

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
BIOACUMULACIÓN DE PLOMO MEDIANTE UN
CONSORCIO BACTERIANO (*Acidithiobacillus sp.*) AISLADO
A PARTIR DE RELAVE MINERO.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

Yenny Fabián Poma

Estéfani Celina Polo Cabrera

ASESOR

Ms. Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos

Nuevo Chimbote, Perú

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA



EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
BIOACUMULACIÓN DE PLOMO MEDIANTE UN
CONSORCIO BACTERIANO (*Acidithiobacillus sp*) AISLADO
A PARTIR DE RELAVE MINERO.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

Yenny Fabián Poma

Estéfani Celina Polo Cabrera

Revisado y Aprobado por el Asesor:

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'José Villanueva Carlos', is positioned above a horizontal dotted line.

Ms.Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
BIOACUMULACIÓN DE PLOMO MEDIANTE UN
CONSORCIO BACTERIANO (*Acidithiobacillus sp*) AISLADO
A PARTIR DE RELAVE MINERO.

AUTORES

Bach. Yenny Fabián Poma

Bach. Estéfani Celina Polo Cabrera

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

.....
Ms.Sc. ÁNGEL CASTRO ALVARADO
Presidente

.....
Ms. BLGO JOSÉ VILLANUEVA CARLOS
Secretario

.....
Ms.Sc. BLGO. MCBLGO. ETERIO ALVA MUÑOZ
Integrante

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS(VIRTUAL)

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en . en la reunión de videoconferencia Vía Zoom Institucional UNS, siendo las 17:00 horas del día 08 Noviembre del 2021., dando cumplimiento a la Resolución, N° 131-2020-UNS-CFC Virtual se reunió el Jurado Evaluador presidido por, M. Sc. Ángel Castro Alvarado y teniendo como miembros a Ms. Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos (secretario) (a), y Ms Sc Eterio Alva Muñoz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA , realizado por el, (la), (los) tesista (as) Yenny Fabián Poma (Cód. 1223021), y Estefani Celina Polo Cabrera (Cód. 1223039), quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

"Efecto de la temperatura en la Bioacumulación de plomo mediante un consorcio bacteriano (*Acidithiobacillus sp*), aislado a partir de relave minero" , Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como . **Muy bueno** asignándole un calificativo de 17 diez y siete. puntos, (Art. 24° inc. a, b, c, d, e, f – Directiva N° 003-2020-UNS-VRAC: ADECUACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE GRADOS ACADÉMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES MEDIANTE TRABAJO NO PRESENCIAL VIRTUAL EN LA UNS).

Siendo las 18:00 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: Ms Sc. ÁNGEL CASTRO ALVARADO
Presidente



Nombre: Ms . BLGO.MCBLGO JOSÉ VILLANUEVA CARLOS
Secretario



Nombre: Ms Sc BLGO. MCBLGO. ETERIO ALVA MUÑOZ

Distribución: Integrantes J.E (03), tesistas (02) y archivo (02).



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Estefani Polo
Título del ejercicio: REVISION DE TESIS
Título de la entrega: EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA BIOACUMULACIÓN DE P...
Nombre del archivo: Informe_de_tesis_final.docx
Tamaño del archivo: 7.77M
Total páginas: 73
Total de palabras: 13,585
Total de caracteres: 74,026
Fecha de entrega: 30-oct.-2021 10:45a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 1688394898

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



EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA
BIOACUMULACIÓN DE PLOMO MEDIANTE UN
CONSORCIO BACTERIANO (*Acidithiobacillus sp.*) AISLADO
A PARTIR DE RELAVE MINERO.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA
AUTORES

Yenny Fabián Poma

Estéfani Colina Polo Cabrera



ASESOR

Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos

Nuevo Chimbote, Perú
2019

DEDICATORIA

A nuestros padres, por el apoyo incondicional al estar en el proceso de nuestro desarrollo profesional, a quienes estaremos siempre agradecidas y a nuestras familiares por el inmensurable cariño que nos brindaron cada día.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece en primera instancia a nuestro creador Dios, por estar presente en cada paso de nuestra existencia y en el desarrollo de nuestra tesis, encaminándonos por el buen camino y estando bendecidos por su gracia para cada decisión tomada en el desarrollo de la presente tesis.

Al Ing. Edilberto Tandaypan Romero y al Técnico Alexander Aliaga Villareal, por brindarnos el apoyo necesario, al realizar el muestreo de relaves mineros de la empresa minera Denword Holdings Perú Metal S.A.C, in situ en el departamento de Áncash, siendo posible gracias a su disposición, e interés en la investigación en biotecnología ambiental.

A nuestro co-asesor el Ing. Alejandro Padilla Sevillano por darnos la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Química de la Universidad Nacional de Trujillo y brindarnos el apoyo necesario en el desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

A nuestro asesor el Blgo. Mblgo. José Villanueva Carlos por su dedicación y esmero en la realización de nuestro trabajo de investigación.

Al colaborador del laboratorio de Investigación de la Universidad Nacional de Santa, André Ángeles Angulo por el apoyo en la ejecución de nuestro trabajo de investigación.

Y cada una de las personas que de alguna u otra manera contribuyeron en desempeño de este trabajo de investigación.

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE CONTENIDOS	iii
INDICE DE TABLAS	VII
ABREVIATURAS	X
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HIPÓTESIS.....	5
1.2. OBJETIVOS	5
1.2.1. <i>Objetivo general</i>	5
1.2.2. <i>Objetivos específicos</i>	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. CARACTERÍSTICAS, ALMACENAMIENTO, PRODUCTIVIDAD, Y UTILIDADES DEL PLOMO	6
2.1.1. Características físicas del plomo	6
2.1.2. Características químicas del plomo	6
2.1.3. Almacenamiento de plomo	8
2.1.4. Producción del Plomo	10
2.1.5. Utilidades del Plomo	11
2.2. BIOACUMULACION BACTERIANA	12
2.1.3. Generalidades.....	12
2.1.4. Bioacumulación.....	12
2.1.5. Microorganismos bioacumulantes	12
2.1.6. Mecanismos de bioacumulación	13
2.1.7. Temperatura.....	14
2.1.8. pH	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Aislamiento del consorcio bacteriano	16
3.1.1. Obtención del relave minero.....	16
3.1.1. Medio de cultivo liquido 9k enriquecido con el relave minero	17
3.1.2. Aislamiento del consorcio bacteriano	17

3.1.3.	Obtención del consorcio bacteriano	17
3.2.	<i>Caracterización microbiológica del consorcio bacteriano aislado a partir del relave minero</i>	18
3.2.1.	Tinción Gram	18
3.2.2.	Determinación cuantitativa del Consorcio Bacteriano	19
3.2.3.	Acondicionamiento del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas.....	20
3.3.	<i>Proceso de bioacumulación del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas</i>	21
3.3.1.	Relave minero	21
3.3.2.	Análisis del relave minero.....	21
3.3.3.	Acondicionamiento del consorcio bacteriano al proceso de bioacumulación del plomo.....	22
3.4.	<i>Caracterización molecular del consorcio bacteriano</i>	23
3.4.1.	Extracción de ADN total de bacterias presentes en el consorcio aislado	23
3.4.2.	Secuenciamiento del gen 16S ARNr de las bacterias presentes en consorcio aislado.....	23
3.4.3.	Secuenciación de ADN total de las bacterias presentes en el consorcio aislado	24
3.4.4.	Evaluación de la calidad de ADN metagenómico.....	24
3.5.	<i>Análisis estadístico</i>	24
4.	RESULTADO Y DISCUSIÓN	25
4.1.	<i>Aislamiento del consorcio bacteriano</i>	25
4.1.1.	Medio de cultivo líquido 9k enriquecido con el relave minero	25
4.1.2.	Aislamiento del consorcio bacteriano en medio sólido.....	26
4.1.3.	Obtención del consorcio bacteriano aislado de relave minero	27
4.2.	<i>Caracterización microbiológica del consorcio bacteriano</i>	28
4.2.1.	Tinción Gram	28
4.2.2.	Determinación de biomasa del Consorcio Bacteriano	29
4.2.3.	Acondicionamiento del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas.....	31
4.3.	<i>Proceso de bioacumulación del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas</i>	32
4.3.1.	Relave minero	32
4.3.2.	Análisis del relave minero	33
4.3.3.	Proceso de Bioacumulación	34
4.3.4.	Determinación de plomo en el proceso de bioacumulación	37

4.4.	<i>Caracterización molecular del consorcio bacteriano</i>	43
4.5.	<i>Análisis estadístico</i>	46
5.	CONCLUSIONES	50
6.	RECOMENDACIONES	51
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8.	ANEXOS	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen de inóculo empleado en la adaptación de los medios de cultivos.	22
Tabla 2. Características de la colonia y dimensiones celulares de los aislados quimiolitótrofos.	27
Tabla 3. Tipos de morfologías observadas de las cepas aisladas de diferentes tipos de mineral.	29
Tabla 4. Composición química del relave minero en estudio	33
Tabla 5. Concentración de Pb (mg/L) durante el proceso de bioacumulación a diferentes temperaturas	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reservas mundiales de plomo en toneladas métricas.	8
Figura 2. Produccion Nacional de Plomo por Regiones.....	9
Figura 3. Producción mundial de plomo.....	10
Figura 4. Distribuciones de la producción de plomo en Perú	11
Figura 5. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos.....	13
Figura 6. Comparación entre el mecanismo de adsorción bioacumulación.....	14
Figura 7. Ubicación de la empresa minera Denwood Holdings Perú Metals S.A. C	16
Figura 8. Recuento en cámara de Neubauer.	19
Figura 9. Fórmulas para recuento celular en cámara de Neubauer.	20
Figura 10. Esquema básico de un espectrómetro de.....	21
Figura 11. Evaluación cualitativa del medio 9k enriquecido con la muestra del relave.A: Quinto día del cultivo B: Décimo quinto día de haber sido sembrado. C: Décimo día de cultivo Control.	25
Figura 12. Crecimiento de colonias semicirculares de color amarillo claro y oscuros, en medio 9k tras 20 días de siembra	26
Figura 13. Comparación del crecimiento bacteriano en el tiempo. A: Décimo día de cultivo. B: Décimo quinto día de cultivo. C: Vigésimo día de cultivo.	27
Figura 14. Tinción Gram de una muestra del consorcio bacteriano aislado del relave minero en medio 9k, donde se observa a 100x bacilos.	28
Figura 15. Crecimiento del consorcio bacteriano resultante del conteo en cámara Neubauer cultivado en el medio 9K.....	30
Figura 16. Crecimiento microbiano medido mediante turbidez celular cultivado en el medio 9K.....	30
Figura 17. Adaptación del consorcio a diferentes temperaturas (ambiente, 30°C y 40°C).....	31
Figura 18. Sistema de filtración al vacío	32
Figura 19. Relave minero	33
Figura 20. Espectrofotometro de absorción atómica, Perkin Elmer 900 última generación -LASACI, Universidad Nacional de Trujillo.....	33
Figura 21. Crecimiento del consorcio bacteriano en una cámara de Neubauer a temperatura ambiente (21 °C) durante el proceso de bioacumulación, con una [Pb] inicial a 3.97 mg/mL.	34
Figura 22. Crecimiento del consorcio bacteriano en una cámara de Neubauer a una temperatura de 30°C durante el proceso de bioacumulacion con una [Pb] inicial a 3.97mg/mL.....	35

Figura 23. Crecimiento del consorcio bacteriano en una cámara de Neubauer a una temperatura de 40°C durante el proceso de bioacumulación con una [Pb] inicial a 3.97mg/mL.....	35
Figura 24. Comparación del crecimiento del consorcio bacteriano aislado de relave minero a diferentes valores de temperatura (ambiente (21 °C), 30 °C y 40°C) durante el proceso de bioacumulación en 30 días de evaluación, con una [Pb] inicial a 3.97 mg/mL.....	36
Figura 25. Proceso de bioacumulación a temperatura ambiente (21°C)	38
Figura 26. Proceso de bioacumulación de plomo a 30°C de temperatura.....	39
Figura 27. Proceso de bioacumulación de plomo a 40°C de temperatura.....	39
Figura 28. Comparación del proceso de bioacumulación de plomo (mg/mL) trabajado a diferentes valores de temperatura (ambiente, 30°C y 40 °C.....	40
Figura 29. Comportamiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero versus la concentración de plomo en el medio de cultivo 9K durante el proceso de bioacumulación a una temperatura ambiente (21 °C), con una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.	41
Figura 30. Comportamiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero versus la concentración de plomo en el medio de cultivo 9K durante el proceso de bioacumulación a una temperatura de 30 °C, con una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.	41
Figura 31. Comportamiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero Versus la concentración de plomo en el medio de cultivo 9K durante el proceso de bioacumulación a una temperatura de 40 °C, con una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.	42
Figura 32. Equipo de secuenciamiento de ADN bacteriano	43
Figura 33. 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 (C), A: Consorcio a bacteriano aislado de relave minero.....	44

ABREVIATURAS

pH: Potencial de hidrogeniones

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: medio 9K

CO₂: Dióxido de carbono

RESUMEN

El trabajo de investigación tiene por objetivo principal determinar el efecto de la temperatura en la bioacumulación de plomo mediante un consorcio bacteriano (*Acidithiobacillus sp*) aislado del mismo relave minero. La muestra fue obtenida de compañía minera Denwood Holdings Perú Metal S.A.C ubicado en el departamento de Áncash, para luego realizar los ensayos de bioacumulación.

Se aisló el consorcio bacteriano presente en el relave minero, enriquecido en un medio cultivo líquido 9K a un pH 2.1. Luego se realizaron ensayos microbiológicos mediante la tinción Gram y la adaptación del consorcio bacteriano en el medio 9K a diferentes temperaturas y con presencia del mineral de estudio. Posteriormente, se realizó el ensayo de bioacumulación, donde el consorcio bacteriano fue tratado a diferentes temperaturas 30 °C, 40 °C y temperatura ambiente (21 °C), con un pH 2.1, agitación a 150 rpm, para la bioacumulación de plomo por el consorcio bacteriano. Los resultados mostraron que el consorcio bacteriano a una temperatura de 30 °C fue el más óptimo en el proceso de bioacumulación, en comparación del consorcio trabajado a temperatura ambiente (21 °C) y 40 °C durante 30 días de evaluación. Finalmente se caracterizó molecularmente mediante extracción de ADN, amplificación del gen ARNr 16S, obteniendo tres diferentes especies de bacterias: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* y *Acidithiobacillus albertensis*.

PALABRAS CLAVE: Bioacumulación, metales pesados, plomo, temperatura, microbiología.

ABSTRACT

The main objective of the research work is to determine the effect of temperature on the bioaccumulation of lead by means of a bacterial consortium (*Acidithiobacillus sp*) isolated from the same mining tailings.

Subsequently, the bioaccumulation test was carried out, where the bacterial consortium was treated at different temperatures 30 °C, 40 °C and room temperature (21 °C), with a pH 2.1, stirring at 150 rpm, for the bioaccumulation of lead by the bacterial consortium. The results showed that the bacterial consortium at a temperature of 30 °C was the most optimal in the bioaccumulation process, compared to the consortium worked at room temperature (21 °C) and 40 °C during 30 days of evaluation. Finally, it was molecularly characterized by DNA extraction, amplification of the 16S rRNA gene, obtaining three different species of bacteria: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* and *Acidithiobacillus albertensis*.

KEY WORDS: Bioaccumulation, heavy metals, lead, temperature, microbiology.

1. INTRODUCCIÓN

La actividad minera en el Perú, es importante para la promoción de fuentes de empleo y para la economía del país, transformándose en una de las primeras fuentes de ingresos. El desarrollo de esta actividad está ocasionando el deterioro del litoral, a causa del vertido de relaves mineros (Johnson *et al.*, 2001). La explotación de metales pesados a pequeña, mediana y gran escala cuentan con yacimientos de relaves que aglomera residuos sólidos gruesos y/o finos que se desechan de las maniobras de separación y adquisición de los valores metálicos de uso (Espín *et al.*, 2017). El Perú tiene un rol muy importante en sector minero debido a su potencial geológico, siendo así el sector minero una de las fuentes económicas más fundamentales; sin embargo, el desarrollo de extracción de metales pesados sigue siendo tradicionales, la mayoría de las minerías utilizan la lixiviación convencional (química) para la obtención parcial de metales y de su tratamiento (Lannacone *et al.*, 2001).

Los residuos del proceso metalúrgico deben de ser reservados, mediante tecnologías ecológicas, sostenibles y viables, a fin de proteger el entorno, la salud y el medio ambiente de las personas (Reid, 2008). Pero los contenedores de los relaves tienen impactos ambientales en la fase sólida (los sólidos sedimentados en profundidad) y en fase acuosa (las aguas de salida del depósito de relaves).

Los relaves mineros son tóxicos para las corrientes de agua, por su bajo pH, la solubilidad de transición de los minerales Mn, Fe, Zn, Cd y Pb es de mayor cantidad, por ello las concentraciones de los metales son elevadas (Hallberg, 2010). A través del uso de microorganismos, conocida como biominería, la cual se ha desarrollado y expandido muy rápido, esto se ha transformado en una innovadora alternativa eficiente para recuperar diferentes metales existentes en los drenajes de minas: plomo, oro, cadmio, etc. (Johnson *et al.*, 2001).

Los relaves mineros están compuestos por diferentes metales pesados, encontrándose en mayor cantidad, Fe, Cu, Mn, Zn, Cr y Pb (Lannacone *et al.*, 2001). Encontrándose en estos relaves mineros diferentes microorganismos, que usan estos metales de diferentes maneras para su supervivencia, como la bioacumulación, siendo un proceso celular que mediante un sistema de transporte de membrana internaliza el metal presente en el entorno celular con gasto de energía, a través de un consumo energético de la enzima H⁺-ATPasa (Rodríguez *et al.*, 2001).

La mayoría de microorganismos que son utilizados para la bioacumulación de metales (calcopirita) son bacterias categorizadas como quimiolitotróficas, ante ello dichas bacterias solo necesitan de compuestos inorgánicos para su desarrollo y crecimiento. Ya sea de la atmosfera (medio ambiente) o del mineral a recuperar, las bacterias quimiolitotróficas obtienen los nutrientes necesarios de manera general (Bosecker, 1997). Se afirman que el sulfato ferroso es la fuente de energía que es sustituido por minerales que tienen hierro y/o azufre, y el aire como dióxido de carbono son la fuente de carbono como suministro en los procesos de bioacumulación. Silver y Lundren (1980)

La bioacumulación en los microorganismos bacterianos se realiza, a través del transporte de contaminantes a la célula y la acumulación de estos metales dentro de la célula, mediante dos etapas. En la primera, los iones de metales se unen en la superficie celular. Esta parte del proceso es metabólicamente pasiva y es idéntica al mecanismo de biosorción. Luego, los iones de metales son transportados a la célula. La segunda parte de este proceso es posible solo cuando las células son metabólicamente activas. Si se mantienen las condiciones adecuadas para el crecimiento de organismos en la segunda etapa, entonces aumenta la cantidad de biomasa (Zabochnicka-Świątek, M., & Krzywonos, M. 2014)

La bioacumulación microbiana se ha convertido en una alternativa ventajosa antes tecnologías pirometalúrgicas convencionales debido a una menor demanda en su inversión capital junto con los costos de operación. Determinándose como un proceso que no altera al medio ambiente, la cual se denomina un proceso más puro en la que no hay presencia de SO₂, y de fácil aplicación, ante ello puede ser aplicada en diferentes países que busquen alternativas de solución amigables con el medio ambiente.

La importancia de los efectos bacterianos en la eliminación de metales pesados es respaldada por muchos estudios Fein (2000) sugiere la incorporación de bacterias en modelos de interacción agua-rocas y transporte de contaminantes. Estos microorganismos responden al estrés por metales pesados por diferentes mecanismos como: bioacumulación, la reducción enzimática y la complicación. La bioacumulación puede ocurrir por biosorción independiente del metabolismo (pasivo) o por absorción intracelular dependiente del metabolismo (activa) (Ledin, 2000).

Se han realizado diversas investigaciones en bioacumulación de plomo por el mecanismo de adsorción, a nivel internacional utilizando bacterias mesófilas, termófilas moderadas, termófilas estrictas, hongos y consorcios microbianos obtenidos de relaves mineros (Xiang *et al.*, 2010). Los relaves mineros tienen una variación debido a su lugar de ubicación, extendiéndose así su pH, temperatura y concentración de oxígeno; dichos rangos varían significativamente en los microorganismos acidófilos (bacterias y/o hongos) las cuales poseen diferentes propiedades fisiológicas (Hallberg, 2010). Uno de los parámetros más cruciales en el proceso de recuperación y bioacumulación de metales pesados es el pH, donde regularmente es dominado por el incremento microbiano (Chen y Lin 2001).

De igual forma, en el país, no se han hecho investigaciones en bioacumulación de metales pesados como el plomo, debido a la escasa información emergente dentro del país, como alternativa utilizan la biolixiviación, en la cual las bacterias transportan los metales pesados, por la acción microbiana, los minerales de los drenajes de las mineras son extraídos en fase acuosa, mediante esta técnica se puede recuperar cierto porcentaje del mineral tratado, mientras que en la bioacumulación los metales pesados se quedan dentro de las bacterias, y así, se logra disminuir la cantidad de metales pesados libres en el ambiente. Se han encontrado diversos estudios de biolixiviación sobre la calcopirita (Delgado y Castillo, 2015) en donde la lixiviación microbiana se realizó con cepas nativas evaluando la solubilidad de Zn en base a ZnS (Saavedra, 2009).

Delgado y Castillo (2015) también determinaron el predominio de la temperatura ante el crecimiento microbiano y la biooxidación del hierro de la calcopirita por un consorcio microbiano; trabajando con muestras de escombreras con calcopirita procedentes de los botaderos de los contenedores de lixiviación de la empresa minera Southern Peru

Copper, realizando 4 tratamientos experimentales a 25, 40, 55 y 70 °C, determinando estadísticamente que la temperatura no tuvo influencia en el incremento de biomasa ni en la biooxidación del hierro de la calcopirita.

El trabajo de investigación realizado por Román (2017) consiste en buscar microorganismos acidófilos ferrooxidantes en muestras de mineral magnetita de Toquepala, en concentrado de pirita y agua de mina de Quiruvilca a diferentes temperaturas (4°C, 14-20°C, 28°C), utilizando técnicas para la adaptación e identificación de bacterias que viven en ambientes similares a las muestras. Entre los 17 microorganismos encontrados, los principales géneros fueron: *Acidithiobacillus sp.* y la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* como también levaduras.

A nivel regional Pérez (2016) tuvo como objetivo aislar y determinar bacterias del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* de relaves mineros, de la mina ubicada en Recuay – Huaraz, obteniendo una concentración bacteriana en el tratamiento 1 de 9.33E+06 cel/ml durante el proceso de enriquecimiento bacteriano en un medio de cultivo con pH 1.6, propio de microorganismos quimiolitotrófos presentes en el medio, en condiciones: agitación (150 rpm), temperatura (40°C) en presencia de oxígeno. En el microscopio se mostraron bacterias con morfología bacilar característicos de bacterias quimiolitotrofos

Dentro del ámbito provincial y local no se registran estudios sobre bioacumulación debido a la falta de promoción en la utilización de tecnologías nuevas con el uso de microorganismos.

Por esta razón, se ejecutará el trabajo de investigación respondiendo a la pregunta: ¿Cuál será el efecto de la temperatura en el proceso de bioacumulación de plomo mediante un consorcio bacteriano (*Acidithiobacillus sp*) aislado a partir de relave minero de la empresa minera Denwood Holdings Peru Metals S. A. C?

1.1. HIPÓTESIS

El consorcio bacteriano aislado de relaves mineros; de la empresa minera Denwood Holdings Peru Metals S. A. C. del departamento de Ancash, incubado a pH 2.1 y a diferentes temperaturas: ambiente, 30 °C y 40 °C, en el proceso de bioacumulación a una temperatura de 30 °C se producirá una mayor bioacumulación de plomo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la temperatura en el proceso de bioacumulación de plomo mediante un consorcio bacteriano (*Acidithiobacillus sp*) aislado a partir de relave minero.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar y seleccionar el consorcio bacteriano para el proceso de bioacumulación de plomo.
- Monitorear y evaluar y evaluó el desarrollo del consorcio bacteriano mediante pruebas microbiológicas.
- Secuenciar ARNr 16S como técnica para identificar las especies del consorcio bacteriano.
- Cuantificar la bioacumulación de plomo y la efectividad del consorcio bacteriano bioquímicamente en diferentes matraces agitados a temperatura ambiente, 30° C y 40° C.
- Determinar la temperatura óptima en la bioacumulación de plomo mediante un consorcio bacteriano.

2. MARCO TEÓRICO

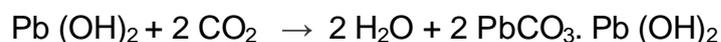
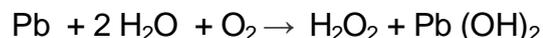
2.1. CARACTERÍSTICAS, ALMACENAMIENTO, PRODUCTIVIDAD, Y UTILIDADES DEL PLOMO

2.1.1. Características físicas del plomo

El plomo es un mineral con densidad mayor que el agua y con una gravedad específica de 11.4 a 16 °C), insípido, grisáceo, de aspecto brillante; al exponerse al aire se oxida, tornándose de color mate. Muy flexible y resistente a la corrosión, con pocas propiedades eléctricas, por estas razones, es muy utilizado en la metalurgia y la electricidad. Con número atómico 82, masa atómica 207.19 g mol⁻¹, densidad 11.4 g ml⁻¹, se funde a 327 °C y calienta a 1725 °C. Su fuente de extracción es de las galenas (sulfuro de plomo) elemento de mayor cantidad presente en el medio ambiente vinculado a diversos minerales de Zn y en otros minerales como el cobre, cadmio y hierro (MMARP, 2006).

2.1.2. Características químicas del plomo

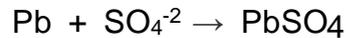
- Cuando el plomo se oxida, se convierte en óxido de plomo (Pb₂O), restándole el brillo metálico y a la vez cubriéndole de la corrosión.
- Al fundirse se forma PbO, llamado Massicot.
- El agua pura tiene menor efecto, pues no lo ataca, pero al tener bajas proporciones de anhídrido carbónico y oxígeno libre, hay siempre una reacción, este proceso es constante.



- En presencia de agua de lluvia y CO₂ del aire, el plomo obtiene una capa de carbonato hidratado, esta sal se diluye en el agua resultando tóxicas. Por ello, el agua de las lluvias que caen en techos cubiertos por superficies de plomo o materiales que contengan plomo no son aptas para el consumo humano. Por ellos, en la sierra y selva, se debe evitar el contacto plomo- aguacero.
- En el agua normal o libre de iones no ocurre esta reacción, pues contienen sulfatos libres, estos reaccionan con el plomo, formando sulfato de plomo, que es insoluble

y evita el plomo ulterior, pero en aguas pobres de sulfatos y ricas en dióxido de carbono, es factible que se puedan producir reacciones químicas.

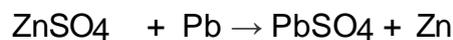
- El resultado del sulfato con el plomo es el siguiente:



- El ácido sulfúrico diluido no causa efecto, pero concentrado y caliente resulta sulfato de plomo II.
- El ácido clorhídrico frío no reacciona, pero en mayor cantidad daña al plomo.
- El ácido nítrico frío lo diluye obteniéndose nitrato de plomo II y gases nitrosos, muy tóxicos.



- Las sales de plomo reaccionan con el zinc, resultando el sulfato de plomo II, compuesto esponjoso que se conoce como árbol de Saturno, pues el plomo tiene una disolución menor que el cinc.



Cuando el aire caliente tiene contacto con el plomo, se obtiene el litargirio.
(Ubillus, 2003)



- De esto se desencadena su toxicidad para los seres vivos, encontrándose límites máximos permisibles de plomo el agua potable de, 0,05 mg/L, agua marina y estuarios: 0,01 mg/L, agua de cultivo: 0,05 mg/L y en agua para uso ganadero: 0,05 mg/L

2.1.3. Almacenamiento de plomo

2.1.3.1. Almacenamiento mundial de Plomo

En el 2018, Australia era uno de los países con mayores reservas de plomo de aproximadamente 24 millones de toneladas métricas, sobre otros países como China o Rusia. (Sevilla, 2019)

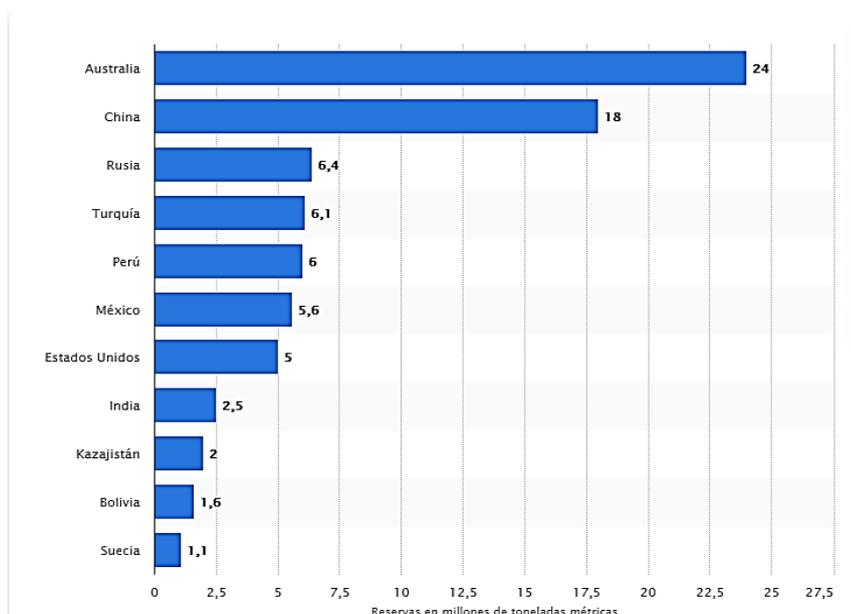


Figura 1. *Reservas mundiales de plomo en toneladas métricas.*

2.1.3.2. Almacenamiento nacional de Plomo

La producción nacional de plomo en el 2018 registró un volumen de 289,195 TMF, representando una disminución de 5.7% con respecto al año 2017. Sin embargo, el Perú subió de lugar, ubicándose en tercer puesto como productor mundial de plomo con un aporte del 6.5% del total producido, permitiendo al Perú ocupar el primer lugar en Latinoamérica. Mientras China y Australia se ubicaron en primer y segundo lugar en la producción mundial de plomo logrando el 47.5% y 10.2%, respectivamente. (Francisco I, 2018)

En el Perú, Pasco tiene el primer puesto, con una producción 92,642 TMF de plomo, registrando 32.0% de la producción nacional de plomo del 2018. Sin embargo, la producción de Pasco se vio reducida en 2.4% con respecto a la producción del año 2017, debido a una disminución de la extracción en los yacimientos mineros Acumulación

Animón y Atacocha durante el segundo y cuarto trimestre del 2018. En segundo y tercer puesto se encuentran los departamentos de Lima y Junín con una participación del 17.5% (50,470 TMF) y 15.7% (45,491 TMF) de la producción nacional de plomo, respectivamente. (Francisco I, 2018).

La Minera Buenaventura S.A.A. obtuvo una alta producción de plomo en el 2018, ocupando el primer lugar con una participación del 9.4% (27,326 TMF) del total producido, debido al buen desempeño de su unidad minera "Julcani", luego tenemos a la Compañía Minera Chungar S.A.C. con una participación del 8.6% (24,974 TMF) de la producción, descendiendo una posición con respecto al año 2017 debido a la obtención de minerales de baja calidad en la unidad minera "Islay". Por último, tenemos a la Sociedad Minera El Brocal S.A.A. con una participación del 8.3% (24,096 TMF) del total producido, obteniendo un incremento del 0.7% con respecto al año pasado debido al buen desempeño de la unidad minera "Colquijirca" (Francisco I, 2018)

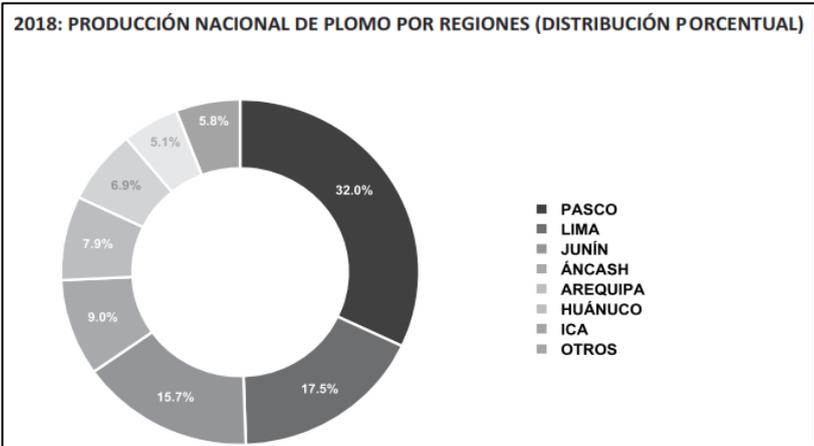


Figura 2. *Producción Nacional de Plomo por Regiones*

2.1.4. Productividad del Plomo

En los últimos años, el empleo mundial de plomo aumento en 82%, hasta llegar a los 11.7 millones de TM, por el aumento de la producción y la recuperación de este metal. Este incremento se debe al mayor uso de plomo en China, promovido por el impulso industrial y la mayor producción de vehículos, incrementando su economía (Energía, 2020).

2.1.4.1. Productividad mundial de Plomo

La producción de plomo a nivel mundial está encabezada por China, seguido por Australia y Perú, que está en el tercer lugar. Sin embargo, durante el 2000 y el 2018 su producción creció en 38%, al pasar de 3.2 millones a 4.4 millones de TM. Debido a la mayor demanda de plomo para baterías, vehículos y otros usos, sobre todo en China. (Energía, 2020)

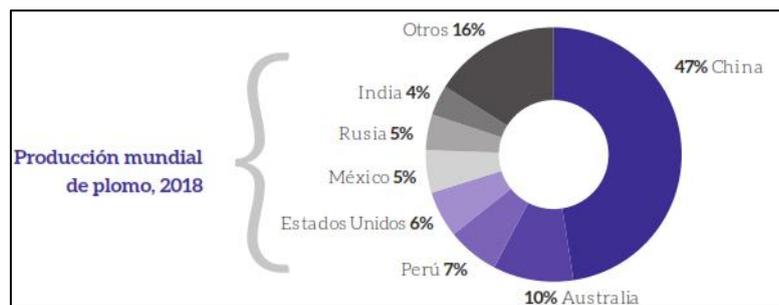


Figura 3. Producción mundial de plomo

2.1.4.2. Productividad nacional de Plomo

Al termino de los 20 años, las fabricas peruanas de plomo aumentaron hasta llegar a su tope en el 2008, con 345 mil TM. Después se disminuyó hasta llegar a los 300 mil TM. En el 2018, las primeras fabricas que producen plomo en el país son Volcan* (con el 17% del total producido), Buenaventura (9%), El Brocal (8%), Raura (7%) y Nexa El Porvenir (6%). Principales regiones productoras de plomo en el Perú, Pasco, Lima y Junín presentaron el 65% de la fabricación nacional de plomo en el 2018. (Energía, 2020)

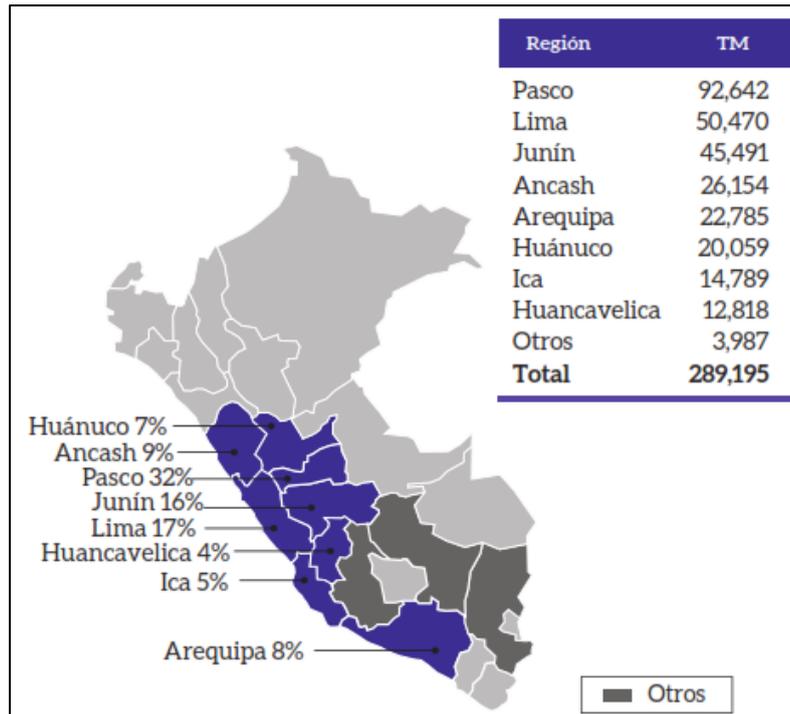


Figura 4. *Distribuciones de la producción de plomo en Perú*

2.1.5. Utilidades del Plomo

El plomo se usa para la elaboración de baterías de autos. Pues tienen placas de plomo que, al actuar con ácido sulfúrico, transforma la energía química en eléctrica. Es empleado en materiales de construcción y soldadura, armamento y colorantes artificiales, etc. El sector químico lo emplea en la fabricación y el manejo de compuestos como el ácido sulfúrico y el ácido nítrico por su resistencia a la corrosión. Por su máximo espesor, cubre algunas radiaciones. En la medicina se emplea en rayos X, y en infraestructuras nucleares (Energía, 2020)

2.2. BIOACUMULACION BACTERIANA

2.1.3. Generalidades

Bioteología es una rama multidisciplinaria, la cual ha ido creciendo con el pasar de los años, hoy en día la biotecnología continua en desarrollo con los avances de otras ciencias, con una mayor presencia en uso de técnicas microbiológicas y de biología molecular, las cuales nos permiten aislar e identificar las especies bacterianas implicadas con la separación de los minerales. La utilización de bacterias u otros microorganismos facilitan la extracción y recuperación de metales pesados, genéricamente denominados "biominería", la cual ha transformado el campo de la biotecnología de manera satisfactoria. A diferencia entre el uso de los procesos microbianos por las industrias (fermentación industrial y productibilidad farmacológica), en el sector minero el aislamiento microorganismos ha sido mínimo o inexistente (Rawlings y Johnson, 2007).

2.1.4. Bioacumulación

La bioacumulación es un proceso de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se da a través del sistema $H^+-ATPasa$. Después, el mineral es incorporado al citoplasma, luego es transportado por las proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas (MT) o también puede ser dentro de una vacuola, como ocurre en bacterias y hongos. (Vullo, 2003)

La separación oxidativa de minerales es aprovechada en el desarrollo y aplicación de una biotecnología para la obtención de metales a partir de minerales sulfurados y concentrados mediante la capacidad de las bacterias y arqueas acidófilas quimiolitioautótrofos para aumentar dicha separación. (Saavedra, 2009).

2.1.5. Microorganismos bioacumulantes

Los géneros bacterianos más comunes son: *Acidithiobacillus spp*, *Leptospirillum spp*, *Acidimicrobium spp*, *Ferrimicrobium spp*. y *Thiomonas spp*, *Ferrovum*; *Nitrospirae (Leptospirillum)* y *Actinobacteria (Ferrimicrobium, Acidimicrobium, Ferrithrix)*; con diferentes mecanismos: bioacumulación, biolixiviación, Biosorción, Biomineralización y

Biotransformación. (León, 2017). El género *Acidithiobacillus spp.* Incluye a las proteobacterias quimiolitótrofas ya que usa compuestos inorgánicos como donadores de electrones, pero también son autótrofos porque transforman el CO₂ en material celular mediante las reacciones del ciclo de Calvin. (Navarro, 2013).

2.1.6. Mecanismos de bioacumulación

Los mecanismos de bioacumulación, involucran un proceso celular de transporte de membrana que internaliza al metal presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H⁺-ATPasa. Luego de ser incorporado al citoplasma, es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioninas o son llevados dentro de unas vacuolas, como ocurre en hongos. (Berthelsen y Steinnes, 1995)

Entre estos mecanismos, se muestra la acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue encontrado en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. (Nicoara, 1996)

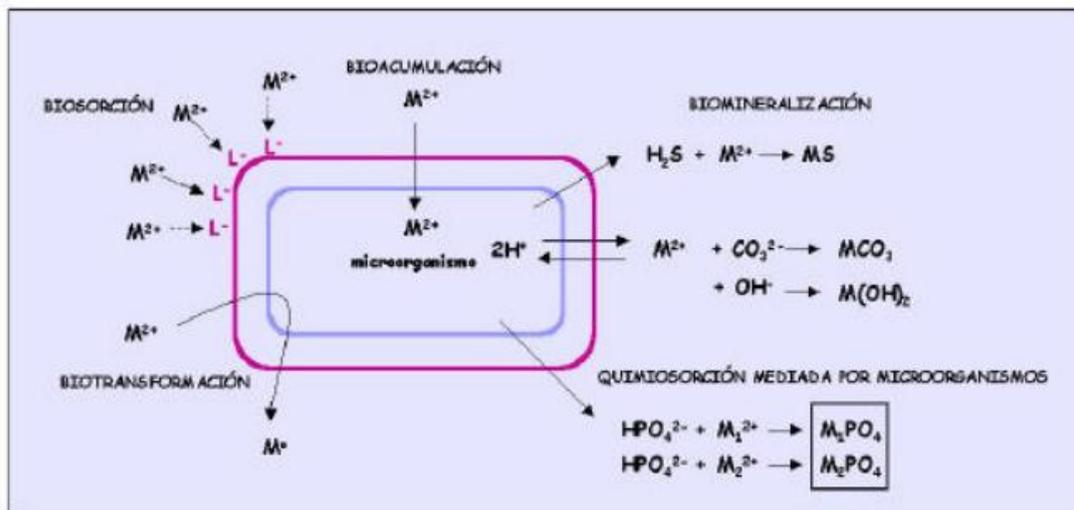


Figura 5. *Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos*

Vullo (2003), describe a microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales [pesados]. Los resistentes se definen por tener mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal y los tolerantes, son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es gracias a la acción de diferentes mecanismos, como se muestra en la figura 5.

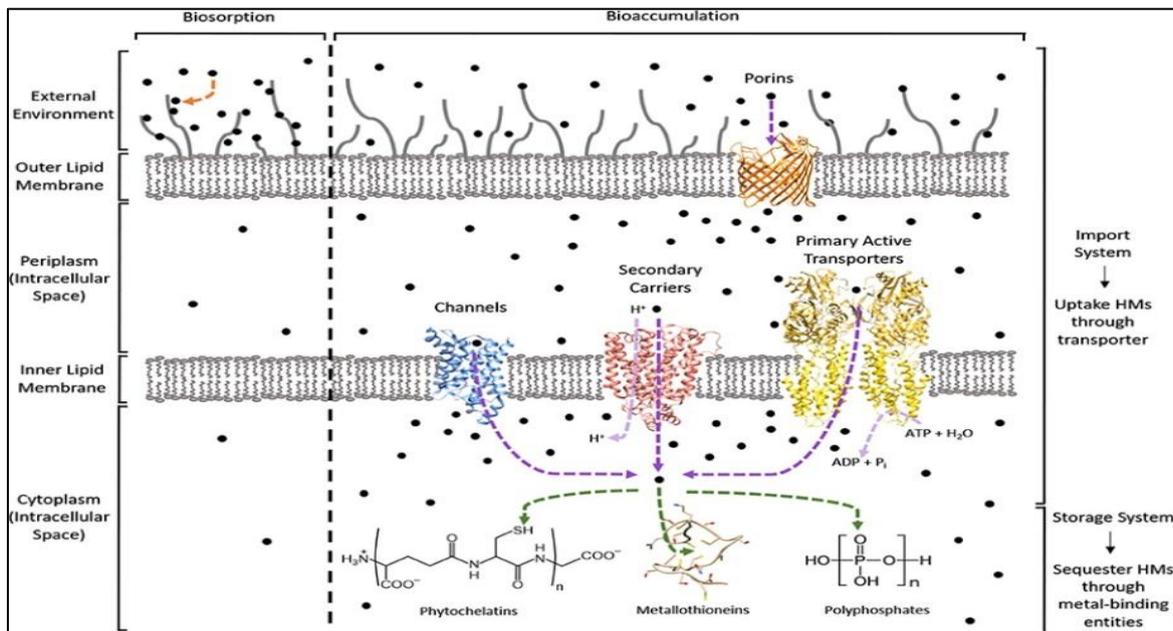


Figura 6. Comparación entre el mecanismo de adsorción bioacumulación.
Fuente: Vullo (2003).

2.1.7. Temperatura

Uno de los factores ambientales más importantes que influye en la proliferación y mantención de la vitalidad de los microorganismos es la temperatura, involucrandose así en el proceso de bioacumulación. Cada bacteria tiene su propio rango óptimo de temperatura donde crecen de manera más eficiente. La influencia de la temperatura en los procesos de biolixiviación y bioacumulación es dependiente, la velocidad de separación del metal pesado y la disolución de sulfuros provocan un aumento de temperatura. Deveci (2004) definió que la temperatura en los procesos de biolixiviación y bioacumulación no tiene un comportamiento proporcional debido al rango específico de velocidad de disolución de los metales pesados y a la capacidad acumulativa de los microorganismos.

2.1.8. pH

Los microorganismos quimiolitótrofos se encuentran en ambientes extremos muy bajos en niveles de pH, altas temperaturas, baja materia orgánica y altas concentraciones de elementos metálicos, un ejemplo de éstos son los drenajes ácidos que se encuentran con frecuencia en los sitios mineros donde se acumulan todos los desechos de las minas. El pH es uno de los factores fundamentales en la mejora del proceso de bioacumulación determinando el crecimiento bacteriano en el medio de cultivo. Tal es el caso de bacterias quimiolitótrofos que incrementan al descender el pH, haciendo que regiones a un $\text{pH} < 3$ sean áreas de intensa actividad metabólica por acidófilos. (Ragnarsdottir y Hawkins, 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento del consorcio bacteriano

3.1.1. Obtención del relave minero

La toma de muestra se realizó teniendo como método la técnica del azar en un punto al azar de los cuerpos receptores de relave minero de la empresa minera Denwood Holdings Perú Metals S. A. C. Nro. S/N fnd. Puacpampa Del Caraz, departamento de Ancash. (EMIS, 2021). Fuente: Google maps. -9.52466026994273, -77.53031984740892.

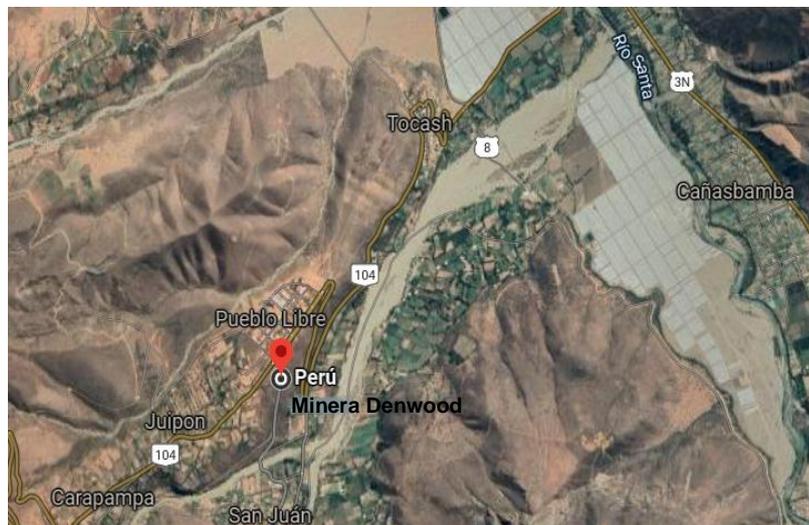


Figura 7. *Ubicación de la empresa minera Denwood Holdings Perú Metals S. A. C.*

Se recolectó 3 muestras de 3 L en cada frasco de vidrio estériles, el transporte se ejecutó a temperatura ambiente en cajas herméticas hasta el laboratorio de investigación de la EAP de Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa donde se llevó a cabo los análisis como parte del proyecto de investigación.

3.1.1. Medio de cultivo líquido 9k enriquecido con el relave minero

Para el enriquecimiento de las bacterias quimiolitotóxicas en medio seleccionado fue el medio 9K de Silverman y Lundgren, quienes de acuerdo a literatura lo describen como el medio más apropiado para el crecimiento y desarrollo de este tipo de bacterias (Yates *et al.*, 1987). Se preparó un volumen total de 1000 mL de medio líquido 9K en dos soluciones por separado:

Solución 1: con 0.5 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄, 3 g NH₄SO₄ y 0.01 Ca(NO₃)₂ los que se diluyeron en 700 mL de agua destilada a pH 2.1 y se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

Solución 2: con 44.2 g FeSO₄·7H₂O diluidos en 300 mL de agua destilada ajustado con H₂SO₄ a un pH 2.1.

3.1.2. Aislamiento del consorcio bacteriano

Para el aislamiento del consorcio bacteriano, las tres muestras tomadas fueron homogenizadas, luego se extrajo un inóculo de 5 mL (10% v/v volumen total del medio) 100 mL del medio líquido 9K en matraces de 250 mL, el matraz inóculo fue conservado a una temperatura de 30° C y a 150 revoluciones por minuto en un Shaker con su respectivo control negativo, por 20 días. También se visualizó el crecimiento del consorcio bacteriano mediante el uso del microscópico.

3.1.3. Obtención del consorcio bacteriano

Tras la inoculación de la muestra, se preparó medio 9K sólido a partir de dos soluciones; solución A: 1.5 g (NH₄)₂ SO₄, 0.25 g K₂HPO₄, 0.05 g KCl, 0.25 g MgSO₄ H₂O y 0.005 g Ca (NO₃)₂, diluidos en 350 mL de agua destilada pH 2.1 acidificado con H₂SO₄ al 1N, se esterilizó a 121° C por 15 minutos; Solución B: 22.1 g FeSO₄ 7 H₂O y 7.5 g de agarosa en 150 mL de agua destilada con un pH 2.1 acidificada con H₂SO₄ 1 N, sin esterilizar para evitar la precipitación de compuestos y desnaturalización de la agarosa. Una vez esterilizada la solución 1, se mezcló con la solución 2, y antes de que la solución 1 se enfríe del todo se sirvió 20 mL aproximado de medio en placas petri y se dejó enfriar.

Tras obtener colonias en el medio sólido 9K, estas colonias fueron trasplantadas a un medio líquido 9K a temperatura ambiente durante 20 días, registrando el crecimiento de las bacterias presentes mediante el cambio de coloración del medio de cultivo. Después de la obtención del consorcio bacteriano se mantuvieron en un matraz de 250 mL de

capacidad conteniendo 5 mL (10% de inóculo) y 100 mL de medio 9K, a pH 2.1, temperatura ambiente (21°C) y 150 rpm en un shaker. Se registró su crecimiento por un período de 15 días mediante observaciones microscópicas.

3.2. Caracterización microbiológica del consorcio bacteriano aislado a partir del relave minero.

3.2.1. Tinción Gram

Para una mejor evaluación microscópica del crecimiento bacteriano y visualización de la morfología de las bacterias que conforman el consorcio bacteriano se realizaron observaciones microscópicas cada 72 h, las cuales se llevaron a cabo como una muestra en fresco a 100 X con aceite de inmersión.

La tinción Gram fue el procedimiento que caracterizó la morfología celular bacteriana, determinándose como un conjunto de Bacterias Gram positiva a las bacterias que se tiñen de color morado y Bacterias Gram negativa a las que se tiñen de color rosa o rojo grosella.

Se extrajo 1 ml del cultivo (consorcio bacteriano) sobre una lámina portaobjetos, se dejó secar a temperatura ambiente y fijarlas utilizando un mechero. Se fijó la muestra con metanol durante un minuto o al calor (flameado tres veces aproximadamente). Se agregó azul violeta y se esperó un minuto. Se enjuagó con agua no directamente sobre la muestra. Se agregó y se esperó por un minuto aproximadamente, luego se agregó alcohol acetona hasta que la muestra se vuelva incolora (parte crítica de la coloración, las gram - se decoloran, las gram + no). Se enjuagó con agua. Luego se agregó safranina como tinción de contraste y se esperó por 1 min. Luego se enjuagó levemente para eliminar el exceso de la safranina. Por último, se dejó secar a naturalmente y se observó en el microscopio a 100X con aceite de inmersión (López *et al.*, 2015).

3.2.2. Determinación cuantitativa del Consorcio Bacteriano

Para la determinación del recuento total del consorcio bacteriano se realizó por recuento microscópico mediante el uso de una cámara de Neubauer con una secuencia de 72 h durante 20 días siguiendo el protocolo de conteo bacteriano en los 5 cuadrantes (Madigan *et al.*, 2012).

Por ello, se extrajo 10 mL del cultivo, el cual fue pasado por un filtro de jeringa con 20 ml de capacidad, construido manualmente en esterilidad, para la separación de los minerales presentes en el cultivo, luego se extrajo un 1 ml del filtrado el cual fue colocado en la cámara de Neubauer. Se llevó a observar a 100X.

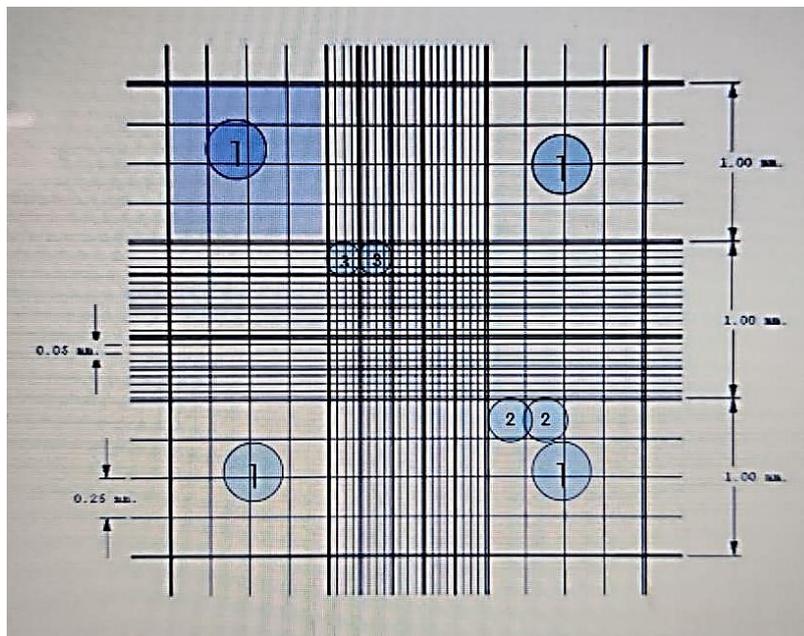


Figura 8. Recuento del consorcio bacteriano en cámara de Neubauer.

Finalmente se prosiguió a contar las bacterias de los cuadrantes, calculándose así la concentración celular según la siguiente fórmula:

<p>CUADRADO 1</p> <p>Área = 1 mm x 1 mm = 1 mm² Volumen = 1 mm² x 0,1 mm = 0,1 mm³ = 1 x 10⁻⁴ ml</p> <p>1</p> <p>Total Células Contadas Concentración celular = $\frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadrados}}$ x 10.000</p>	<p>CUADRADO 2</p> <p>Área = 0,25 mm x 0,25 mm = 0,0625 mm² Volumen = 0,0625 mm² x 0,1 mm = 6,25 x 10⁻³ mm³ = 6,25 x 10⁻⁶ ml</p> <p>2</p> <p>Total Células Contadas Concentración celular = $\frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadrados}}$ x 160.000</p>
<p>CUADRADO 3</p> <p>Área = 0,2 mm x 0,2 mm = 0,04 mm² Volumen = 0,04 mm² x 0,1 mm = 4 x 10⁻³ mm³ = 4 x 10⁻⁶ ml</p> <p>3</p> <p>Total Células Contadas Concentración celular = $\frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadrados}}$ x 250.000</p>	<p>CUADRADO 4</p> <p>1/16th de CUADRADO 3, sólo NEUBAUER improved – rejilla central</p> <p>Área = 0,05 mm x 0,05 mm = 0,0025 mm² Volumen = 0,0025 mm² x 0,1 mm = 2,5 x 10⁻⁴ mm³ = 2,5 x 10⁻⁷ ml</p> <p></p> <p>Total Células Contadas Concentración celular = $\frac{\text{Total Células Contadas}}{\text{Número de Cuadrados}}$ x 4 x 10⁵</p>

Figura 9. Fórmulas para recuento celular en cámara de Neubauer.

Luego se determinó la concentración de biomasa del consorcio bacteriano mediante una absorbancia de 660 nm (Sugio, 2008), mediante un sistema de filtración al vacío, usando una membrana de 0.45 µm, con la finalidad de separar las partículas presentes del mineral el medio de cultivo, se filtró un alícuota del medio cada 72 horas por 20 días, con los resultados obtenidos se elaboró una curva de calibración de cél/mL respecto al tiempo.

3.2.3. Acondicionamiento del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas

Sé determinó el efecto de la temperatura en el proceso de bioacumulación haciendo necesario acondicionar el consorcio bacteriano a las siguientes temperaturas: 21 °C (Temperatura ambiente), 30 °C y 40 °C, todas las muestras se trabajaron con un pH final de 2.1, después de ejecutar trasposos sucesivos cada 10 días a un medio 9K nuevo, en matraces de 250 mL de capacidad, teniendo 50 mL del medio más 10 mL del inóculo y ajustando el pH con ácido sulfúrico concentrado. Pasado 20 días de adaptación se evaluó la concentración celular de cada medio.

3.3. Proceso de bioacumulación del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas.

3.3.1. Relave minero

El relave minero de estudio fue obtenido de la compañía minera Denwood Holdings Perú Metal S.A.C., de la cual se aisló el consorcio bacteriano. Como pre tratamiento se llevó a cabo un filtrado del relave minero para separación de partículas más pesadas mediante un sistema de filtrado al vacío, efectuándose en las instalaciones del Laboratorio de Química LASACI de la Universidad Nacional de Trujillo.

3.3.2. Análisis del relave minero

Se analizó la composición elemental del relave minero mediante espectrofotometría de absorción atómica, la cual es una técnica muy sensible, y específica debido a que las líneas de absorción atómica son estrechas (de 0,002 a 0,005 nm) y las energías de transición electrónica son únicas para cada elemento (Skoog *et al.*, 2001).

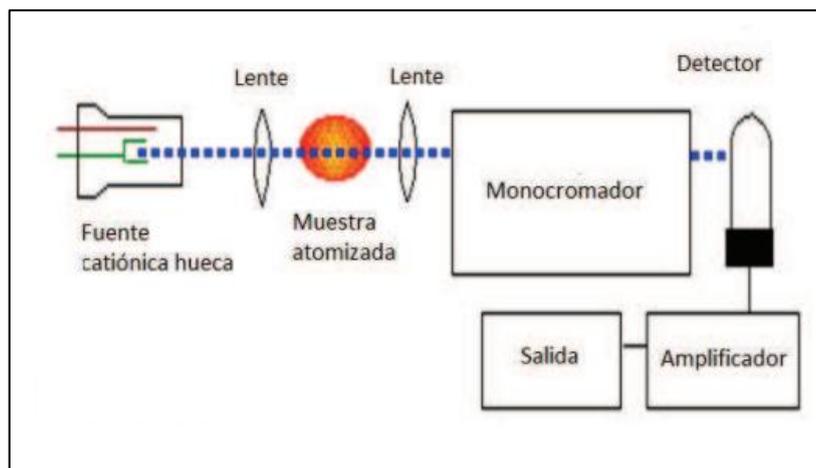


Figura 10. Esquema básico de un espectrómetro de absorción atómica

Debido a la información cualitativa y cuantitativa se obtuvo la relación entre la potencia de emisión de longitudes de onda con la concentración en una curva de calibrado (Otero, 2009). La técnica seleccionada para determinar las concentraciones de plomo en relaves mineros es uno de los sistemas más utilizados para la caracterización de diferentes elementos utilizando las unidades de mg/mL y ug/ml, así mismo es para la determinación de trazas de metales en muestras biológicas y medioambientales (Walton y Reyes, 1983).

3.3.3. Acondicionamiento del consorcio bacteriano al proceso de bioacumulación del plomo.

La adaptación del consorcio se llevó a cabo mediante la inoculación del medio de cultivo (consorcio bacteriano a diferentes temperaturas) hacia el relave minero. Los ensayos fueron realizados en matraces de vidrio con capacidad de 1L, teniendo 3 réplicas por cada valor de temperatura (21°C ambiente, 30°C y 40°C), todos con un pH final de 2.1 con su respectivo control negativo (sin inóculo). Se colocó en cada uno 10% de inóculo, así como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. *Volumen del inóculo empleado en acondicionamiento de los medios de cultivos*

Temperatura	Relave minero (mL)	Inóculo (mL)	Volumen total (mL)
21 °C (Ambiente)	360	40	400
30 °C	360	40	400
40 °C	360	40	400

Antes de empezar con el ensayo de bioacumulación, el relave minero fue esterilizado a 121 °C por 15 min, antes de agregar el inóculo. Una vez acondicionado, en el día cero se realizó la contabilización del consorcio bacteriano en la cámara de Neubauer para obtener la concentración inicial de biomasa.

Se colocaron los 12 matraces en tres shakers, cada shaker con 4 matraces a una diferente temperatura (21 °C ambiente, 30 °C y 40 °C), todos a 150 rpm por un periodo de 30 días. Durante el proceso de bioacumulación, con una frecuencia de 5 días, se extrajo 30 mL de muestra en tubos de ensayo, de cada tratamiento con su respectivo control negativo. Las muestras extraídas fueron sometidas a shock térmico según el protocolo de Lj y Werb (1982), el cual consistió en estar sometidas en agua a punto de ebullición (100 °C) por 5 min, luego inmediatamente se sometió en agua fría con hielo (< 10 °C) por 5 min, se retiraron y dejaron reposar las muestras. Con la finalidad de detener la capacidad bioacumulativa del consorcio bacteriano.

Luego de detener el proceso de bioacumulación, las muestras pasaron por un sistema de filtrado al vacío, con una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm , cuya finalidad fue impedir el paso del consorcio bacteriano. (Krzywonos, M 2014). Finalmente, se determinó la concentración plomo de las muestras ya filtradas, usando un espectrofotómetro de absorción atómica, expresando los resultados en mg/mL.

3.4. Caracterización molecular del consorcio bacteriano

La caracterización molecular del consorcio bacteriano aislado de relave minero, se envió a un laboratorio externo INCA BIOTEC S.A.C., para su respectivo análisis. El inóculo del consorcio bacteriano, fue extraído y enviado a los siete días de haber sido cultivado en un tubo Falcón de 50 ml de capacidad.

3.4.1. Extracción de ADN total de bacterias presentes en el consorcio aislado

La extracción de ADN fue realizada mediante el kit PowerSoil® (Mo Bio) según las indicaciones del fabricante. Los ADN extraídos fueron conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su amplificación por PCR dirigida al gen 16S ARNr.

3.4.2. Secuenciamiento del gen 16S ARNr de las bacterias presentes en consorcio aislado.

Para verificar la calidad del ADN extraído se realizó una PCR dirigida al gen 16S ARNr utilizando los iniciadores universales 27F (5'- AGAGTTTAGTCMTGGCTCAG-3) - 1492R (GGYTACCTTGTTACGACTT) que generan un producto de alrededor de 1500 pb. El mix de PCR utilizado de un volumen final de 25 μL , consistió en 2,5 μL buffer 10 X, 2,5 μL MgCl_2 25 mM, 0,6 μL dNTPs a 10 mM y 2 U de Taq DNA polymerase (Thermo Scientific). Las condiciones usadas para la PCR fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 45 segundos, elongación a 72°C por 1 minuto y una elongación final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de electroforesis a una concentración de 1,5% de agarosa.

3.4.3. Secuenciación de ADN total de las bacterias presentes en el consorcio aislado

Los ADN totales de bacterias extraídos fueron enviados a Mr. DNA (Shallowater, TX, USA) para ser secuenciadas en la plataforma PGM™ (Ion Personal Genome Machine System - Thermo Fisher Scientific)

3.4.4. Evaluación de la calidad de ADN metagenómico.

El análisis de metagenómica dirigida fue realizado a partir de productos de amplificación por PCR de la región variable V4 del gen 16S ARNr utilizando los iniciadores universales 515F y 806R (Caporaso, 2012). Los datos de las secuencias fueron procesados mediante la plataforma de *análisis pipeline* del proveedor. Las secuencias menores a 250 pb fueron removidas. Las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) obtenidas fueron clasificadas taxonómicamente usando BLASTn, y comparadas con una base de datos curada derivada de Greengenes, RDP II y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.5. Análisis estadístico

Para determinar el efecto de la temperatura en la bioacumulación de plomo, se realizó un análisis de varianza de un factor. También se realizó una ANOVA de un factor con un nivel de confianza de 95%. Seguido de una prueba HSD TUKEY para determinar entre los tratamientos existió diferencia estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó a todos los tratamientos casa 5 días durante 1 mes.

Los datos resultantes del experimento fueron procesados mediante el software IBM SPSS STATISTICS versión 25.0

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. Aislamiento del consorcio bacteriano

4.1.1. Medio de cultivo líquido 9k enriquecido con el relave minero

El relave minero recolectado formó parte del enriquecimiento del medio 9K al 10 % del volumen total del medio cultivo, cultivadas 150 rpm y temperatura ambiente por 15 días. Según Eyzaguirre *et al.*, (2019) el medio 9K (líquido modificado) con los minerales presentes en los relaves mineros se logra aumentar la población bacteriana, por contar con la presencia de bacterias nativas al obtener una población idónea de $\sim 10^7$ cél/mL conteo hecho en cámara de Neubauer.

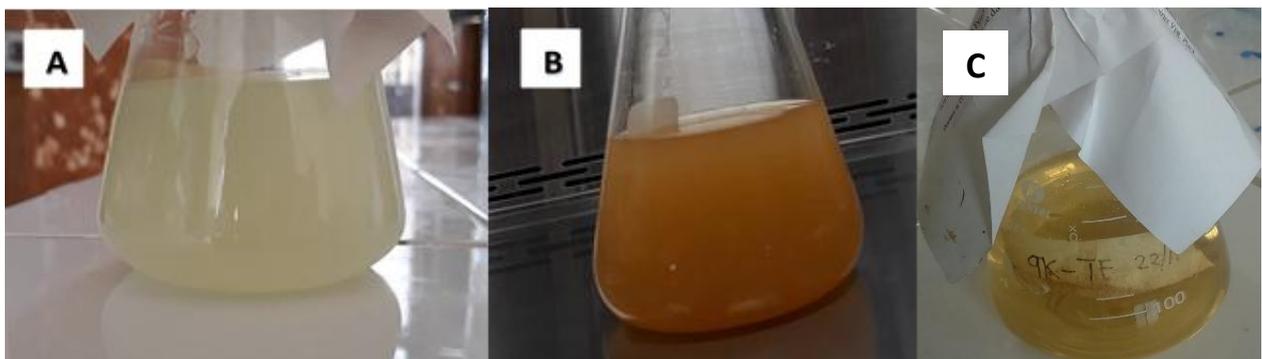


Figura 11. Evaluación cualitativa del medio 9k enriquecido con la muestra del relave. A: Quinto día del cultivo B: Décimo quinto día de haber sido sembrado. C: Décimo día de cultivo Control.

La figura 11 muestra la evaluación cualitativa del crecimiento bacteriano, con características acidófilas provenientes de las muestras de relave minero, donde al inicio de la inoculación presentan un color blanquecino en el quinto día (A), luego una coloración anaranjada en el décimo quinto día (B), coincidiendo así con Kotrba, *et al.*, (1999) donde indicó que el color rojo ladrillo es una propiedad que muestran las bacterias debido a la oxidación ion ferroso como fuente de energía en medio 9K, antes se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas teniendo como referencia intensificación de color del medio, lo cual significa la presencia de bacterias acidófilas biolixivantes y/o bioacumulantes (Cabrera *et al.*, 2005).

4.1.2. Aislamiento del consorcio bacteriano en medio sólido

A partir del enriquecimiento del medio cultivo 9K líquido, se sembró por micro gota una placa de medio 9K sólido (con el 10% del relave minero). Para ello se empleó un control negativo (medio sin inóculo) como indicador visual. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente, registrando observaciones cada día.



Figura 12. *Crecimiento del consorcio bacteriano, semicirculares de color amarillo claro y oscuros, en medio 9k tras 20 días de siembra*

Se examinaron las placas inoculadas (figura 12) a los 20 días de siembra mostraron la morfología de las colonias, siendo semicirculares de color amarillo claro, este tipo de morfología fue observado por Arias *et al.*, (2012). Por otro lado, un estudio realizado en Colombia muestra la morfología de bacterias acidófilas aislados de drenajes ácidos de tamaños, diferentes, las tres bacterias aisladas (Ferro3, Ferro4 y Ferro5) son bacilos rectos gram negativos, no formadores de espora de diferentes tamaños, con diámetros muy variables desde 0,4 μm hasta 0,75 μm –, y longitudes entre 1,06 μm y 2,33 μm . De las tres colonias aislados oxidadores de hierro, la colonia denominada Ferro5 mostrada en la tabla 2 es de mayor tamaño y de diferente color y textura, y bacilos de mayor diámetro, aun cuando su longitud fue similar a la colonia Ferro3 según la (tabla 2) Osorio, *et al.*, (2007).

Tabla 2. Características de la colonia y dimensiones celulares de los aislados quimiolitautótrofos.

Aislado	Morfología de colonia					Dimensiones de bacilos	
	Longitud máxima	Forma	Borde	Color	Textura	Longitud (µm)	Diámetro (µm)
Ferro5	≤ 4 mm	Irregular	Ondulado	Translúcidas	Algodonosas	1,06 - 1,83	0,71 - 0,75
Ferro4	≤ 1 mm	Irregular	Ondulado	Crema, centro naranja, borde translúcido	Cremosa	0,99 - 1,51	0,40 - 0,64
Ferro3	≤ 1 mm	Circular	Regular	Café, centro oscuro	Cremosa	1,55 - 2,33	0,47 - 0,59

4.1.3. Obtención del consorcio bacteriano aislado de relave minero

Se obtuvo el consorcio bacteriano mediante la purificación y enriquecimiento del medio a través de traspases cada 15 días el proceso, así cada etapa de resiembra concluye cuando el medio cambie a color rojizo, debido a la oxidación del hierro ferroso a férrico Yang Yu *et al.*, (2008), transcurrido lo anterior, se toma una alícuota de 25 ml, esta vez de la solución de siembra para adicionarlo nuevamente a un medio líquido 9K fresco, realizando estas etapas se obtuvo el aislamiento de un consorcio de bacterias, el cual se utilizó para los ensayos de bioacumulación.

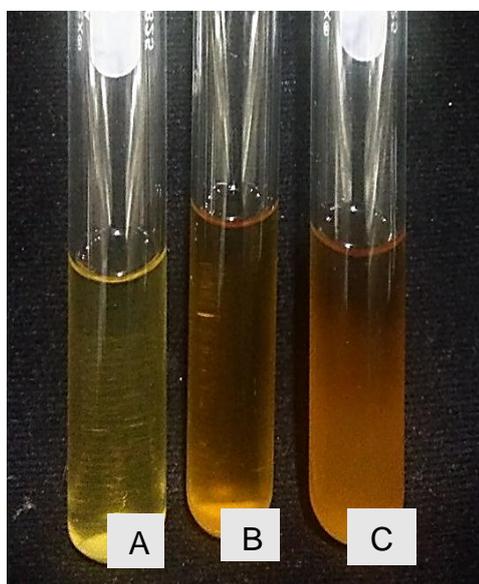


Figura 13. Comparación del crecimiento bacteriano en el tiempo. A: Décimo día de cultivo. B: Décimo quinto día de cultivo. C: Vigésimo día de cultivo.

El consorcio bacteriano fue monitoreado realizando observaciones microscópicas con recuento en la cámara de Neubauer obteniendo $\sim 1 \times 10^6$ cel/ mL, para poder mantener el crecimiento de la biomasa en semejante en subcultivos sembrados cada 20 días.

4.2. Caracterización microbiológica del consorcio bacteriano

4.2.1. Tinción Gram

La tinción Gram se realizó según el manual de López *et al.*, (2015) el cual permitió una visualización más nítida a las bacterias de una muestra en fresco a 100X, logrando observar las características microscópicas del consorcio bacteriano, en su mayoría se encontró bacilos pequeños y alargados, con partículas del medio 9K. La tinción se utilizó para verificar si las bacterias presentes en el consorcio eran grampositivas o gramnegativas. Obteniendo como resultado un conjunto de bacterias tipo gramnegativos en su mayoría con morfología de bacilos diferentes tamaños, también una pequeña cantidad de espirilos.

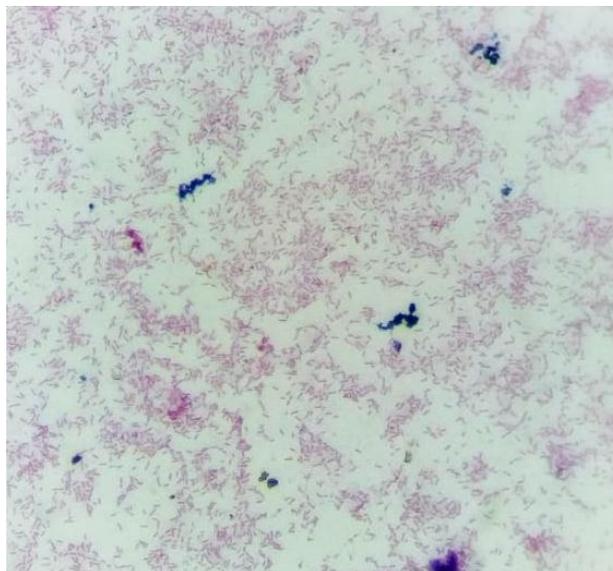


Figura 14. *Tinción Gram de una muestra del consorcio bacteriano aislado del relave minero en medio 9k, donde se observa a 100x bacilos.*

Este resultado nos muestra la similitud con bacterias Gram negativas que se encontraron minerales y relaves de diferentes lugares, según Román (2017) el estudio de bacterias acidófilas presentes en mineral magnetita de Toquepala, concentrado de pirita de Poracota y relave de mina de cobre de Quiruvilca Tabla 3, se caracterizan generalmente por 5 propiedades, tales como: bacteria oxidante quimiolitotrófica, autótrofa, aeróbica, mesófila y acidófila; donde se logró observar las morfologías celulares de las cepas aisladas.

Tabla 3. *Tipos de morfologías observadas de las cepas aisladas de diferentes tipos de mineral.*

Morfologías encontradas	Mineral magnetita de Toquepala	Concentrado de pirita de Poracota	Relave de mina de cobre de Quiruvilca
Cilios	6	13	20
Cocobacilos	0	0	2
Espirilo	0	0	1
Filamento de actinobacteria	0	1	0

4.2.2. Determinación de biomasa del Consorcio Bacteriano

El conteo total de bacterias fue de $\sim 2.9 \times 10^7$ cél/ mL a los 18 días de cultivado, el conteo se realizó cada 72 h durante 20 días; demostrando un rápido acondicionamiento de las bacterias presentes al medio 9K. Pérez (2016) muestra la curva de crecimiento tiene forma ascendente obteniendo la concentración celular idónea para inocular los ensayos. La grafica se expresó en unidades logarítmicas *cél/mL* versus el tiempo, así como lo muestra la figura 15.

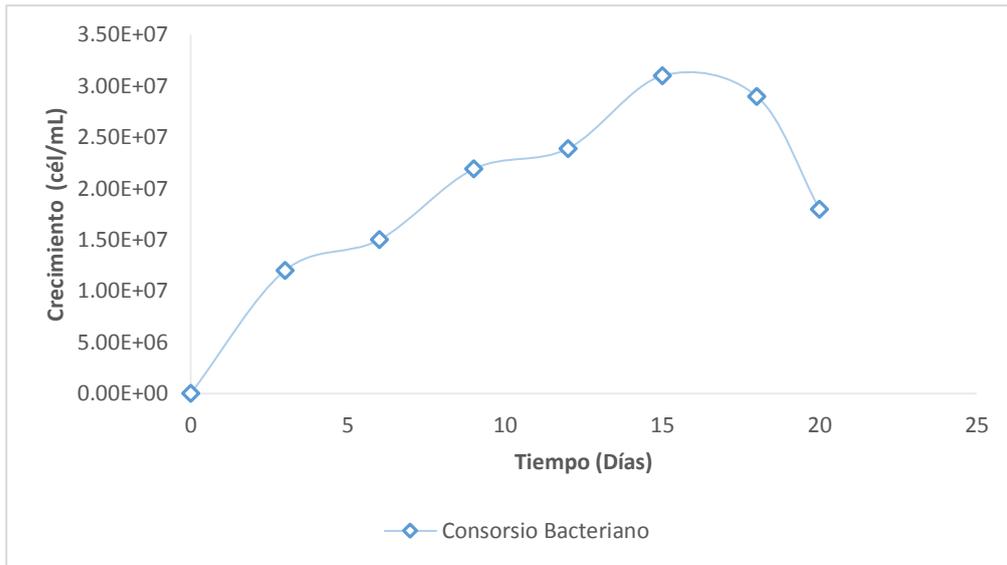


Figura 15. *Crecimiento del consorcio bacteriano resultante del conteo en cámara Neubauer cultivado en el medio 9K.*

De manera simultánea, el consorcio bacteriano también fue medido a una absorbancia de 660 nm, tal como se muestra en la figura 16.

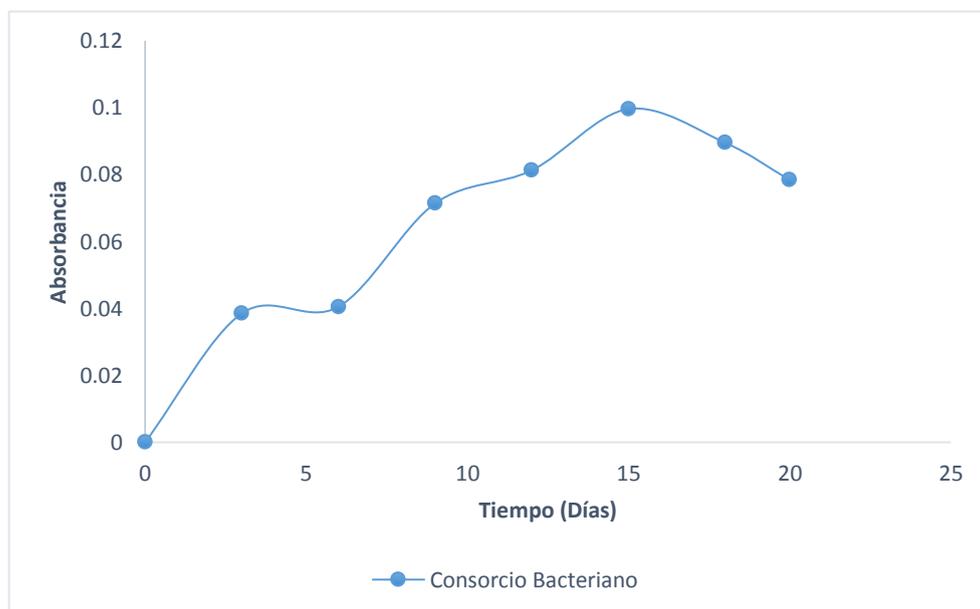


Figura 16. *Crecimiento microbiano medido mediante absorbancia celular cultivado en el medio 9K.*

4.2.3. Acondicionamiento del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas

Luego del crecimiento del consorcio bacteriano sembrado a temperatura ambiente, se procedió a la adaptación del consorcio bacteriano inoculando en medios de cultivo líquido 9K frescos a diferentes temperaturas (21 °C (Temperatura ambiente), 30 °C y 40 °C), con el objetivo de determinar el efecto de la temperatura en los ensayos de bioacumulación.



Figura 17. Adaptación del consorcio a diferentes temperaturas (ambiente, 30°C y 40°C)

Ante la adaptación del consorcio bacteriano se determinó el crecimiento celular mediante el recuento, donde se registró una biomasa celular de $\sim 10^7$ cél/ mL en cada cultivo expuesto a temperatura diferente; el conteo se realizó a 20 días, una de las principales características macroscópicas de los cultivos fue el cambio de coloración, inicialmente un color amarillento muy bajo consecuente con el color precedente del inóculo (consorcio bacteriano cultivado en medio 9K a pH 2.1 a temperatura ambiente).

Luego se observó un color amarillo-anaranjado en los cultivos a temperaturas (21 °C (Temperatura ambiente), 30 °C Y 40 °C) indicando así la reducción de hierro ferroso a férrico.

4.3. Proceso de bioacumulación del consorcio bacteriano a diferentes temperaturas.

4.3.1. Relave minero

Se realizó pre tratamiento al relave minero, el cual consistió en filtrar la muestra en un sistema de filtrado al vacío, efectuándose en las instalaciones del Laboratorio de Química LASACI de la Universidad Nacional de Trujillo.

El procedimiento del filtrado fue necesario para reducir la concentración de plomo, descartando así las partículas > a 75 μm , en donde Mejía *et al.*, (2011) afirma que el tamaño de las partículas es un factor fundamental en el proceso de biolixiviación y/o bioacumulación, así como el acondicionamiento del consorcio bacteriano (inóculo) al relave minero (metal pesado plomo), ya que de esta manera facilitó la suspensión y la homogeneidad del contenido.



Figura 18. *Sistema de filtración al vacío*

4.3.2. Análisis del relave minero

Se realizó un análisis químico por espectrofotómetro de absorción atómica, Perkin Elmer 900 última generación para cuantificar los elementos químicos presentes en la muestra del relave minero, donde se encontró los siguientes elementos: plomo, zinc, plata y hierro, mostrado en la tabla 8.

Tabla 4. *Composición química del relave minero en estudio*

ELEMENTO	mg/L
Pb	3.97
Zn	1.95
Ag	2.00



Figura 19. *Relave minero*



Figura 20. *Espectrofotómetro de absorción atómica, Perkin Elmer 900 última generación -LASACI, Universidad Nacional de Trujillo*

Según los resultados del análisis del relave minero por espectrofotometría de absorción atómica, el relave minero (plomo) (figura 19) muestra una concentración de plomo igual 3.97 mg/mL.

4.3.3. Proceso de Bioacumulación

El proceso de bioacumulación (consorcio bacteriano a temperatura ambiente (21°C), 30°C y 40°C) se realizarn por triplicado cada uno con su respectivo control negativo en matraces de vidrio con capacidad de 1000 mL, conteniendo 360 mL del relave minero, 40 mL de inóculo (10%) en un Shaker a 150 rpm y a temperatura ambiente por un periodo de 30 días en el laboratorio de investigación de la Universidad Nacional del Santa y con ayuda del Laboratorio de Química LASACI de Universidad Nacional de Trujillo. Se determinó el crecimiento del consorcio bacteriano mediante una cámara de Neubauer cada 5 días durante 30 días de evaluación en el proceso de bioacumulación.

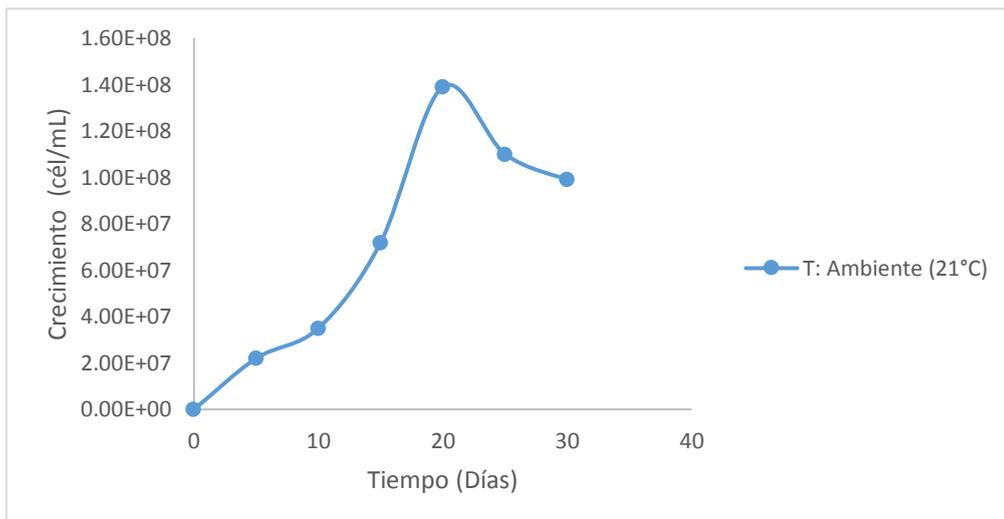


Figura 21. *Crecimiento del consorcio bacteriano en una cámara de Neubauer a temperatura ambiente (21 °C) durante el proceso de bioacumulación, con una [Pb] inicial a 3.97 mg/mL.*

La Figura 21, muestra el crecimiento consorcio bacteriano aislado de relave minero y cultivado en medio liquido 9K a pH 2.1, temperatura ambiente (21 °C) y agitación a 150 rpm, con un recuento celular de 9.9×10^7 células/mL a los 30 días de evaluación, a una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.

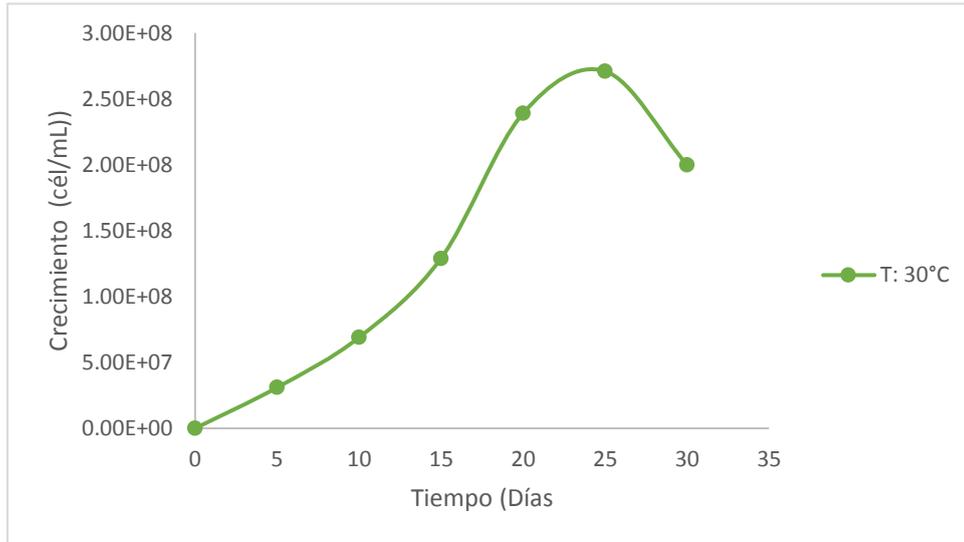


Figura 22. Crecimiento del consorcio bacteriano en una cámara de Neubauer a una temperatura de 30°C durante el proceso de bioacumulación con una [Pb] inicial a 3.97 mg/mL.

La Figura 22, muestra el crecimiento consorcio bacteriano aislado de relave minero y cultivado en medio líquido 9K a pH 2.1, temperatura de 30 °C y agitación a 150 rpm, con un recuento celular de 2.0×10^8 células/mL a los 30 días de evaluación, a una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.

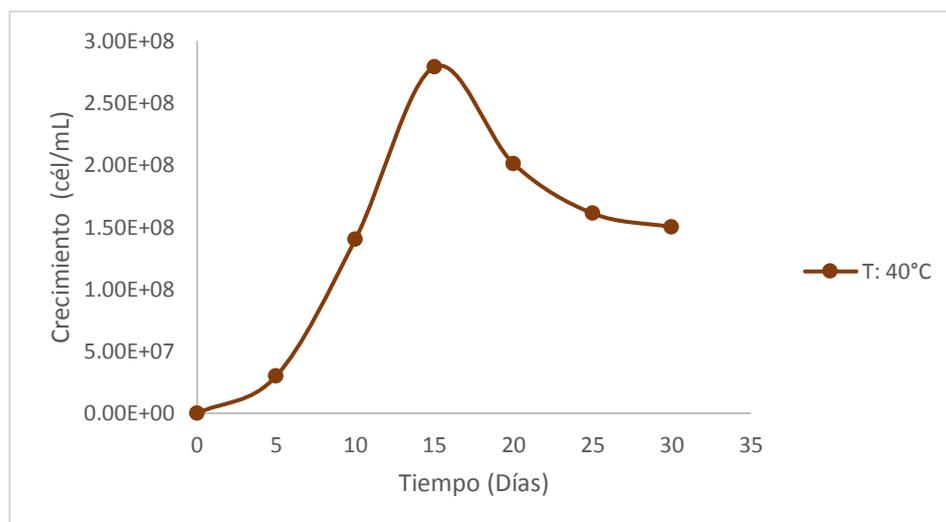


Figura 23. Crecimiento del consorcio bacteriano en una cámara de Neubauer a una temperatura de 40°C durante el proceso de bioacumulación con una [Pb] inicial a 3.97 mg/mL.

La Figura 23, muestra el crecimiento consorcio bacteriano aislado de relave minero y cultivado en medio liquido 9K a pH 2.1, temperatura de 40 °C y agitación a 150 rpm, con un recuento celular de 1.50×10^8 cél/mL a los 30 días de evaluación, a una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.

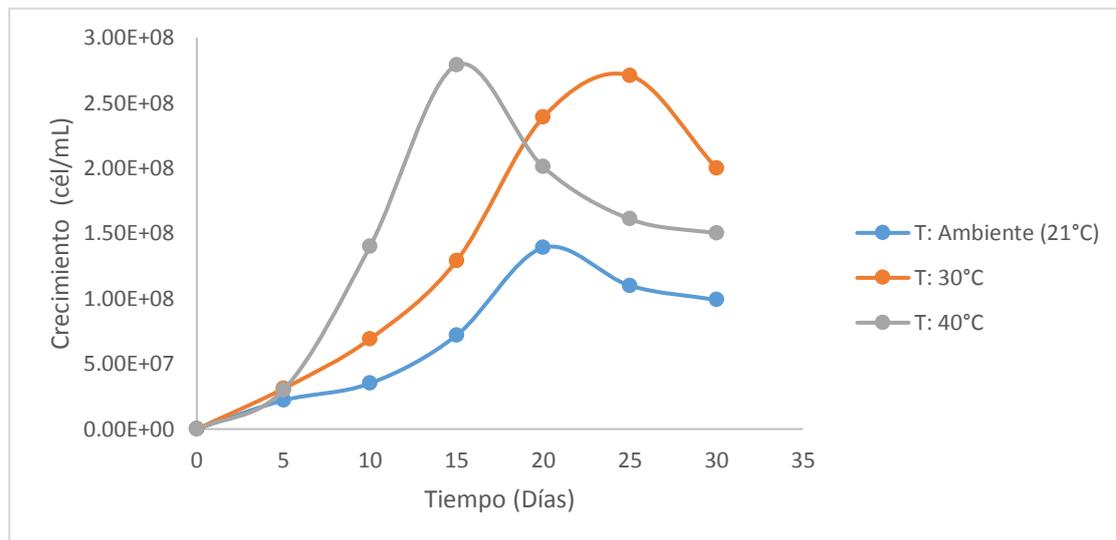


Figura 24. Comparación del crecimiento del consorcio bacteriano aislado de relave minero a diferentes valores de temperatura (ambiente (21 °C), 30 °C y 40°C) durante el proceso de bioacumulación en 30 días de evaluación, con una [Pb] inicial a 3.97 mg/mL.

La figura 24, muestra el crecimiento y la concentración celular máxima (cél/mL) del consorcio bacteriano durante el proceso de bioacumulación, ante ello se observó el comportamiento de consorcio a diferentes valores de temperatura, siendo el cultivo expuesto a una temperatura de 30 °C el que obtuvo una biomasa de 2.0×10^8 cél/mL hasta el día 30, mayor en comparación a los otros dos cultivos tanto a temperatura ambiente (21°C) con 9.9×10^7 cél/mL como a temperatura de 40 °C con 1.50×10^8 cél/mL. Los tres tratamientos alcanzaron la concentración bacteriana recomendada por Mejia *et. al* (2011) para el aislamiento (107-108 cel/ml),

Para Yu, *et al.*, (2014), el crecimiento y la actividad del consorcio bacteriano se ven afectados por la temperatura del medio, el cual es un parámetro muy importante durante el proceso de biolixiviación y/o bioacumulación.

La adaptación de los microorganismos a los minerales presentes en el relave minero se estabiliza rápidamente según las concentraciones microbianas, para Ortiz, (2012), este comportamiento da indicios de una actividad biolixivante y bioacumulante. Es posible que esto se deba a que los microorganismos presentes en el inóculo microbiano fueron mesófilos considerando que para obtener el inóculo tuvo que hacerse un cultivo de enriquecimiento seguido de un subcultivo a temperatura ambiente (temperatura mesofílica) que hizo que prevalecieran los microorganismos mesófilos. Los microorganismos que se presentan en un mineral para la biolixiviación y bioacumulación pueden ser mesófilos (desarrollan a menos de 40 °C) y termófilos (desarrollan entre 40 a 85 °C) (Pérez, 2016).

Por otra parte, los investigadores Johnson D y Hallberg K. (2003) mencionan que las bacterias acidófilas del género *Acidithiobacillus* son mesófilas caracterizadas por su evolución favorable con temperatura de 40°C - 50°C según Donoso (2013). Teniendo en cuenta parte de esta investigación se evaluó el proceso de bioacumulación del consorcio bacteriano nativo a una temperatura de 40°C y en agitación en shaker (150 rpm), pero estas condiciones de incubación tampoco lograron un crecimiento bacteriano sostenible por presentar un declive de la concentración celular a 15 días de incubación.

4.3.4. Determinación de plomo en el proceso de bioacumulación

La determinación de plomo bioacumulado se llevó a cabo en simultáneo con el comportamiento del consorcio bacteriano, las muestras extraídas fueron cada 5 días durante un periodo de 30 días

Tabla 5. Concentración de Pb (mg/L) durante el proceso de bioacumulación a diferentes temperaturas

Consortio bacteriano	Concentración de Pb (mg/mL)						
	0 días ± DS	5 días ± DS	10 días ± DS	15 días ± DS	20 días ± DS	25 días ± DS	30 días ± DS
T: Ambiente 21 °C	0.030 ± 0.017	0.260 ± 0.053	1.013 ± 0.049	1.370 ± 0.010	1.603 ± 0.025	1.910 ± 0.026	1.793 ± 0.025
T: 30 °C	0.037 ± 0.021	0.663 ± 0.025	1.127 ± 0.045	1.893 ± 0.083	2.280 ± 0.010	2.770 ± 0.010	2.383 ± 0.015
T: 40 °C	0.040 ± 0.017	0.337 ± 0.047	1.237 ± 0.045	1.427 ± 0.021	1.337 ± 0.021	1.337 ± 0.015	1.350 ± 0.010

La tabla 5 muestra los promedios y desviaciones estándar de las concentraciones de plomo total por efecto de los ensayos de bioacumulación de plomo a partir del relave minero mediante un consorcio bacteriano aislado del mismo, desde el día 0 hasta el día 30 de evaluación, calculados por el método de espectrofotometría de absorción atómica.

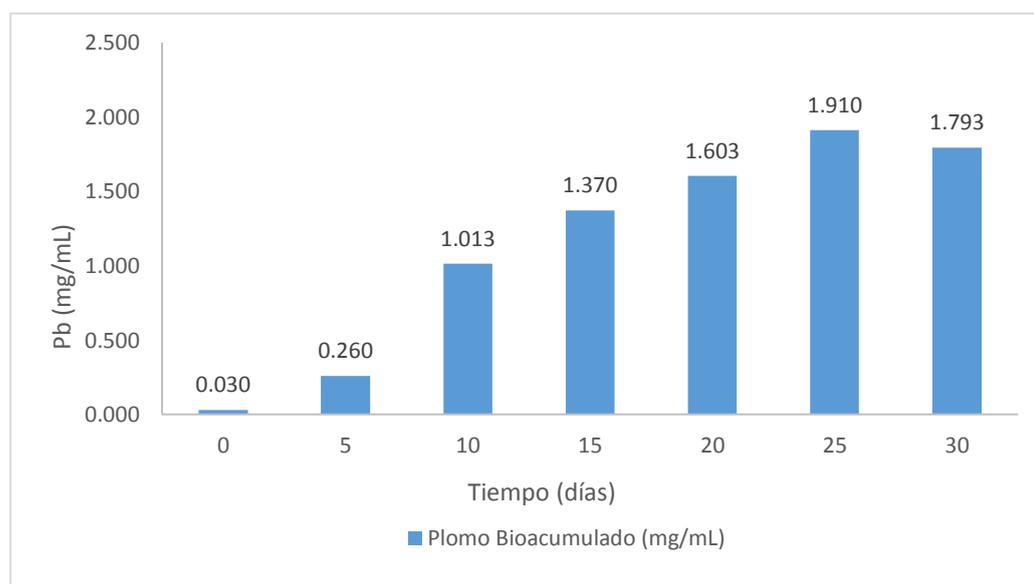


Figura 25. Proceso de bioacumulación a temperatura ambiente (21°C)

La Figura 25, muestra la concentración de plomo bioacumulado por el consorcio bacteriano aislado de relave minero tratado a una temperatura ambiental 21 °C con agitación a 150 rpm y pH 2.1, con un recuento celular máximo de 1.39×10^8 cél/mL a los 20 días, a partir del día 21 se visualizó el declive en la capacidad bioacumulativa por el consorcio bacteriano.

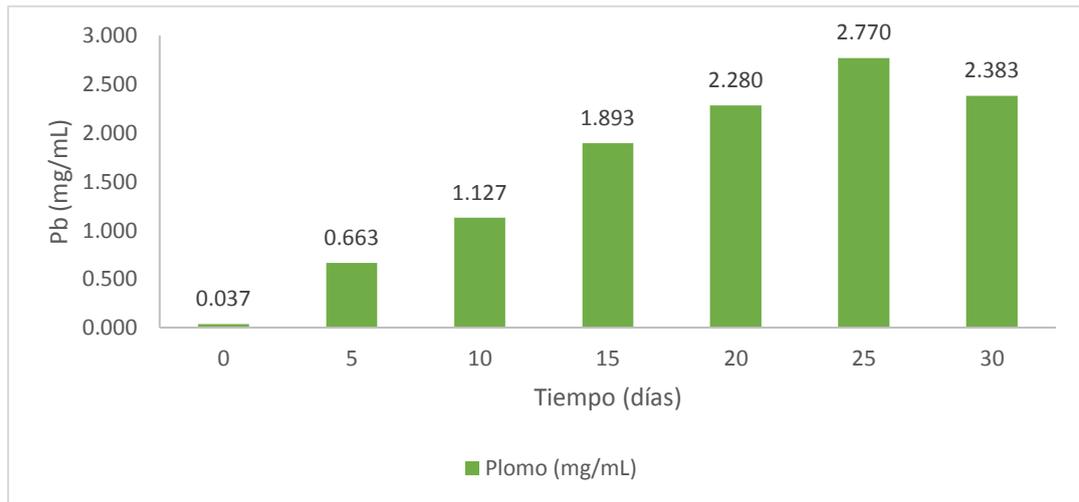


Figura 26. *Proceso de bioacumulación de plomo a 30°C de temperatura*

La Figura 26, muestra la concentración de plomo bioacumulado por el consorcio bacteriano nativo aislado de relave minero tratado a una temperatura de 30 °C con agitación a 150 rpm y pH 2.1, con un recuento celular máximo de 2.71×10^8 cél/mL a los 25 días, observando una mayor concentración de plomo bioacumulado.

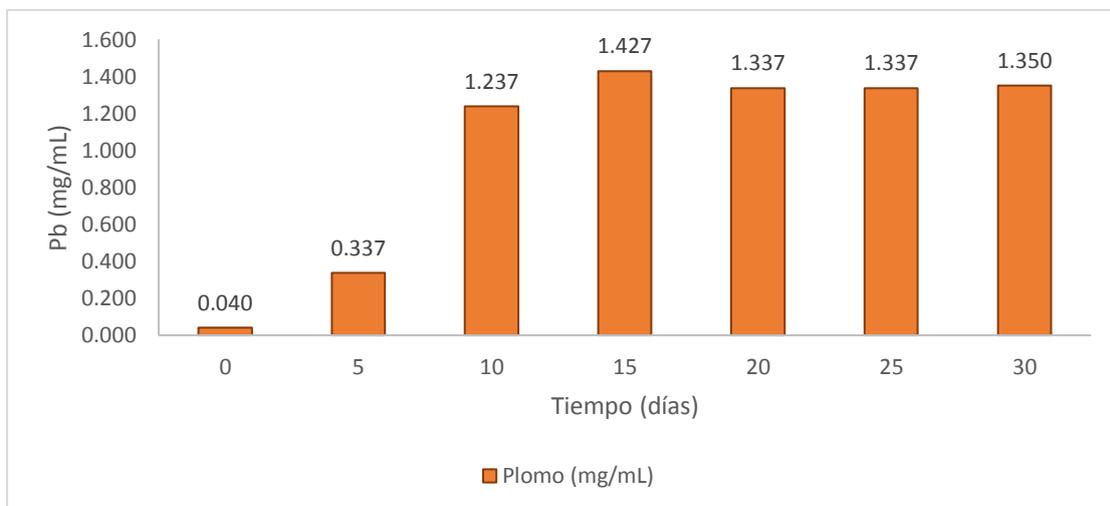


Figura 27. *Proceso de bioacumulación de plomo a 40°C de temperatura.*

La Figura 27, muestra la concentración de plomo bioacumulado por el consorcio bacteriano nativo aislado de relave minero tratado a una temperatura de 40 °C con agitación a 150 rpm y pH 2.1, con un recuento celular máximo de 2.79×10^8 cél/mL a los 15 días, observando un declive en la concentración celular a partir del día 15.

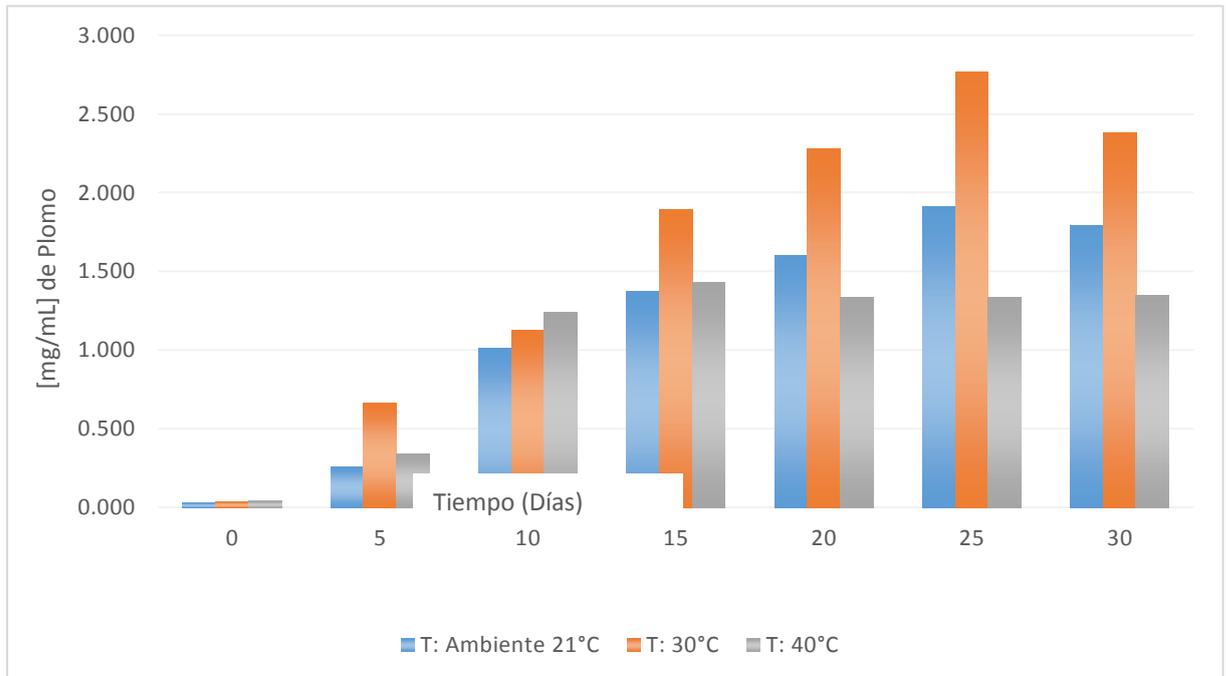


Figura 28. Comparación del proceso de bioacumulación de plomo (mg/mL) trabajado a diferentes valores de temperatura (ambiente, 30°C y 40 °C).

La figura 28 muestra una comparación entre los ensayos efectuados a diferentes temperaturas, donde la mayor efectividad del consorcio bacteriano se mostró una temperatura de 30 °C sobre las otras dos temperaturas trabajadas.

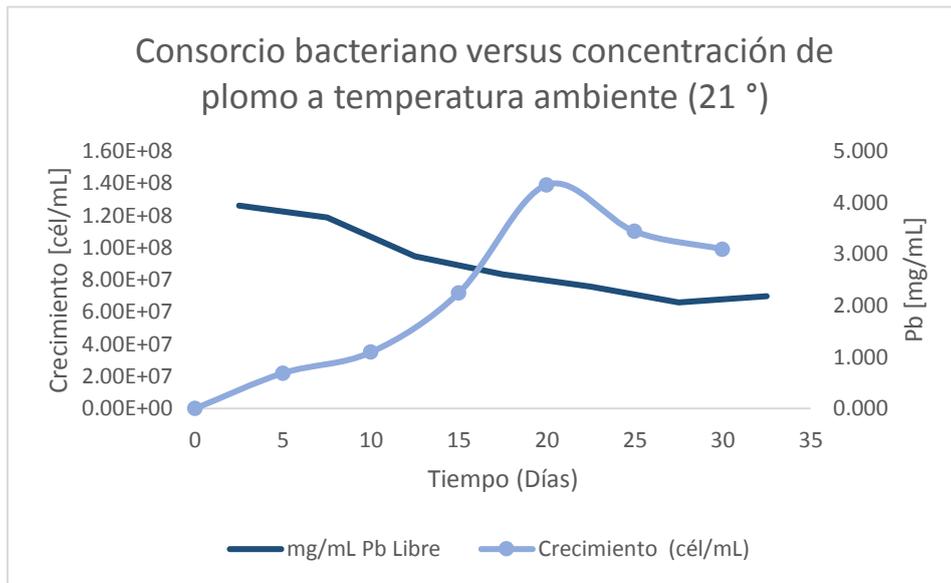


Figura 29. Comportamiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero versus la concentración de plomo en el medio de cultivo 9K durante el proceso de bioacumulación a una temperatura ambiente (21 °C), con una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.

La figura 29 muestra una comparación entre el crecimiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero versus la concentración del plomo durante el tiempo del proceso de bioacumulación a temperatura ambiente (21 °C), donde se observa la efectividad en el incremento de la biomasa y la poca disminución de la concentración de plomo.

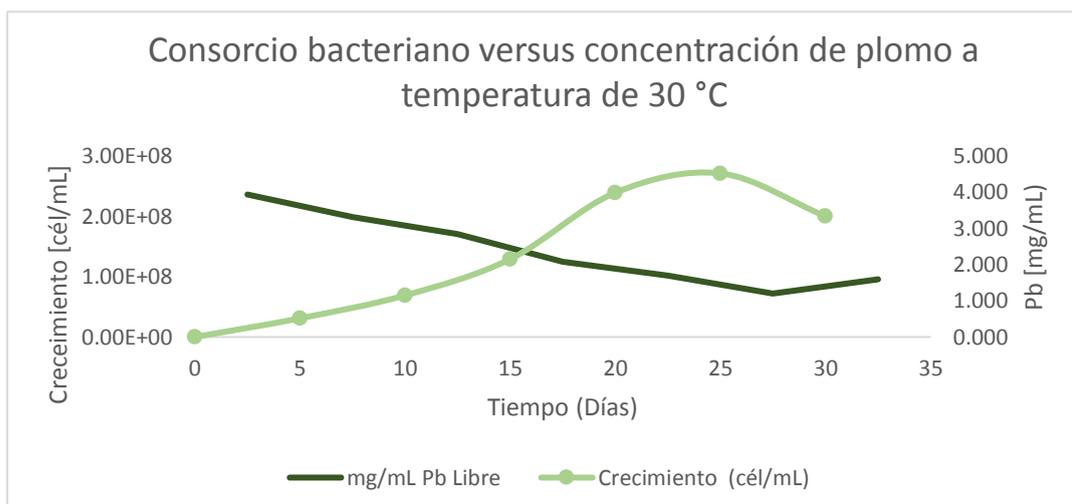


Figura 30. Comportamiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero versus la concentración de plomo en el medio de cultivo 9K durante el proceso de bioacumulación a una temperatura de 30 °C, con una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.

La figura 30 muestra una comparación entre el crecimiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero versus la concentración del plomo durante el tiempo del proceso de bioacumulación a temperatura de 30 °C, donde se observa con efectividad el incremento de la biomasa y una mayor disminución en la concentración de plomo.

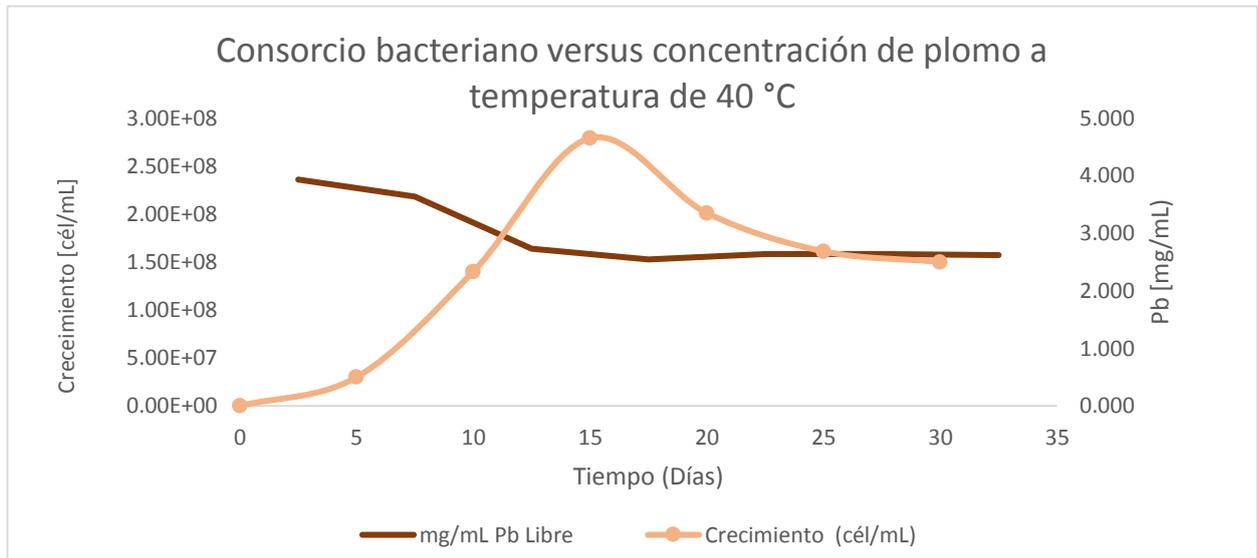


Figura 31. Comportamiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero Versus la concentración de plomo en el medio de cultivo 9K durante el proceso de bioacumulación a una temperatura de 40 °C, con una concentración inicial de plomo de 3.97 mg/mL.

La figura 31 muestra una comparación entre el crecimiento del consorcio bacteriano aislado del relave minero versus la concentración del plomo durante el tiempo del proceso de bioacumulación a temperatura de 40 °C, donde se observa con efectividad el incremento de la biomasa, pero una baja disminución en la concentración de plomo.

Por el contrario, Delgado, S., & Castillo, D. (2015) evaluó el efecto de la temperatura en el incremento microbiano y la biooxidación del hierro de la calcopirita por un consorcio microbiano, realizando 4 tratamientos experimentales a 25, 40, 55 y 70 °C, encontrándose en tratamiento experimental de 70 °C una mayor biooxidación de Fe^{2+} y mayor concentración microbiana, determinando estadísticamente que la temperatura no tuvo influencia en el incremento de biomasa ni en la biooxidación del hierro de la calcopirita.

Para Liu *et al.*, (2008) 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 bioacumulación, ante ello Sreekrishnan *et al.*, (1993) afirma que la temperatura es el parámetro individual más influyente en el proceso de bioacumulación. MacDonald y Clark (1970) demostraron que la disminución del pH en el medio influye en la temperatura para el crecimiento y oxidación de hierro por bacterias quimiolitautotróficas disminuyendo la eficacia en el proceso de bioacumulación.

4.4. Caracterización molecular del consorcio bacteriano

En este trabajo se describe el aislamiento de un consorcio bacteriano procedente de un relave minero a un PH de 2.1 y cultivado en medio 9k, con la capacidad de bioacumular plomo, para el tratamiento de relaves mineros, la cual se caracterizó molecularmente en el laboratorio INCA´BIOTEC S.A.C.

Se realizó la extracción del ADN genómico del consorcio bacteriano, adaptado a diferentes temperaturas (Ambiente (21°C), 30 °C y 40°C), 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 del consorcio bacteriano. El ADN extraído fue conservado a -20 °C hasta su amplificación por PCR dirigida al gen 16S ARNr. En la amplificación por PCR del consorcio bacteriano, usando los oligonucleótidos para bacterias, nos brinda resultados positivos.



Figura 32. Equipo de secuenciamiento de ADN bacteriano

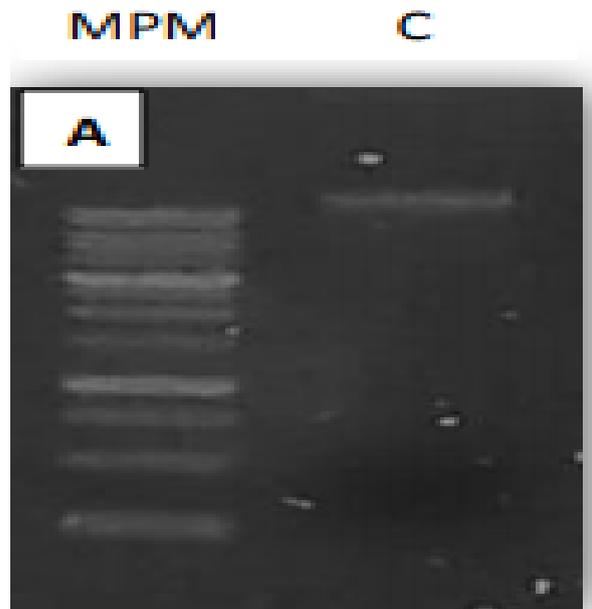


Figura 33. *Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) de los fragmentos obtenidos por PCR visualizado bajo un transiluminador de luz UV utilizando un Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb DNA Ladder (100- 3000pb), Control (C), A: Consorcio a bacteriano aislado de relave minero.*

En la figura 33, se muestra la amplificación de la región V4 del gen ARNr 16S para el dominio bacteria, la cual sería la más adecuada para identificar taxonómicamente hasta el nivel de género, esto es obtenido mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando los iniciadores universales para bacterias 515F y 806R para amplificar un fragmento de ADNr de 550 pb. En el cual el extremo 5' del oligonucleotido 515F, se añadió una secuencia adicional rica en GC de 40 nucleótidos (GC-pinza) para obtener las unidades taxonómicas operacionales (Muyzer *et al.*, 1993)

Las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) obtenidas fueron clasificadas taxonómicamente usando BLASTn, y comparadas con una base de datos derivada de Greengenes, RPDII y NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), en la cual se identifico al phylum: proteobacteria, clase: gammaproteobacterias, orden: *acidithiobacillus*, familia: *acidithiobacillaceae*, genero *acidithiobacillus*.

phylum	OIEPC
proteobacteria	36.7324171

class	OIEPC
gammaproteobacteria	34.0291027

order	OIEPC
Acidithiobacillales	29.3193209

family	OIEPC
Acidithiobacillaceae	22.367017

Genus 1/2	OIEPC
Acidithiobacillus	22.367017

Species	OIEPC
<i>acidithiobacillus thiooxidans</i>	8.2012935
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	2.1014225
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	0.8926340

El filo Proteobacteria es muy diverso; presenta grupos con casi todos los tipos de metabolismos, autótrofos, heterótrofos, aerobios, anaerobios quimiolitótrofos, quimiorganótrofos, mixótrofos, etc. es por eso que el estudio de la actividad metabólica resulta complicado, incluso en niveles taxonómicos como orden o familia (Madigan, 2004). Las bacterias *Acidithiobacillus* contienen un alto grado de heterogeneidad genética. Son bacilos, gram negativos, con forma de bastón y miden 0.5 a 1 micra y viven en un rango de PH de 1.3 a 3.5, y Sus cepas tienen un solo flagelo y pili tipo IV necesario para su movilidad desplazamiento y adherencia a los minerales. Tienen un genoma de 28106 pares de bases aproximadamente y un 55-65% de bases Guanina-Citosina (Huber, 1986).

Las especies del género *Acidithiobacillus* pertenecen a las subclases alfa, beta y gamma de las Proteobacterias. Las especies de *Acidithiobacillus* exhiben casi tanta diversidad en la composición y fisiología del ADN como se encuentra colectivamente en todos los demás grupos proteobacterianos. Sobre la base de los caracteres fisiológicos y las comparaciones de la secuencia del gen del ARNr 16S, se propone reasignar ocho de las

especies de *Acidithiobacillus* existentes a tres géneros recientemente designados dentro de la subclase gamma de las Proteobacterias, a saber, *Acidithiobacillus*, *Halothiobacillus* y *Thermithiobacillus* Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Coincidiendo así, con las características del consorcio aislado del relave minero (*Acidithiobacillus* sp) para la bioacumulación de plomo por sus diferentes mecanismos de supervivencia y adaptación al medio ambiente.

4.5. Análisis estadístico

Análisis descriptivo de las variables. Día 0.

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					Control	3		
Ambiente	3	,0300	,01732	,01000	-,0130	,0730	,02	,05
30°C	3	,0367	,02082	,01202	-,0150	,0884	,02	,06
40°C	3	,0400	,01732	,01000	-,0030	,0830	,02	,05
Total	12	,0317	,01642	,00474	,0212	,0421	01	06

Fuente: Elaboración propia. SPSS

La tabla permite observar los valores de la media, mínimo y máximo del Día 0, determinándose que existe diferencia leve en la temperatura 30°C a comparación de la temperatura ambiente y 40°C, lo que nos permite seguir con el tratamiento.

Análisis estadístico ANOVA de un factor. Día 0

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,001	3	,000	,824	,517
Dentro de grupos	,002	8	,000		
Total	,003	11			

La tabla nos muestra la prueba de comparación de medidas repetidas para evaluar el efecto de la bioacumulación de Pb. El estadístico de Fisher presenta un valor de $F=0.824$ el cual indica que no existe diferencia significativa en el día 0 porque no hay diferencia entre los grupos ni dentro los grupos de tratamiento.

Subconjuntos homogéneos. Día 0

HSD Tukey ^a		
TratamientoDía0	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Control	3	,0200
Ambiente	3	,0300
30°C	3	,0367
40°C	3	,0400
Sig.		,503

En la tabla, se muestra la prueba de Tukey en el día 0, que indica la presencia de tres tratamientos más un control (ambiente, 30 y 40) donde se muestra que el tratamiento control tiene un valor de 0.0200, el tratamiento ambiente muestra un valor de 0.0300 y el tratamiento de 40°C un valor de 0.400 siendo el que sobresale en el inicio del tratamiento de bioacumulación de plomo.

Análisis descriptivo de las variables. Día 15.

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	3	,0167	,01155	,00667	-,0120	,0454		
Ambiente	3	1,3700	,01000	,00577	1,3452	1,3948	,01	,03
30°C	3	1,8933	,08327	,04807	1,6865	2,1002	1,36	1,38
40°C	3	1,4267	,02082	,01202	1,3750	1,4784	1,80	1,96
Total	12	1,1767	,73190	,21128	,7116	1,6417	,01	1,96

Fuente: Elaboración propia. SPSS.

La tabla nos permite observar los diferentes valores de la media, mínimo y máximo del día 15, sobresaliendo el tratamiento a temperatura de 30°C, ya que la media es 1.9 a diferencia de las medias del tratamiento a temperatura de 40°C y ambiente.

Análisis estadístico ANOVA de un factor. Día 15

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,877	3	1,959	1031,099	,000
Dentro de grupos	,015	8	,002		
Total	5,892	11			

La Tabla ANOVA muestra que la significancia ($p = 000$ es inferior al nivel de significancia fijado (0,05), esto significa que hay diferencia significativa entre los tratamientos, ya que cada acumulación es diferente de cada tratamiento.

Subconjuntos homogéneos. Día 15

PbDía15				
HSD Tukey ^a				
TratamientoDía15	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Control	3	,0167		
Ambiente	3		1,3700	
40°C	3		1,4267	
30°C	3			1,8933
Sig.		1,000	,434	1,000

Esta tabla nos muestra que en los tratamientos de bioacumulacion a temperatura ambiente y a 40°C no hay diferencia significativa pues están acumulando lo mismo y a temperatura de 30°C por lo que en la gráfica se muestran juntos, mientras el tratamiento a temperatura de 30°C se encuentra en otro grupo por lo que se muestra que es diferente a los demás tratamientos establecidos, por lo que se concluye que en el tratamiento a 30°C hay mayor bioacumulacion de plomo.

Análisis descriptivo de las variables. Día 25.

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	3	,0233	,00577	,00333	,0090	,0377	,02	,03
Ambiente	3	1,9100	,02646	,01528	1,8443	1,9757	1,88	1,93
30°C	3	2,7700	,01000	,00577	2,7452	2,7948	2,76	2,78
40°C	3	1,3367	,01528	,00882	1,2987	1,3746	1,32	1,35
Total	12	1,5100	1,04297	,30108	,8473	2,1727	,02	2,78

Fuente: Elaboración propia. SPSS

La tabla nos permite observar los diferentes valores de la media, mínimo y máximo del día 25, sobresaliendo el tratamiento a temperatura de 30°C, ya que la media es 1.9 a diferencia de las medias del tratamiento a temperatura de 40°C que es 1.3 y ambiente que es 1.9.

Análisis estadístico ANOVA de un factor día 25

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11,963	3	3,988	14954,333	,000
Dentro de grupos	,002	8	,000		
Total	11,966	11			

Fuente: Elaboración propia. SPSS

Esta tabla muestra una significancia menos a 0.05 por lo que se concluye que, si hay diferencia entre los tratamientos a temperatura ambiente, 30°C y a 40°C

Subconjuntos homogéneos. día 25

PbDía25					
HSD Tukey ^a					
TratamientoDía25	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Control	3	,0233			
40°C	3		1,3367		
Ambiente	3			1,9100	
30°C	3				2,7700
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: Elaboración propia. SPSS

En esta tabla se muestra que hay diferencia entre los tratamientos a temperatura ambiente, temperatura 30°C y la temperatura de 40°C, en donde se concluye que la bioacumulacion de plomo es mayor en el tratamiento a temperatura ambiente.

5. CONCLUSIONES

- Se logró aislar el consorcio bacteriano de relave minero en el medio 9k.
- Se caracterizó el consorcio bacteriano aislado de relave minero de manera microscópica de los cuales mediante una tinción gram se logró identificar la morfología de *Acidithiobacillus sp*, obteniendo un cultivo homogéneo con una población idónea de bacterias para el tratamiento.
- Se logró identificar la especie del consorcio bacteriano mediante la técnica ARNr 16S metagenómica obteniéndose tres especies: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* y *Acidithiobacillus albertensis*.
- Se determinó la efectividad de la temperatura en los tratamientos realizados con el consorcio bacteriano en la bioacumulación de plomo, el tratamiento trabajado a temperatura de 30 °C muestra una efectividad significativamente alta en comparación al tratamiento trabajado a temperatura ambiente y 40 ° C, donde la bioacumulación de plomo es mayor.
- Se determinó que, a 30 °C, la biocumulación de plomo es mayor.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar análisis exhaustivo de la muestra del relave para identificar y cuantificar que tipos de minerales pudieran presentar la muestra en estudio.
- Reducir el tratamiento a 25 días ya que la bioacumulación de plomo se mantiene constante en el tiempo.
- Realizar más tratamiento variando PH en conjunto con la temperatura para obtener una mejor bioacumulación de plomo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias, V., Rodríguez, C., Ramírez, P., Nonones, E., Salazar, D., Gil, J., ... & Jamanca, G. (2012). Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 15(30), 59-66.
- Berthelsen, P., Steinnes, L. (1995). Enhanced bioaccumulation of heavy metal ions by bacterial cells due to surface display of short metal binding peptides. *Applied and environmental microbiology*, 65(3), 1092–1098.
- Bosecker, K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology reviews*, 20(3-4), 591-604.
- 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.
- Chen, S. Y., & Lin, J. G. (2001). Bioleaching of heavy metals from sediment: significance of pH. *Chemosphere*, 44(5), 1093-1102.
- Delgado, S., & Castillo, D. (2015). Influencia de la temperatura en el crecimiento de un consorcio microbiano y su capacidad biooxidativa sobre el hierro de la calcopirita. *Ecología Aplicada*, 18(1), 85-90.
- Deveci, H., Akcil, A. (2004). Bioleaching of complex zinc sulphides using mesophilic and thermophilic bacteria: comparative importance of pH and iron. *Hydrometallurgy*, 73(3), 293-303.
- EMIS (2021). In, On and for Emerging Markets https://www.emis.com/php/company-profile/PE/Denwood_Holdings_Peru_Metals_SAC_es_4150299.html
- Fein, T (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.

- Hallberg K.B. (2010). New perspectives in acid mine drainage microbiology. *Hydrometallurgy*, 104, 448 -453
- 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.
- Huber G. M. 1986, Isolation and characterization of new metal mobilizing bacteria. *Biotechnology and Bioengineering; Symp No. 16*: 239-251.
- 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.
- Johnson D, Hallberg K. The microbiology of acidic mine waters. *Research in Microbiology*. 2004;(154) 466-473.
- Kelly, D. P., & Wood, A. P. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(2), 511-516.
- Leon, V. (2017). Minería en el Perú. Realidad y Espectativas. Edit. El Comercio S.A. Lima. Perú.
- Ledin M. 2000. Bioaccumulation of metal by microorganisms-processes and importance for soil systems. *Earth Sci Rev.*, 51:1-31.
- López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2015). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología.
- Nicora, W. (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 159-175.
- 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. 13ª Ed. Benjamin Cummings, 24-46.

Madigan, T.M, 2004, “Biología de los microorganismos”, Prentice Hall. 10ª Edición. 2004.

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 (CuFeS_2), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1).

Mulligan G, Kamali A. (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.

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.

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.

Ortiz, A. (2012). Lixiviación Ácida de Minerales Oxidados de Cobre (Crisocola) con poca disolución de Fe al utilizar KHSO_4 . (tesis de pregrado). Universidad Autónoma de México, México DF- México.

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.

Osorio, V. M., Márquez, E. J., & Márquez, M. A. (2007). Caracterización por *Ardrea* de microorganismos acidófilos aislados en minas de oro de Marmato, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 14-21.

Ubillus, D. (2003). The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153(2), 315-324.

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.

Rawlings, D, Johnson, E. (2007). Heavy metal mining using microbes. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 65-91.

Reid, C. (2008). Life cycle assessment of mine tailings management in Canada. *ELSEVIER.*, 17(4), pp. 471 - 479.

Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., & Muñoz, J. A. (2001). Study of bacterial attachment during the bioleaching of pyrite, chalcopyrite, and sphalerite. *Geomicrobiology Journal*, 20(2), 131-141.

Roman, T. (2017). 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.

Saavedra, A. (2009). 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.

Skoog, D. A. y Leary, James J. (1994). Análisis Instrumental, Armenia: McGrawHill, 84-481.

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.

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.

Xiang, L., Liu, X., Zeng, J., Yin, C., Gao, J., Liu, J., & Qiu, G. (2010). Mechanism of enhanced bioleaching efficiency of *Acidithiobacillus ferrooxidans* after adaptation with chalcopyrite. *Hydrometallurgy*, 92(3), 95-101.

Vullo, H. (2003). *Análisis químico e instrumental moderno*. Reverté.

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

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.

Zabochnicka-Świątek, M., & Krzywonos, M. (2014). Potentials of Biosorption and Bioaccumulation Processes for Heavy Metal Removal. *Polish Journal of Environmental Studies*, 23(2).

8. ANEXOS

Anexo N° 01

• Prueba de homogeneidad de varianzas. Día 0

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl 1	gl 2	Sig.
P b D í a 0	Se basa en la media	1,043	3	8	,424
	Se basa en la mediana	,103	3	8	,956
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,103	3	6,377	,956
	Se basa en la media recortada	,892	3	8	,486

Esta tabla muestra que $P > 0.05$ por lo que se concluye que dentro de los tratamientos a temperatura ambiente, 30°C y 40°C no hay diferencia significativa dentro de las repeticiones.

• Pruebas post hoc. Día 0

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: PbDía0

HSD Tukey

(I) TratamientoDía0	(J) TratamientoDía0	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
Control	Ambiente	-,01000	,01374	,883	-,0540
	30°C	-,01667	,01374	,637	-,0607
	40°C	-,02000	,01374	,503	-,0640
Ambiente	Control	,01000	,01374	,883	-,0340
	30°C	-,00667	,01374	,960	-,0507
	40°C	-,01000	,01374	,883	-,0540
30°C	Control	,01667	,01374	,637	-,0273
	Ambiente	,00667	,01374	,960	-,0373
	40°C	-,00333	,01374	,995	-,0473
40°C	Control	,02000	,01374	,503	-,0240

Ambiente	,01000	,01374	,883	-,0340
30°C	,00333	,01374	,995	-,0407

Según el reporte de la tabla de ANOVA muestra $p > 0.05$ lo que demuestra que no hay diferencia entre los tratamientos, por lo tanto, la tabla de post hoc no muestra diferencia entre los tratamientos.

- **Prueba de homogeneidad de varianzas. Día 15**

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
PbDía15	Se basa en la media	6,619	3	8	,015
	Se basa en la mediana	1,462	3	8	,296
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,462	3	2,439	,405
	Se basa en la media recortada	6,009	3	8	,019

Esta tabla muestra que $P > 0.05$ por lo que se concluye que dentro de los tratamientos a temperatura ambiente, 30°C y 40°C no hay diferencia significativa dentro de las repeticiones.

- **Pruebas post hoc. Día 15**

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: PbDía15

HSD Tukey

(I) TratamientoDía15	(J) TratamientoDía15	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
Control	Ambiente	-1,35333*	,03559	,000	-1,4673
	30°C	-1,87667*	,03559	,000	-1,9906
	40°C	-1,41000*	,03559	,000	-1,5240
Ambiente	Control	1,35333*	,03559	,000	1,2394
	30°C	-,52333*	,03559	,000	-,6373
	40°C	-,05667	,03559	,434	-,1706
30°C	Control	1,87667*	,03559	,000	1,7627
	Ambiente	,52333*	,03559	,000	,4094
	40°C	,46667*	,03559	,000	,3527
40°C	Control	1,41000*	,03559	,000	1,2960
	Ambiente	,05667	,03559	,434	-,0573
	30°C	-,46667*	,03559	,000	-,5806

Según el reporte de la tabla de ANOVA muestra $p < 0.05$ lo que demuestra que hay diferencia

entre los tratamientos, por lo tanto, la tabla de post hoc muestra diferencia entre los tratamientos.

- **Prueba de homogeneidad de varianzas. Dia 25**

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
PbDía25	Se basa en la media	3,067	3	8	,091
	Se basa en la mediana	,648	3	8	,606
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,648	3	3,600	,628
	Se basa en la media recortada	2,788	3	8	,109

Esta tabla muestra que $P > 0.05$ por lo que se concluye que dentro de los tratamientos a temperatura ambiente, 30°C y 40°C no hay diferencia significativa dentro de las repeticiones.

- **Pruebas post hoc. Dia 25**

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: PbDía25

HSD Tukey

(I) TratamientoDía25	(J) TratamientoDía25	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
Control	Ambiente	-1,88667*	,01333	,000	-1,9294
	30°C	-2,74667*	,01333	,000	-2,7894
	40°C	-1,31333*	,01333	,000	-1,3560
Ambiente	Control	1,88667*	,01333	,000	1,8440
	30°C	-,86000*	,01333	,000	-,9027
	40°C	,57333*	,01333	,000	,5306
30°C	Control	2,74667*	,01333	,000	2,7040
	Ambiente	,86000*	,01333	,000	,8173
	40°C	1,43333*	,01333	,000	1,3906
40°C	Control	1,31333*	,01333	,000	1,2706
	Ambiente	-,57333*	,01333	,000	-,6160
	30°C	-1,43333*	,01333	,000	-1,4760

Según el reporte de la tabla de ANOVA muestra $p > 0.05$ lo que demuestra que no hay diferencia entre los tratamientos, por lo tanto, la tabla de post hoc no muestra diferencia entre los tratamientos.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA BIOACUMULACIÓN DE PLOMO MEDIANTE UN CONSORCIO BACTERIANO (Acidithiobacillus sp.) AISLADO A PARTIR DE RELAVE MINERO.

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%

INDICE DE SIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.concytec.gob.pe Fuente de Internet	2%
2	www.minem.gob.pe Fuente de Internet	2%
3	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	cybertesis.urp.edu.pe Fuente de Internet	1%
8	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	1%

9	www.revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	1 %
10	Submitted to Infile Trabajo del estudiante	<1 %
11	repositorio.unc.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
12	Submitted to Universidad Continental Trabajo del estudiante	<1 %
13	revistas.unicolmayor.edu.co Fuente de Internet	<1 %
14	www.clubensayos.com Fuente de Internet	<1 %
15	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
16	repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
17	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
18	Submitted to Escuela Politecnica Nacional Trabajo del estudiante	<1 %
19	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
20	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

21	revistas.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
22	repositorio.upsc.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
23	repositorio.usanpedro.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
24	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
25	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
26	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
27	repositorio.uct.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
28	repositorio.unasam.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
29	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
30	repositorio.ute.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
31	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1 %
32	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %

33	repositorio.upn.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
34	Submitted to Indiana University Trabajo del estudiante	<1 %
35	revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
36	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	<1 %
37	repositorio.ufscar.br Fuente de Internet	<1 %
38	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
39	Submitted to Elizabethtown College Trabajo del estudiante	<1 %
40	F Covacevich, RI Silva, AC Cumino, G Caló, RM Negri, GL Salerno. "First archaeal rDNA sequences from Argentine coastal waters: Unexpected PCR characterization using eukaryotic primers", Ciencias Marinas, 2012 Publicación	<1 %
41	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
42	repositorio.undac.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

43

Submitted to Royal Holloway and Bedford
New College

Trabajo del estudiante

<1 %

44

Fábio Nakano. "Solver de alto desempenho
para problemas na forma angular blocada
aninhada", Universidade de Sao Paulo,
Agencia USP de Gestao da Informacao
Academica (AGUIA), 1999

Publicación

<1 %

45

repositorio.ug.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

46

Rosana García De La Fuente. "Caracterización
y uso de compost de alperujo como
enmienda orgánica. Evaluación agronómica y
medioambiental", Universitat Politecnica de
Valencia, 2011

Publicación

<1 %

47

WWW.fda.gov

Fuente de Internet

<1 %

48

id.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

49

repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx

Fuente de Internet

<1 %

50

www.antamina.com

Fuente de Internet

<1 %

51	Jin-lan Xia. "Isolation and characterization of acidophilic bacterium from Dongxiangshan Mine in Xinjiang Province, China", Journal of Central South University of Technology, 02/2010 Publicación	<1 %
52	Submitted to Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion Trabajo del estudiante	<1 %
53	biblioveteblog.files.wordpress.com Fuente de Internet	<1 %
54	repositorio.ucundinamarca.edu.co Fuente de Internet	<1 %
55	www.bcn.cl Fuente de Internet	<1 %
56	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
57	1library.co Fuente de Internet	<1 %
58	repository.tudelft.nl Fuente de Internet	<1 %
59	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
60	repositorio.unac.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

61	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
62	www.nlnw.nsw.edu.au Fuente de Internet	<1 %
63	idoc.pub Fuente de Internet	<1 %
64	quipu.uni.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
65	repositorio.udl.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
66	repositorio.unemi.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
67	www.repositorio.ufrn.br:8080 Fuente de Internet	<1 %
68	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
69	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	<1 %
70	bibliotecas.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
71	publicaciones.usanpedro.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
72	repositorio.unfv.edu.pe	

Fuente de Internet

<1 %

73

revistas.unal.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

74

www.conacyt.ciateq.mx

Fuente de Internet

<1 %

75

www.usc.es

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo