 *	3687.9
M9	9.218 *	3557.4
M10	0.067	3634.8
M11	0.069	3678.4
M12	0.067	3576.5
M13	0.068	3534.7
M14	0.074	3548.7
M15	0.068	3672.5
M16	0.096	3664.5
M17	0.091	3594.5
M18	0.099	3647.6

*Muestra diluida (1/10)



Gladys S. Licapa Redolfo
ING. QUIMICO
R. CIP. 121969
Mg. Gladys Sandi Licapa Redolfo
Ingeniera Responsable de Laboratorio de Mineralogía
CIP: 121969

OBSERVACIONES

- LCM:** Límite de cuantificación del método.
- Los Resultados Químicos <LCM, significa que la concentración del analito es menor al LCM del Laboratorio establecido.
- Los Resultados son referenciales.

Cajamarca 09/12/2017

Anexo N° 03

Registro Fotográfico

- Diferentes puntos de muestreo de la empresa minera HUINAC S.A.C en departamento de Ancash.



Punto de muestra N° 01 "Oro Negro" Denominado: PM1



Observación del ambiente de muestreo.



Toma de muestra en frascos herméticos estériles.



Toma de apuntes del punto de muestreo, descripción del lugar.



Punto de muestra N° 02 "Bocamina nivel 5"
Denominado: PM2.



Observación del ambiente, aguas rojizas producto de la oxidación de mineral.



Toma de muestra de aguas ácidas de mina.



Entrada a un socavón donde se observa presencia de oxidación, punto de muestreo PM4.



Aguas ácidas de color rojizo al interior de un socavón punto de muestreo PM4 de donde se realizó una toma de muestra, visualización de biopelículas (imagen inferior).





Acumulación de sedimentos producto de la oxidación en drenaje ácido y toma de muestra a tres kilómetros de ingreso del socavón minero (punto de muestreo PM5).



Toma de muestra de aguas ácidas, Punto de muestreo PM3.

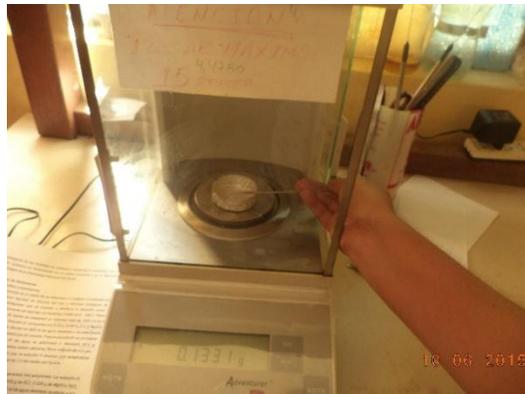


Análisis *in situ* de parámetros: pH, temperatura y Conductividad. Utilizando un multiparámetro.



Frascos de vidrio conteniendo las muestras tomadas de los DAM.

- Procedimiento de preparación de soluciones para el medio 9K enriquecido con Fe.



Pesado de los reactivos para la preparación de soluciones.



Sales esterilizadas para la solución "A" del medio 9K.



Solución "A" del medio 9K.



Matraces de enriquecimiento de muestras con el medio 9K.

- Preparación del medio sólido 9K- Fe.



Pesado de agarosa, para la solución B del medio sólido 9K- Fe.



Ebullición de agarosa para medio 9K-Fe sólido.

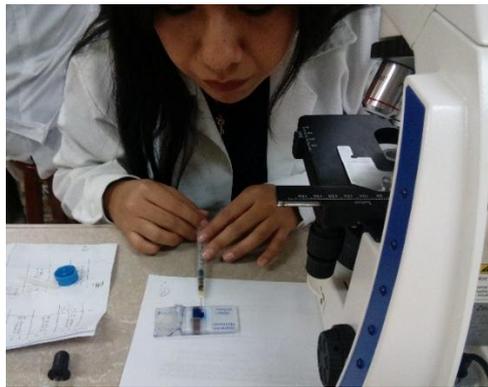


Placas con medio sólido 9K- Fe.

- Procedimientos para determinación de biomasa del consorcio.



Lectura de absorbancia en espectrofotómetro para determinar biomasa del consorcio.

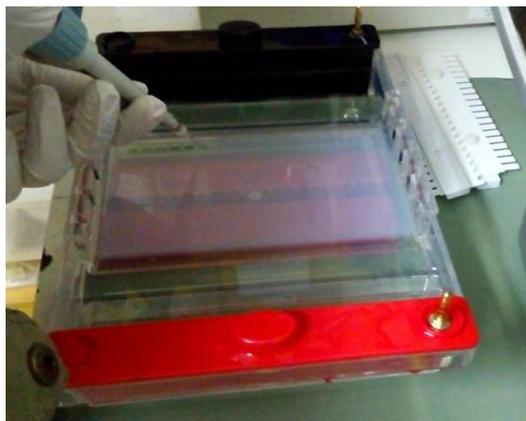


Preparación de muestra con tinción de azul de metileno en cámara de Neubauer para conteo de bacterias a través de microscopía.

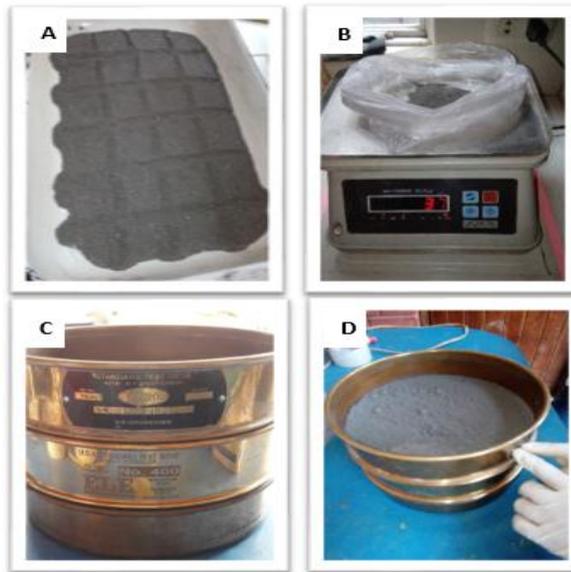
- Proceso de extracción de ADN y PCR.



Aislamiento de ADN según el protocolo del kit Power Soil DNA Isolation kit (MoBio). Agitación en vortéx (imagen izquierda) y adición de soluciones (imagen derecha). Cargado de muestras de productos amplificados de ADN (imagen inferior).



- Proceso de tamizado del mineral.



Tamizado del mineral. A) Cuarteada de mineral previamente pulverizado. B) Pesado de mineral. C) Preparación de mallas. D) Tamizado de mineral a través de mallas N° 200.

- Proceso de adaptación del consorcio al mineral.



Preparación del medio 9K a pH (1.5, 2.0, 2.5) acidificado con H_2SO_4 , utilizando filtros milipore de $0.2 \mu m$ para adicionar el Fe.



Inoculación y agregado de mineral para el proceso de adaptación bajo una cabina de seguridad.



Repeticiones de los ensayos en botellas de vidrio conteniendo medio 9K-Fe a pH (1.5, 2.0, 2.5) + mineral a 5% (w/v) y sus respectivos controles negativos.

- Proceso de biolixiviación del consorcio a diferentes pH.



Extracción de alícuotas para la medición de parámetros durante el proceso de biolixiviación



Medición del pH, temperatura y potencial redox en los ensayos de biolixiviación cada 7 días.

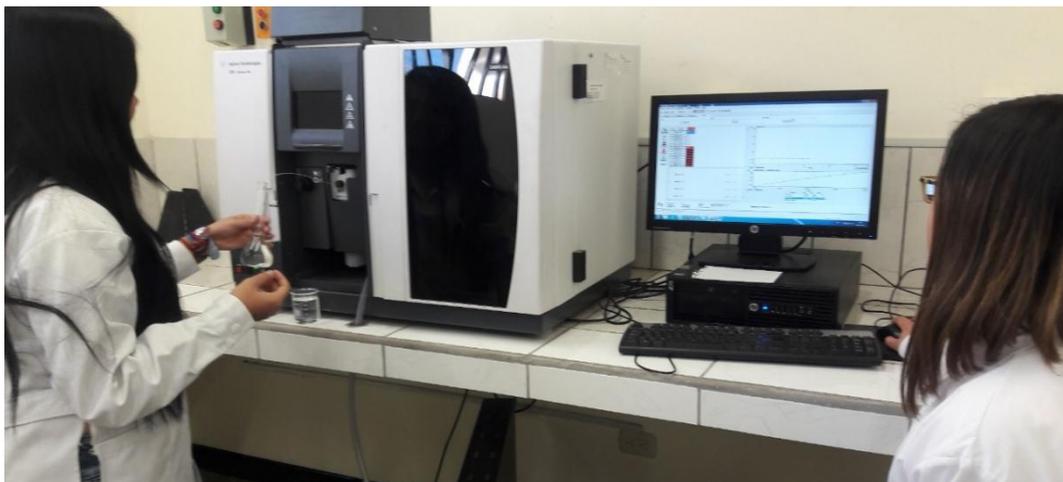
- Medición de Cu y Fe total en los ensayos de Biolixiviación.



Espectrofotómetro de absorción atómica (AAS) Agilent Serie 200.



Lámparas de cátodo hueco para Cu y Fe (posición 1 y 2 respectivamente).



Medición de Cu y Fe total en los ensayos de Biolixiviación en Espectrofotómetro de absorción atómica (AAS) Agilent Serie 200.

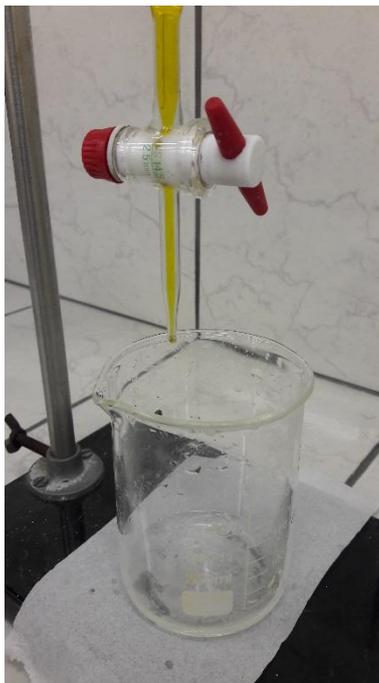
- Proceso de Biooxidación de Fe.



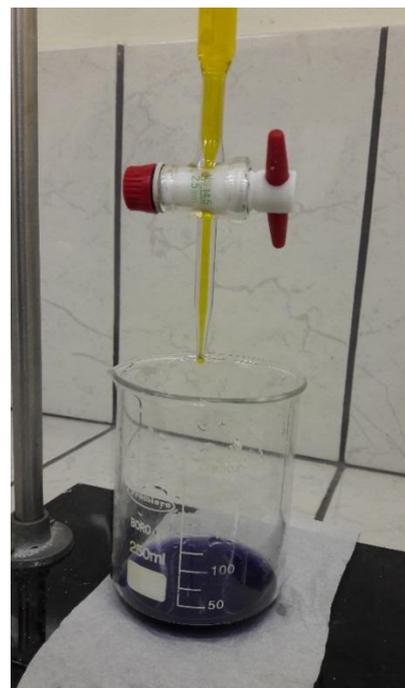
Balón de aire acetileno.



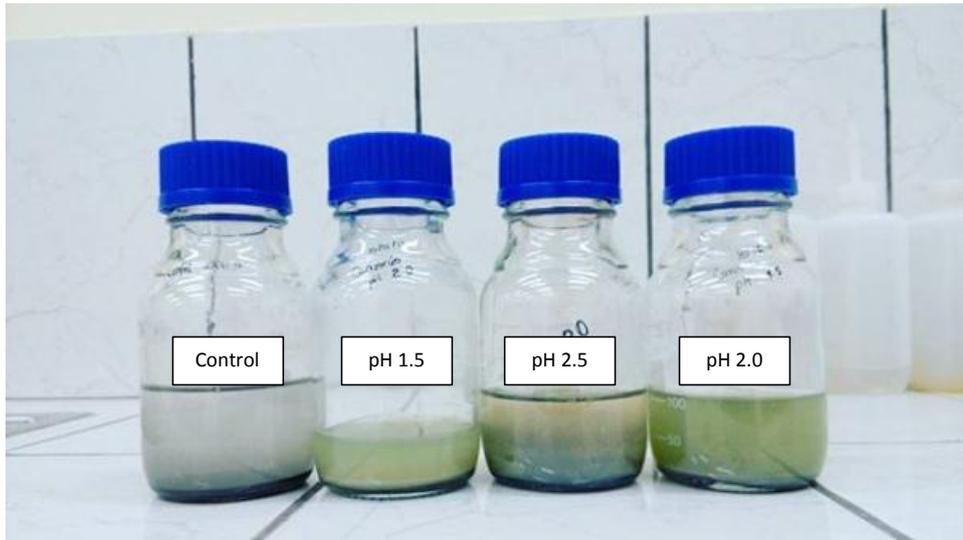
Ensayos de Biooxidación de Fe durante el proceso de Biolixiviación de Cu.



Muestra con solución extractiva y difenilamina acida antes de la titulación.



Titulación con dicromato de potasio 0.01 N



Soluciones de recuperación de Cu al final del proceso de Biolixiviación a diferentes valores de pH.

Anexo N°04

- Evaluación y registro de datos obtenidos

Tabla A. Crecimiento celular del consorcio DAM por turbidez y recuento en cámara de Neubauer durante 15 días.

DÍA	Crecimiento celular	
	DAM (nm)	DAM (cél/mL)
0	0.028	1.2 x 10 ⁶
3	0.031	1.6 x 10 ⁶
6	0.046	2.5 x 10 ⁶
9	0.058	2.4 x 10 ⁶
12	0.085	3.3 x 10 ⁶
15	0.072	2.21 x 10 ⁶

Tabla B. Recuento celular en cámara de Neubauer durante el proceso de biolixiviación a pH 1.5, 2.0 y 2.5.

SEMANA	CONTEO CELULAR (cél/mL)								
	1.5			2.0			2.5		
1°	2.8x10 ⁶	2.8x10 ⁶	2.6x10 ⁶	3.2x10 ⁶	3.3x10 ⁶	3.1x10 ⁶	2.4x10 ⁶	2.7x10 ⁶	2.9x10 ⁶
2°	8.4x10 ⁶	8.3x10 ⁶	8.0x10 ⁶	8.9x10 ⁶	8.4x10 ⁶	7.7x10 ⁶	7.1x10 ⁶	7.7x10 ⁶	8.2x10 ⁶
3°	8.6x10 ⁶	9.0x10 ⁶	8.5x10 ⁶	9.0x10 ⁶	8.6x10 ⁶	8.8x10 ⁶	7.8x10 ⁶	8.8x10 ⁶	8.8x10 ⁶
4°	1.7x10 ⁷	1.6x10 ⁷	1.7x10 ⁷	1.7x10 ⁷	2.4x10 ⁷	2.7x10 ⁷	1.6x10 ⁷	1.8x10 ⁷	2.5x10 ⁷
5°	1.4x10 ⁷	1.9x10 ⁷	1.6x10 ⁷	1.9x10 ⁷	2.1x10 ⁷	2.1x10 ⁷	1.9x10 ⁷	1.9x10 ⁷	2.7x10 ⁷
6°	1.1x10 ⁸	1.1x10 ⁸	1.0x10 ⁸	1.0x10 ⁸	1.2x10 ⁸	1.1x10 ⁸	1.7x10 ⁷	2.1x10 ⁷	1.9x10 ⁷
7°	1.4x10 ⁷	1.9x10 ⁷	1.6x10 ⁷	1.9x10 ⁷	2.1x10 ⁷	1.6x10 ⁷	1.9x10 ⁷	2.0x10 ⁷	2.1x10 ⁷
8°	1.6x10 ⁸	1.7x10 ⁸	1.5x10 ⁸	2.2x10 ⁸	2.1x10 ⁸	1.9x10 ⁸	1.4x10 ⁸	1.7x10 ⁸	1.6x10 ⁸

Tabla C. Potencial Redox (Eh) durante el proceso de biolixiviación en función del pH.

Días	Potencial Redox (mV)		
	pH 1.5	pH 2.0	pH 2.5
0	315	342	303
7	291	315	484
14	340	347	492
21	404	419	287
28	419	438	398
49	431	459	313

Tabla D. Concentración de Cobre y Hierro total en los controles negativos durante el proceso de biolixiviación.

Días	Control					
	pH 1.5		pH 2.0		pH 2.5	
	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)
0	0.058	3425.067	0.061	3432.667	0.091	3437.967
7	0.063	3397.133	0.061	3483.767	0.093	3576.100
14	0.063	3545.333	0.069	3519.200	0.093	3564.267
21	0.067	3606.167	0.069	3580.700	0.094	3562.533
28	0.083	3636.300	0.085	3601.800	0.099	3607.833
49	0.068	3629.900	0.070	3585.300	0.095	3635.533

Tabla E. Concentración de Cobre y Hierro total en los ensayos (consorcio a pH 1.5, 2.0 y 2.5) durante el proceso de Biolixiviación.

Días	Consorcio DAM					
	pH 1.5		pH 2.0		pH 2.5	
	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)	Cu (mg/L)	Fe (mg/L)
0	0.8	4812.2	0.4	3524.4	0.7	3517.7
7	1.8	3447.5	2.3	3471.0	0.4	3514.2
14	5.4	3531.8	6.3	3543.1	3.2	3578.4
21	9.9	3613.8	17.0	3649.7	5.4	3614.2
28	100.9	3645.7	112.4	3611.0	62.4	3568.2
49	162.1	3586.4	184.7	3577.1	93.5	3607.2

Tabla F. Datos de Cobre en la muestra de mineral polimetálico.

Muestra mineral usada (g)	Volumen de ensayo (mL)	Concentración de Cu en mineral (g/g)	Cantidad de Cu en mineral (g)	Concentración de Cu (mg/L)
10	200	1.30%	0.13	1300

Tabla G. Datos de Hierro en la muestra de mineral polimetálico.

Muestra mineral usada (g)	Volumen de ensayo (mL)	Concentración de Fe en mineral (g/g)	Cantidad de Fe en mineral (g)	Concentración de Fe (mg/L)
10	200	25.92%	2.592	25920

Anexo N° 05

- ❖ Tabla de soluciones y reactivos de la titulación con dicromato de potasio para pruebas de biooxidación de hierro.

Soluciones	Reactivos	
a) Solución extractiva	-H ₂ SO ₄ 98%	150 mL/L
	-H ₃ PO ₄ 88%	150 mL/L
	-Agua destilada	700 mL/L
b) Solución de Dicromato de potasio 0.01 N	-K ₂ Cr ₄ O ₇	4.4 g
	-Agua destilada	1000 mL
c) Solución de Difenilamina ácida 1%	-Difenilamina	1 g
	-H ₂ SO ₄ 98%	100 mL/L

Anexo N° 06

- Soluciones del Kit MoBio utilizado para aislamiento de ADN
 - Solución C1:** contiene SDS y otros agentes de interrupción necesarios para la lisis celular completa. Además de ayudar en la lisis celular, la SDS es un detergente aniónico que descompone los ácidos grasos y los lípidos asociados con la membrana celular de varios organismos.
 - Solución C2:** contiene un reactivo para precipitar material orgánico e inorgánico que no contiene ADN, incluidas sustancias húmicas, residuos celulares y proteínas. Es importante eliminar la materia orgánica e inorgánica contaminante que puede reducir la pureza del ADN e inhibir las aplicaciones de ADN posteriores.
 - Solución C3:** es un segundo reactivo para precipitar material orgánico e inorgánico no ADN adicional que incluye ácido húmico, residuos celulares y proteínas. Es importante eliminar la materia orgánica e inorgánica contaminante que puede reducir la pureza del ADN e inhibir las aplicaciones de ADN posteriores.
 - Solución C4:** es una solución salina de alta concentración. Dado que el ADN se une fuertemente a la sílice a altas concentraciones de sal, esto ajustará las concentraciones de sal de la solución de ADN para permitir la unión del ADN, pero no material orgánico e inorgánico que no esté en el ADN y que aún pueda estar presente en niveles bajos, a los Filtros Spin.
 - Solución C5:** es una solución de lavado a base de etanol que se utiliza para limpiar aún más el ADN que está unido a la membrana del filtro de sílice en el filtro giratorio. Esta solución de lavado elimina la sal residual, el ácido húmico y otros contaminantes al tiempo que permite que el ADN permanezca unido a la membrana de sílice.
 - Solución C6:** (tampón de elución estéril) se añade en el centro de la pequeña membrana blanca asegurando que toda la membrana se humedezca. Esto dará como resultado una liberación más eficiente y completa del ADN de la membrana de Spin Filter de sílice.