

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Escuela de Posgrado

MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE

**FACTORES ASOCIADOS AL INCREMENTO DE POBLACIÓN
BACTERIANA QUE INTERVIENEN EN LA OXIDACIÓN
DE SULFUROS DE COBRE DE BAJA LEY
EN TANQUES BIOREACTORES**

TESIS

PRESENTADA POR:

JORGE LUIS DURAN FLORES

Para optar el Grado Académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS (*MAGISTER SCIENTIAE*) CON MENCIÓN
EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE**

TACNA - PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA

Escuela de Posgrado

MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL Y DESARROLLO SOSTENIBLE

**FACTORES ASOCIADOS AL INCREMENTO DE POBLACIÓN BACTERIANA
QUE INTERVIENEN EN LA OXIDACIÓN DE SULFUROS DE COBRE
DE BAJA LEY EN TANQUES BIOREACTORES**

Tesis sustentada y aprobada el 15 de junio del 2019; estando el jurado calificador integrado por:


PRESIDENTE:



.....

Dr. Tolomeo Raúl Soto Pérez


SECRETARIO:



.....

M.Sc. Avelino Godofredo Pari Pinto

MIEMBRO:



.....

Dr. Elí Joaquín Espinoza Atencia

ASESOR:



.....

Dr. Elí Joaquín Espinoza Atencia

DEDICATORIA

A mi mamá Helga, con eterna gratitud por su amor, comprensión y apoyo todos estos años de mi vida, gracias mamá. Y a mis amigos, compañeros de trabajo y toda mi familia que me motivaron a darle prisa a lograr mis objetivos trazados en mi vida profesional.

CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA.....	iii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	01
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.1 Descripción del problema	02
1.1.1 Antecedentes del problema	02
1.1.2 Problemática de la investigación	02
1.2 Formulación del problema	03
1.3 Justificación del problema	03
1.4 Alcances y limitaciones.....	03
1.5 Objetivos.....	03
1.5.1 Objetivo general.....	03
1.5.2 Objetivo específicos.....	04
1.6 Hipótesis	04
1.6.1 Hipótesis general	04
1.6.2 Hipótesis específicos:	04
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes del estudio	05
2.2 Bases teóricas	07
2.3 Definición de términos	22
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	
3.1 Tipo y diseño de la investigación	25
3.2 Población y muestra	26
3.3 Operacionalización de variables	26

3.4	Técnicas e instrumentos para recolección de datos	27
3.4.1	Acciones y actividades para la obtención de resultados.....	27
3.4.2	Materiales y/o instrumentos	28
3.5	Procesamiento y análisis de datos	39
3.5.1	Procedimiento para la determinación de ión ferroso.....	39
3.5.2	Procedimiento para la determinación de la viabilidad bacteriana en soluciones de percolación	39
CAPÍTULO IV: MARCO FILOSÓFICO		
	Marco Filosófico	42
CAPÍTULO V: RESULTADOS		
	Resultados	43
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN		
	Discusión	52
	CONCLUSIONES	53
	RECOMENDACIONES	55
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
	ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Temperaturas de acuerdo al tipo de microorganismos.	10
Tabla 2.	Población de estudio y tamaño de muestra	26
Tabla 3.	Muestra, instrumentos, materiales y técnicas de la metodología a seguir	27
Tabla 4.	Ejemplos de medios de cultivo para bacterias	33
Tabla 5.	Promedios de pH, Temperatura (K) y Potencial Eh (mV).....	43
Tabla 6.	Verificación de hipótesis general.....	44
Tabla 7.	Tratamiento de los Betas de la Ecuación	45
Tabla 8.	Resultados de la hipótesis específica - pH.....	46
Tabla 9.	Resultados de la hipótesis específica – Temperatura (K)	47
Tabla 10.	Resultados de la hipótesis específica – Potencial Eh (mV).....	48
Tabla 11.	Cálculo de generación de ácido (Recuperación de consumo de reactivo H ₂ SO ₄)	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano	08
Figura 2. Tanque bioreactor de 100 m ³	25
Figura 3. pH-metro	29
Figura 4. Potenciómetro	30
Figura 5. Baño María para prueba de viabilidad bacteriana	32
Figura 6. Prueba de finalización de la viabilidad bacteriana	32
Figura 7. Autoclave	35
Figura 8. Cámara de Neubauer.....	36
Figura 9. Vista en el microscopio para el recuento bacteriano	37
Figura 10. Prueba de conteo bacteriano mediante diluciones sucesivas	38
Figura 11. Finalización de la prueba de diluciones sucesivas	38
Figura 12. Tendencia de pH de los depósitos lixiviables.....	50
Figura 13. Tendencia de Eh de los depósitos lixiviables.....	50
Figura 14. Tendencia de la temperatura de los depósitos lixiviables de Toquepala, Totoral y 3250.	51
Figura 15. Tendencia de la temperatura de los depósitos lixiviables de Nor Oeste, Quebalix y Raff Sur.....	51

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar qué factores se encuentran asociados al incremento de población bacteriana en sulfuros de cobre de baja ley, para que de esta manera dichos factores puedan ser controlados de manera óptima en tanques bioreactores, ya que en los botaderos de lixiviación las condiciones de adecuación para el crecimiento de dichas bacterias favorables para el proceso y beneficiosas al medio ambiente, son deficientes. El tipo de investigación es de nivel básico y longitudinal cuyo instrumento de medición se basa en una data histórica para su mayor interpretación. Los resultados indicaron que dichos factores son muy importantes de controlar para que de esta manera se logre un crecimiento de la población bacteriana (*Acidithiobacillus ferroxidans*), dichas bacterias son las encargadas de fijar el CO₂ al mineral y por ende hay menor emisión de CO₂ al medio ambiente y además dichas bacterias en mención logran producir una serie de reacciones, una de las cuales es producir ácido sulfúrico H₂SO₄ y con ello se pudo minimizar el consumo de dicho reactivo en el proceso. Cabe mencionar que el proceso de biolixiviación es un proceso amigable al medio ambiente ya que al tener bacterias nativas que pueden dar mucho beneficio de acelerar el proceso de lixiviación en el caso de sulfuros de cobre de baja ley, dan a contribuir el cuidado del medio ambiente, por lo que aquí se observa qué factores intervienen en su crecimiento para poder optimizarlos y adicionalmente el proceso de lixiviación es un proceso de circuito cerrado ya que todo su sistema es de recirculación, por ende no hay generación de relaves.

Palabras clave: Biolixiviación, Crecimiento de población bacteriana, oxidación de sulfuros de cobre, *Acidithiobacillus ferroxidans*

ABSTRACT

The objective of this research was to determine which factors are associated with the increase of the bacterial population in low grade copper sulphides, so that these factors can be controlled optimally in bioreactor tanks, since in the waste dumps Leaching the conditions of adaptation for the growth of such favorable bacteria for the process and beneficial to the environment, are deficient, The type of research is basic and longitudinal level whose measurement instrument is based on a historical data for further interpretation. The results indicated that these factors are very important to control in order to achieve a growth of the bacterial population (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), these bacteria are responsible for fixing the CO₂ to the mineral and therefore there is less emission of CO₂ into the environment environment and also said bacteria in fact manage to produce a series of reactions, one of which is to produce sulfuric acid H₂SO₄ and with it we were able to minimize the consumption of said reagent in the process. I must mention that the bioleaching process is a process friendly to the environment because having native bacteria that can give a lot of benefit to accelerate the leaching process in the case of low grade copper sulfides, they contribute to the care of the environment so here we see what factors are involved in their growth to optimize them and additionally the leaching process is a closed circuit process since its entire system is recirculation, therefore there is no generation of tailings.

Key words: Bioleaching, Growth of the bacterial population, oxidation of copper sulphides, *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

INTRODUCCIÓN

La biolixiviación es un proceso en el cual se emplean microorganismos para disolver los minerales, en este caso de sulfuros de cobre de baja ley. Es una tecnología amigable con el medio ambiente, ya que como todo su sistema es en recirculación no genera relaves.

La biolixiviación microbiana ocurre con diferentes factores relacionados tales como pH (1-2), potencial Eh (mV) (500-700) y temperatura (298,15 K-313,15 K). En este proceso ciertos microorganismos oxidan los sulfuros de cobre de baja ley a través de mecanismos de acción directa e indirecta, entre los cuales destacan principalmente el *Acidithiobacillus ferroxidans* y *Acidithiobacillus thioxidans*. Estos microorganismos utilizan como fuente primaria de energía las especies reducidas de fierro y azufre, y el CO₂ como fuente de carbono para su síntesis celular (Rivadeneira, 2006).

En el presente trabajo se determinó el grado de relación de los factores relacionados al incremento de población bacteriana en sulfuros de cobre de baja ley cultivados en tanques bioreactores.

El análisis de los resultados fue realizado en el programa Excel y procesados utilizando el programa estadístico SPSS-25, utilizando la prueba ANOVA.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

1.1.1 Antecedentes del problema

En el proceso de biolixiviación se encuentran bacterias nativas muy beneficiosas para lograr la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley, pero para su crecimiento se requieren ciertos factores que deben estar muy relacionados y controlados de manera óptima para lograr un incremento de dicha población bacteriana a fin de aumentar la velocidad de oxidación de dichos sulfuros y de esta manera se puede reducir el consumo de ácido sulfúrico que se requiere en la lixiviación de cobre ya que además de generar las bacterias (*Acidithiobacillus ferroxidans*), su propio ácido, estas también fijan el CO₂ al mineral y de esta manera hay menor emisión de CO₂ al medio ambiente contribuyendo así para la reducción del efecto invernadero y por ende el calentamiento global.

1.1.2 Problemática de la investigación

Hay muchos factores que se encuentran asociados al crecimiento bacteriano, y para lograr un crecimiento óptimo se deben tener las condiciones adecuadas para dicho crecimiento, y en los depósitos lixiviables de cobre no se dan estas condiciones en vista que están expuestas a las condiciones del ambiente, los cuales son bastante inestables, por ello es que se requiere contar con tanques bioreactores para optimizar dicho crecimiento y conocer dichos factores que se encuentran asociados a ello. En base a una data histórica se identificarán qué factores se encuentran asociados a dicho crecimiento.

1.2 Formulación del problema

¿Cuáles son los factores que intervienen en el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques biorreactores?

1.3 Justificación del problema

La siguiente investigación se realiza con la finalidad de asociar los factores que intervienen en el crecimiento de población bacteriana, el cual ayudará en la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley que serán cultivados en tanques bioreactores. Es muy importante en el proceso de lixiviación férrico bacteriana para incrementar la velocidad de oxidación de sulfuros de cobre de baja ley.

1.4 Alcances y limitaciones

La siguiente investigación se realiza con la finalidad de asociar los factores que intervienen en el crecimiento de población bacteriana, el cual ayudará en la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley que serán cultivados en tanques bioreactores. Es muy importante en el proceso de lixiviación férrico bacteriana para incrementar la velocidad de oxidación de sulfuros de cobre de baja ley.

Sus limitaciones obedecen a las siguientes razones: Dichos tanques bioreactores están ubicados en la Planta de Lixiviación de Toquepala, por lo que está limitada su accesibilidad, no se cuenta con mucho tiempo disponible y escasos recursos para poder construir un tanque bioreactor para realizar nuevas pruebas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Relacionar los factores que intervienen en el crecimiento de población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores.

1.5.2 Objetivo específicos

Relacionar el pH con el crecimiento de población bacteriana en la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques biorreactores.

Relacionar la temperatura con el crecimiento de población bacteriana en la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques biorreactores.

Relacionar el potencial con el crecimiento de población bacteriana en la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques biorreactores.

1.6 Hipótesis

1.6.1 Hipótesis general

El pH, la temperatura y el potencial son factores que se relacionan significativamente con el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques biorreactores.

1.6.2 Hipótesis específicas

El pH es uno de los factores más importantes que se relaciona significativamente con el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores.

La temperatura es uno de los factores más importantes que se relaciona significativamente con el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores.

El potencial es uno de los factores más importantes que se relaciona significativamente con el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

Rivera, R.E.; Camejo, P.Y.; Moya F.J.; López-Méndez, J.L.; Munguía-Bravo, M.; Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México, Unidad Minera La Caridad, México. Estudio de Biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias Tio y ferro-oxidantes en condiciones termófilas.

La solubilización de los constituyentes de un mineral por acción bacteriana es conocida como biolixiviación. Este tipo de extracción es utilizado comercialmente en la lixiviación de minerales de sulfuros de cobre secundarios, además de ser responsable de la generación de drenaje ácido de mina. El objetivo de esta investigación fue encontrar cepas bacterianas termófilas capaces de oxidar especies reducidas de hierro y azufre para su aplicación en la lixiviación de minerales de sulfuros de cobre de baja ley. Para ello, se obtuvieron cultivos a partir de cepas termófilas tio- y ferro-oxidantes nativas de la mina La Caridad (México), midiéndose periódicamente pH, ORP, conductividad, concentración de ion ferroso y crecimiento bacteriano. Posteriormente, se adaptaron al mineral lixiviable de La Caridad, bajo esta condición. Finalmente, se seleccionaron las cepas y condiciones en que éstas se adaptaron mejor al mineral para realizar pruebas de biolixiviación en columnas construidas bajo la norma ASTM-D5744.

Vladimir Arias A., Daniel Lovera D., Jorge Diego C., Juan Gil R., Luis Ramírez O., Hans Cayo Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográfica UNMSM. Biooxidación

de tiosulfato como mecanismo indirecto para la lixiviación de minerales mediante cepas nativas acidófilas.

Los mecanismos de conversión a azufre elemental, sulfitos, sulfatos y otros; son diversos, conllevando a la formación de ácido sulfúrico y por ende, a la acidificación del medio. En base a estas características, las bacterias acidófilas son consideradas como quimiolitótrofas de azufre, ya que obtienen su energía a partir de la conversión de compuestos de azufre y, en la mayoría de los casos, el producto final es el sulfato. El ácido formado por estas bacterias que oxidan los sulfuros es el ácido sulfúrico. Del mismo modo, las bacterias aisladas de drenajes ácidos, durante su acción metabólica, generan la disminución del pH. El género *Thiobacillus* es relevante entre los demás por su capacidad de oxidar compuestos azufrados, produciendo azufre elemental de manera extracelular. La energía necesaria para llevar a cabo sus funciones se deriva de la oxidación de uno o más compuestos reducidos de azufre incluyendo sulfuro y tiosulfato. En el estudio de la oxidación del tiosulfato se observó el incremento de la población bacteriana hasta $8,6 \times 10^8$ cel/ml y potenciales de óxido reducción (ORP) de hasta 615 mV a valores de pH entre 1,8 y 2,2 y a concentraciones de tiosulfato de 2,2 g/L. El mayor incremento poblacional de la bacteria se obtuvo en periodos de 10 y 15 días de evolución. El monitoreo del potencial permitió identificar el estado de funcionamiento que tiene el sistema sulfoxidante. Se encontró una relación directa entre el ORP y la población bacteriana.

De Barrios Lima, R., Francisco Pereira, G., Cesario De Amaral, I., Santos Sobral, L., *Revistas Científicas Scielo*, received for review April 7th, 2011, accepted August 10th, 2011, final version August, 28th, (2011). Biolixiviación de Concentrado de Flotación de sulfuros de cobre en sistema de reacción en barcada utilizando microorganismos mesófilos y termófilos.

Este trabajo tiene como objetivo optimizar el uso de consorcios de microorganismos mesofílicos y termofílicos (moderados y extremos) en el

proceso de lixiviación de concentrado de flotación de sulfuro de cobre, conteniendo aproximadamente 30 % de bornita (Cu_5FeS_4) el 70 % de calcopirita (CuFeS_2), para la extracción de cobre. El objetivo de los experimentos de la biolixiviación fue evaluar el desempeño de esos microorganismos, variando parámetros específicos como: composición de la solución lixivante, presencia de fuentes de energía (sulfato ferroso) y la inoculación de culturas. Para asegurar las condiciones óptimas para la actuación de los microorganismos fueron controlados valores de pH, temperatura, y velocidad de agitación. Finalmente, por acción microbiana y utilización de fertilizantes agrícolas (fuente de N, P, K), la extracción de cobre alcanzada fue superior a 85 %.

S. Porro, J.L. Boiardi, P.H: Tedesco Biolixiviación de minerales argentinos de cobre. En este trabajo se compara el comportamiento de los principales minerales argentinos de cobre, a base de sulfuros, en el proceso de lixiviación bacteriana. Las técnicas utilizadas fueron las de frascos agitados y columnas percoladoras con aireación forzada. Se analizó el efecto de distintas variables, tales como pH, tamaño de partícula y diferentes cepas de *Thiobacillus ferrooxidans*. Los resultados obtenidos permiten predecir la excelente aplicabilidad industrial del procedimiento, habiéndose logrado extracciones que van del 35 al 90 %, en un lapso de 50 días, utilizando columnas percoladoras. Se analizan estos resultados en función de la composición química y mineralógica de las muestras.

2.2 Bases teóricas

Ciclo De Crecimiento De Poblaciones

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Figura 1):

Fase latencia o de adaptación: Según Acevedo, F.; Gentina, J.C.; Illanes, A. (2002) Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial.

Fase exponencial o logarítmica: Según Acevedo, F.; Gentina, J.C.; Illanes, A. (2002) en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. La evolución del número de células durante esta fase se explica con el modelo matemático descrito anteriormente. Esta fase corresponde a la de infección y multiplicación dentro del organismo del agente infeccioso.

Fase estacionaria: Según Acevedo, F.; Gentina, J.C.; Illanes, A. (2002) dice que en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias.



Figura 1. Curva de crecimiento microbiano

Fuente: Esta figura se ha tomado del libro del autor: Acevedo, F.; Gentina, JC; Illanes, A. Fundamentos de Ingeniería Bioquímica, Ediciones Universitarias de Valparaíso. PUCV. (2002).

Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales.

Fase de muerte: Según Acevedo, F.; Gentina, J.C.; Illanes, A. (2002) se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo. Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, sólo se puede seguir utilizando unos sistemas de detección especiales siendo el más sencillo, la medida del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

Factores físicos y químicos que influyen en el crecimiento de la población bacteriana

Temperatura: Según Brock (2004) cada microorganismo tiene una temperatura de crecimiento adecuada. Si se considera la variación de la velocidad de crecimiento en función de la temperatura de cultivo, se puede observar una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento; a temperaturas mayores se produce un incremento lineal de la velocidad de crecimiento con la temperatura de cultivo hasta que se alcanza la temperatura óptima a la que la velocidad es máxima. Por encima de esta temperatura óptima, la velocidad de crecimiento decae bruscamente y se produce la muerte celular. El aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura. Se denomina coeficiente de temperatura a la relación entre el incremento de la velocidad de reacción y el de temperatura. En términos generales, la velocidad de las reacciones bioquímicas suele aumentar entre 1,5

y 2,5 veces al aumentar 283 K la temperatura a la que tienen lugar. La falta de crecimiento a temperaturas bajas se debe a la reducción de la velocidad de las reacciones bioquímicas y al cambio de estado de los lípidos de la membrana celular que pasan de ser fluidos a cristalinos impidiendo el funcionamiento de la membrana celular. La muerte celular a altas temperaturas se debe a la desnaturalización de proteínas y a las alteraciones producidas en las membranas lipídicas a esas temperaturas. Es importante tener en cuenta que, a temperaturas bajas, el metabolismo celular es lento y las células paran de crecer; aunque suelen morir. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a la óptima, se produce la muerte celular rápidamente y las células no pueden recuperar su capacidad de división si baja posteriormente la temperatura. Esto permite esterilizar por calor y no por frío. Hay varios tipos de microorganismos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima (Ver Tabla 1).

Tabla 1

Temperaturas de acuerdo al tipo de microorganismos.

Tipo de microorganismo	Temperatura mínima	Temperatura óptima	Temperatura máxima
Psicrófilo	-5 +5	12 - 15	15 - 20
Psicrótrofo	-5 +5	25 - 30	30 - 35
Mesófilo	5 - 15	30 - 45	35 - 47
Termófilo	40 - 40	55 - 75	60 - 90

Fuente: Esta tabla se ha tomado como referencia del libro del autor: Brock, *Biología de los microorganismos*, Pearson Prentice Hall, México 2004,

Los microorganismos psicrótrofos son mesófilos que pueden crecer a temperaturas bajas. Por tanto, se les puede considerar como psicrófilos facultativos. Esto es importante desde el punto de vista aplicado porque cuando se encuentran contaminando alimentos, son capaces de crecer en condiciones de refrigeración (277,15 – 281,15 K) y de producir infecciones en los consumidores del alimento (303,15 – 308,15 K). Desde el punto de vista clínico,

los microorganismos capaces de producir infecciones en pacientes son los mesófilos y algunos psicrótrofos ya que sus temperaturas óptimas de crecimiento coinciden con las corporales.

pH: Según Brock (2004) es un parámetro crítico en el crecimiento de microorganismos ya que cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH en el que puede vivir adecuadamente, fuera de este rango muere. El pH intracelular es ligeramente superior al del medio que rodea las células ya que, en muchos casos, la obtención de energía metabólica depende de la existencia de una diferencia en la concentración de protones a ambos lados de la membrana citoplásmica. El pH interno en la mayoría de los microorganismos está en el rango de 6,0 a 8,0.

Los rangos de pH tolerables por diferentes tipos de microorganismos son, también, distintos. Hay microorganismos acidófilos que pueden vivir a pH=1,0 y otros alcalófilos que toleran pH=10,0 Hay que considerar que, como consecuencia del metabolismo, el pH del medio de crecimiento suele tender a bajar durante el cultivo. Por otra parte, la bajada del pH del medio que producen ciertos microorganismos les confiere una ventaja selectiva frente a otros competidores. Así, por ejemplo, las bacterias lácticas que producen grandes cantidades de ácido láctico como consecuencia de su metabolismo primario reducen el pH del medio a valores inferiores a los soportables por otras bacterias competidoras (llegan a bajar el pH del medio hasta 4,5). De esta forma, las bacterias competidoras mueren y las lácticas se convierten en la población dominante. La bajada del pH se puede deber a varios factores, uno de los cuales es la liberación de ácidos orgánicos de cadena corta (fórmico, acético, láctico) por ciertas bacterias. En este sentido, hay que tener en cuenta que la acción bactericida de estos ácidos orgánicos de cadena corta es más potente que la debida únicamente a la bajada del pH que producen. Esto es, los ácidos orgánicos de cadena corta son tóxicos para algunas bacterias por sí mismos. El efecto letal del pH ácido sobre los microorganismos tiene aplicación en la conservación de alimentos acidificándolos. De esta forma, la adición de

ácido acético en forma de vinagre permite la conservación de alimentos perecederos (escabeches, por ejemplo) y la producción de ácidos en el curso de fermentaciones naturales permite alargar la vida de los alimentos (coles fermentadas, por ejemplo).

Potencial redox: Según Brock (2004) indica la capacidad del sustrato para aceptar o donar electrones, esto es: sus características oxidantes o reductoras. Uno de los factores que intervienen en el potencial redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno [O₂]. Hay microorganismos que requieren ambientes oxidantes para crecer, mientras que otros necesitan ambientes reductores. El metabolismo de ambos tipos de microorganismos presenta diferencias notables. El requerimiento de condiciones oxidantes o reductoras no debe confundirse con la necesidad de presencia o ausencia de oxígeno para que se produzca el crecimiento. En general, cuando un microorganismo requiere un ambiente oxidante se dice que desarrolla un metabolismo oxidativo (o respirativo) mientras que los microorganismos que requieren ambientes reductores (o menos oxidantes) realizan un metabolismo fermentativo. Un microorganismo es aerobio cuando necesita oxígeno para vivir y es anaerobio cuando o bien no lo necesita (anaerobios facultativos como las bacterias entéricas, o como *Saccharomyces cerevisiae*; o anaerobios aerotolerantes como las bacterias lácticas) o cuando muere en presencia de oxígeno (anaerobios estrictos como los clostridios).

Hay microorganismos que, aunque viven en presencia de oxígeno, no son capaces de utilizarlo como aceptor final de electrones y deben desarrollar un metabolismo fermentativo (los estreptococos, por ejemplo.) Por otra parte, hay microorganismos que pueden desarrollar ambos tipos de metabolismo. Esto es: en presencia de oxígeno desarrollan un metabolismo oxidativo y en su ausencia, fermentativo. El rendimiento de los procesos fermentativos es menor que el de los respirativos: las bacterias y las levaduras crecen menos cuando lo hacen fermentando que cuando lo hacen respirando. En el curso de ciertas reacciones metabólicas redox se forman compuestos altamente reactivos

(radicales libres, formas superóxido) que pueden dañar las proteínas, membranas y ácidos nucleicos produciendo la muerte de las células. Las células se defienden de estos compuestos reactivos mediante las enzimas siguientes: Superóxido dismutasa (SOD) y catalasa. Los anaerobios estrictos carecen de SOD y de catalasa o tienen niveles muy bajos de estas enzimas de forma que no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno. La detección de estas enzimas tiene valor taxonómico.

Mecanismo de la Acción Bacterial

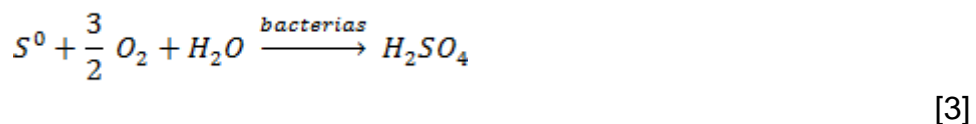
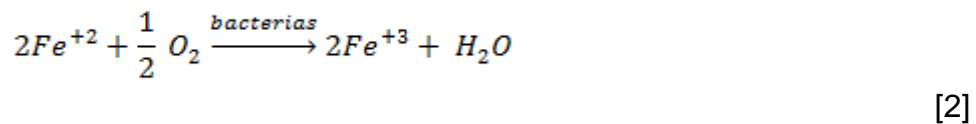
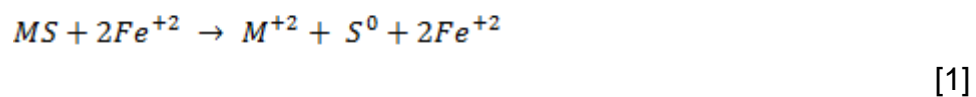
Oxidación de Sulfuros Metálicos.- Según Fidel Sergio Misari, se debe en primer lugar distinguir entre experimentos realizados en presencia del ión Fe^{+3} , es sabido que el Fe^{+3} es un buen agente lixivante de los sulfuros metálicos al menos de una gran parte de ellos, siendo el *Thiobacillus Ferrooxidans* capaz de regenerar el ión Fe^{+3} resulta obvio suponer que esta bacteria contribuirá a la lixiviación de los sulfuros manteniendo una alta concentración de ión Fe^{+3} en solución. Por otra parte, el ataque oxidante del ión Fe^{+3} produce S^0 como subproducto, dicho S^0 permanece en la superficie de las partículas del sulfuro formando así una barrera de difusión tanto para el ión Fe^{+3} , cualquier otro agente oxidante o bien a la bacteria misma (en caso de existir una forma de ataque directo de ésta al sulfuro). La oxidación de esta capa de S^0 favorecería la disolución facilitando la difusión en la interfase del sulfuro con la solución. En el caso de no encontrarse Fe^{+3} en el cultivo la situación no será del todo diferente ya que en presencia de O_2 y bajo pH ocurrirá una oxidación de la superficie del sulfuro en la cual se liberarán cationes metálicos al igual que en el caso anterior. La oxidación del S^0 por parte de la bacteria favorecerá los procesos de difusión en la interfase acelerando así la disolución, debe sí considerarse que la oxidación mediante ión Fe^{+3} es mucho más importante cuantitativamente.

La posibilidad de un ataque directo a los sulfuros por parte de las bacterias, aunque aún no puede rechazarse, no ha logrado ser demostrada en

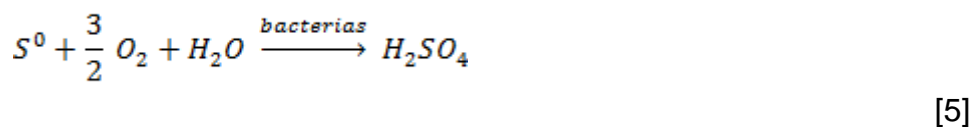
forma completa, más aún, dada la gran variedad de sulfuros que pueden ser lixiviables quimicobacterianamente, es difícil suponer que las bacterias presenten un solo mecanismo metabólico capaz de reaccionar frente a una variedad tan amplia de condiciones siendo por otra parte el S^0 subproducto de la oxidación férrica o ácida de todos los sulfuros, resulta plausible postular que es éste el sustrato utilizado por las bacterias.

Las situaciones antes señaladas pueden resumirse de la siguiente manera:

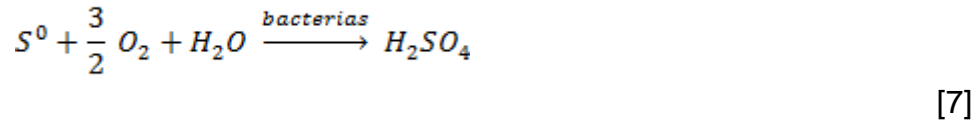
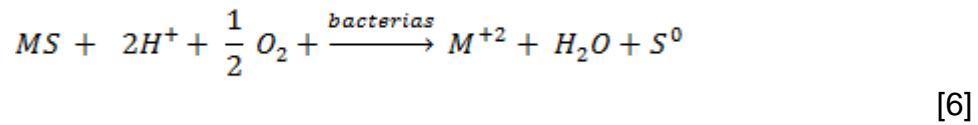
Lixiviación férrica con regeneración del ión Fe^{+3} , mantención de la concentración de ácido y mejoramiento de la difusión por consumo de S^0 .



Lixiviación ácida con regeneración bacteriana del ácido consumido y mejoramiento de la difusión por consumo de S^0



Oxidación del sulfuro con reducción de O_2 , eliminación de la capa de difusión y recuperación de ácido



Acción bacteriana directa (hipotética)



Oxidación del hierro ferroso

La oxidación del hierro ferroso ha sido estudiado por muchos investigadores usando el *Thiobacillus ferrooxidans*.



La oxidación del Fe^{+2} ocurre en la membrana celular y se postula que el Fe^{+2} es acomplejado en solución con oxígeno y/o sulfato ya que este anión es indispensable en la oxidación del Fe^{+2} . Dicho complejo se unirá a la membrana citoplasmática en la cual la enzima Fe^{+2} citocromo c reductasa cataliza la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} , entrando así un electrón a reducir la cadena transportadora de electrones compuesta por los citocromos c, a y al enzima citocromo – oxidasa, los cuales cumplen ciclos de óxido-reducción sintetizando una molécula de ATP (Adenosine Triphosphate) por cada electrón que atraviesa dicha cadena.

La energía almacenada en forma de ATP durante la fosforilación oxidativa es utilizada para mantener todos los procesos fisiológicos que regulasen la energía química, especialmente aquellos que conducen a la síntesis de nuevos componentes celulares.

Factores químicos y físicos que afectan la Bio-Oxidación de minerales

Para el buen desarrollo de los microorganismos se debe de tener en cuenta una serie de condiciones que las bacterias precisan para su crecimiento óptimo:

Nutrientes.- *Acidithiobacillus ferrooxidans* requiere de nitrógeno que parece ser el nutriente de mayor importancia, y fósforo necesario para el metabolismo energético. Como ambos nutrientes se encuentran en cantidades mínimas en las aguas de mina es necesario adicionarlos bajo la forma de sales al cultivo bacteriano, la dosis recomendada en el caso del nitrógeno es de 10 - 20 ppm de amonio como sulfato de amonio, fuente alternativa de nitrógeno es la úrea. La fuente preferida de fósforo es el fosfato. Se recomienda agregarlo como fertilizante agrícola en caso de ser necesario. La concentración recomendada de fosfato en solución es de 30 - 40 ppm.

Oxígeno.- En general, las bacterias involucradas en los procesos de biolixiviación son aeróbicas y crecen autotróficamente, es decir son dependientes del oxígeno como receptor de electrones y del CO₂ como fuente de carbón. Un continuo suministro de ambos es por lo tanto, esencial. El suministro de oxígeno es a menudo la etapa controlante de la biolixiviación en reactores agitados, pilas y botaderos.

CO₂. Es la única fuente de carbón para las bacterias. Usan la energía de la oxidación del azufre para reducir el CO₂ y convertirlo en materia orgánica de las células.

Temperatura.- El rango de temperatura óptima para los *Acidithiobacillus*. y *Leptospirillum ferrooxidans* es entre 301,15 y 306,15 K. La selección de cepas puede producir bacterias con mayor tolerancia a la temperatura (máximo de 313,15 K aprox.). Fluctuaciones en la temperatura ambiente puede tener efecto sobre:

- Los 6 m superiores en una pila o botadero.

- Los niveles de O₂ en el flujo de aire a través de la pila o botadero.
- A temperaturas mayores de 313,15 K, la distribución de bacterias mesofílicas oxidantes de hierro y azufre es limitada.
- A medida que la temperatura aumenta se espera que:
 - Predominen las bacterias termofílicas.
 - Prevalezca la oxidación química.
 - Exista una posible combustión espontánea.

En las Figura 14 y 15 se muestran el rango de temperaturas medidos en los depósitos lixiviables

El pH.- óptimo para *Acidithiobacillus ferrooxidans* es entre 1,2 - 2,3. *Acidithiobacillus thiooxidans* toleran valores de pH de 0,5 a 1,0.

Leptospirillum ferrooxidans es capaz de crecer a valores de pH que pueden ser inhibitorios para *Acidithiobacillus ferrooxidans*, transformándose en un importante socio oxidante del Fe⁺². El límite inferior de pH no está bien definido (aprox pH =1)

La oxidación del mineral por Fe⁺³ (mecanismo indirecto) y por bacterias se lleva a cabo mejor a pH < 2. La velocidad de oxidación química de Fe⁺² es dependiente del pH, siendo prácticamente despreciable a valores de pH óptimos para los *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum ferrooxidans*. A pH > 3 la oxidación química del Fe⁺² crece rápidamente, reduciendo efectivamente el nivel de sustrato disponible para la oxidación biológica.

Junto con esto, la baja solubilidad del Fe⁺³ producido a pH > 2,5 minimizará el importante rol del Ion férrico como agente lixivante.

El pH es también un factor importante que tiene influencia en la solubilidad de los sustratos para la oxidación bacteriana esto es:

La solubilidad de las especies de ion férrico no limita el potencial de oxidación de la solución.

A pH 2,5 - 4,0 se forman sales férricas insolubles. En la Figura 12 se muestra el rango de pH medidos en los depósitos lixiviables.

Potencial Redox.- El potencial redox (Eh) indica el potencial de oxidación de la solución. En la biooxidación en soluciones de ácido sulfúrico, las especies redox primarias son Fe^{+2} , Fe^{+3} , HSO_4^- y S^0 . El As^{+3} y As son importantes si hay arsenopirita. En sistemas activos de biooxidación con arsenopirita, el potencial redox estará entre 700 - 800 mv. Si el potencial es muy inferior a 620 mv, puede prevalecer el As , dificultando la eliminación de arsénico como arsenato férrico. Se recomienda usar los valores de Eh como guía complementaria. Se puede usar los diagramas: Eh - pH para estimar las especies predominantes en solución y la formación de fases sólidas. En la figura 13 se muestra el rango de potencial medidos en los depósitos lixiviables.

Efecto de la luz.- Existe alguna evidencia de que la luz, especialmente el extremo azul del espectro, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de algunos *Thiobacillus* en cultivos de laboratorio. En la práctica industrial la luz probablemente no tiene impacto en la biooxidación.

Efecto de la presión.- Los *Acidithiobacillus ferrooxidans* y las bacterias termofílicas moderadas son tolerantes a la presión, soportando presiones hidrostática de hasta 30 MPa (4300 psi.) Estudios de laboratorio muestran que la oxidación de Fe^{+2} no es afectada a esta presión. La presión hidrostática unida al oxígeno hiperbárico es fuertemente inhibitoria del crecimiento bacteriano, fijación de CO_2 , oxidación de ion ferroso y de azufre.

Efecto del tamaño partícula área superficial y concentración de sólidos.- Existe evidencia de que la disponibilidad de área superficial influencia la adherencia bacteriana (mientras mayor es el área superficial disponible mayor es el número de bacterias que se adherirá) aumentando el mecanismo directo de oxidación. Existe una opinión generalizada de que aun aumentando el área superficial, por disminución del tamaño de partícula, aumenta la velocidad de

biooxidación, sin embargo, aumentar el área superficial aumentando la concentración de sólidos no aumenta la velocidad de biooxidación. Una posible explicación es la disminución en la transferencia de oxígeno al aumentar la concentración de sólidos.

Toxicidad metálica.- Los metales deben ser solubles para inducir toxicidad. Las bacterias pueden adaptarse a mayores concentraciones de metal:

En el laboratorio a través de cultivos en serie.

En la práctica (pilas botaderos/reactores agitados) con el tiempo.

La toxicidad se manifiesta por:

Muerte de células

Inhibición de la oxidación del sustrato (Fe^{+2} , S^0 , minerales)

Inhibición de la fijación de CO_2

Menor velocidad de crecimiento.

Menor consumo de O_2 .

Otros metales, además del arsénico, que pueden ser tóxicos:

Plata. Tiene solubilidad limitada en condiciones normales

Mercurio. Se ha reportado adaptación a niveles de 10 micromoles

Uranio. Se adaptan a niveles de 5 micromoles de UO^{+2}

Talio. Tóxico a niveles de 0,1 milimoles

Cobre, Cobalto, Níquel, Zinc, y Cadmio. Las bacterias se adaptan fácilmente.

Ejemplo: 250 milimoles de cobre.

La toxicidad del arsénico depende del estado de oxidación. En general, el arsenito es más tóxico que el arsenato para los microorganismos.

Calidad del agua y salinidad.- *Acidithiobacillus.ferrooxidans* se inhibe a concentraciones de 5 -10 g/L de NaCl. La toxicidad del cloruro resulta de:

Toxicidad del ion cloruro mismo.

Disminución del potencial del agua.

Se ha encontrado un nuevo grupo de bacterias halotolerantes que oxidan minerales sulfurados, S^0 y ion ferroso. Toleran una concentración de sal hasta 6 % NaCl (60 g/L. Existe evidencia de que las bacterias termofílicas moderadas

que oxidan hierro (313,15 – 323,15 K) son halofílicas (gustan de la sal) Pueden oxidar Fe^{+2} en presencia de 50 g/L de NaCl con aproximación de 30 % de pérdida en la velocidad de la reacción. La toxicidad del cloruro puede ser un problema en regiones con fuentes de agua salada o cerca de la costa, debido a la disponibilidad limitada de agua dulce. Las ventajas para biooxidación en sistema sulfato - cloruro son:

El FeCl_3 es un oxidante efectivo.

Los cloruros metálicos son muy solubles.

La desventaja principal para la biooxidación en este tipo de sistemas es que las soluciones cloruradas en medio ácido son muy corrosivas.

Reactivos de flotación.- Los reactivos de flotación disminuyen la tensión superficial de la solución. La menor tensión superficial puede afectar la adherencia de las bacterias a las partículas de mineral. Los reactivos de flotación pueden romper también la membrana celular de las bacterias. El efecto de los reactivos de flotación debería ser evaluado a escala laboratorio para asegurarse de que no hay inhibición de la actividad bacteriana.

Cinética de reacción.- Existen muchos factores que pueden afectar la cinética de estas reacciones, principalmente el tipo de cultivo bacteriano, temperatura, pH, potencial redox, tamaño de partícula, la presencia de concentraciones inhibitoras de metales disueltos y la formación de películas superficiales durante la oxidación bacteriana.

En general, se han hecho las siguientes observaciones cualitativas:

La oxidación de la calcosina es muy rápida y procede vía formación de covelina cuya oxidación es más lenta.

La oxidación de la bornita es muy rápida.

La oxidación de la covelina es lenta. Existen dos tipos de covelina en un sistema bacteriano: covelina primaria (presente en el mineral o concentrado) y

covelina secundaria (formada como producto intermedio en la oxidación de calcosina).

Estos minerales son los candidatos comunes en una lixiviación en pilas, debido a sus cinéticas de reacción.

La oxidación de la calcopirita es inicialmente rápida. Sin embargo, ocurre pasivación de la reacción después de que se ha lixiviado un 10 % a 20 % de la calcopirita.

Debido a ello, la lixiviación comercial ha estado confinada a grandes botaderos de mineral de baja ley.

Diseño de tanques bioreactores

Cuando el volumen es muy grande (mayor que 1 m³) o se requiere de un mayor volumen de aireación, el sistema CSTR, ya no es eficiente y se requiere del levantamiento por aire. Debido a que, a mayor volumen de cultivo, también es mayor la cantidad de calor generado; se hace necesario, aumentar el área de transferencia de calor y la eficiencia de refrigeración; por lo que, el intercambiador de calor de camisa debe ser reemplazado por uno de serpiente en contra flujo o con circulación adyacente a la pared interior del tanque.

Al igual que en el diseño de tanque agitado, el aire que ingresa al biorreactor debe ser estéril; esto se consigue, haciéndolo pasar por un filtro microporo de diámetro de poro inferior a los 0,45 micrones (0,2 μm – 0,1 μm) que impida el paso de microorganismos contaminantes. En los biorreactores de levantamiento por aire o "air lift" la cama de aire también funciona como medio de agitación; de modo que, se genere una circulación fluida de líquido con aire (burbujas) que asciende el compartimiento interno y luego desciende por el compartimiento externo, favoreciendo el mezclado perfecto.

El tanque bioreactor de la prueba es de volumen de 8 m³, el cual consta de válvulas de ingreso de solución de lixiviación y de inóculo, otro tanque adicional donde se preparan los nutrientes principalmente sulfato ferroso

FeSO₄, se tiene un medidor de potencial Eh (mV) en línea que me permite ver la oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺, dentro del tanque hay un serpentín con agujeros donde se forman las burbujas de ingreso de aire y a la vez funciona como intercambiador de calor.

2.3 Definición de términos

Lixiviación bacteriana

Según Ballester (2005) y Watling (2006) dicen que los microorganismos presentes en los procesos de biolixiviación tienen un rol catalítico en la oxidación del ion ferroso (Fe⁺²) y del azufre elemental producidos durante la lixiviación química, a ion férrico (Fe⁺³) e ion sulfato. Los iones férricos corresponden a los agentes químicos oxidantes que disolverán el sulfuro metálico.

Biolixiviación

Según Tamayo Azcorra, M. (2013) La biolixiviación o lixiviación bacteriana es un proceso natural de disolución, ejecutado por un grupo de bacterias que tienen la habilidad de oxidar minerales sulfurados, permitiendo la liberación de los valores metálicos contenidos en ellos.

Bacteria

Según Tamayo Azcorra, M. (2013), son organismos que viven en condiciones extremas, en este caso; pH ácido y altas concentraciones de metales. Estas bacterias quimiolitotróficas utilizan la oxidación de compuestos inorgánicos para generar todos los componentes de la célula. Esta capacidad metabólica es la que se aprovecha para solubilizar cobre.

Sulfuros de cobre

Según Tamayo Azcorra, M., (2013), el cobre se disuelve transformándose en sulfato de cobre. La calcopirita es el sulfuro de cobre más difícil de oxidar.

Bajo la influencia de los T. ferrooxidans, la velocidad de oxidación de este sulfuro se incrementa hasta en 12 veces más que el proceso netamente químico.

Viabilidad bacteriana

Es una prueba que permite determinar qué tan activa se encuentra la población bacteriana, se cuantifica indirectamente mediante la oxidación del Ion Fe^{2+} .

Ratio Fe^{3+} / Fe Total.

Es la proporción de la concentración del ion férrico y del hierro total. Puede expresarse como porcentaje de férrico (% Fe^{3+}).

Crecimiento logarítmico

Fase o estadio de crecimiento bacteriano en donde la bacteria se multiplica exponencialmente. Es en esta fase donde las bacterias son fisiológicamente más activas.

Velocidad de oxidación

Es el diferencial del ferroso oxidado por unidad de tiempo. Puede expresarse como: mg Fe^{2+} oxidado / litro * hora.

Medio 9K.

Es un medio de cultivo que contiene sulfato ferroso (9,0 gpl de Fe^{2+}) que se usa para el crecimiento de bacterias acidófilas ferroxidantes.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Actualmente el control bacterial de los depósitos lixiviables que se realizan, consta de 02 niveles:

- A. Nivel laboratorio: La cual consiste en el desarrollo de pruebas de viabilidad en soluciones de percolación para determinar la viabilidad biológica de una población bacteriana mediante la estimación de la velocidad de oxidación, esta prueba permite determinar qué tan activa se encuentra una población bacteriana. La medición de la actividad biológica puede ser cuantificada mediante el ratio Fe^{3+} / FeT y el potencial REDOX de una mezcla de PLS (Pregnant Leach Solution) y de medio 9K incubada a 303,15 K y con aireación.

- B. Nivel campo: Que consiste en el control y envío de cultivos bacteriales de los tanques biorreactores de 80 L y 8,000 L, 50 m³ y 100 m³. Para muestra se tiene un ejemplo de tanque bioreactor de 100 m³ (Ver Figura 2), en los cuales se evalúa la velocidad de oxidación de los inóculos y el crecimiento poblacional de las bacterias; en el cual el objetivo es lograr máximos crecimientos poblacionales (de bacterias) para su posterior envío hacia los depósitos lixiviables.



Figura 2. Tanque bioreactor de 100 m³.

Fuente: Elaboración propia.

Es por estos motivos que se hace necesario la constante optimización de los controles (operativos / metalúrgicos) tanto a nivel laboratorio y campo; con el objetivo de tener datos más confiables y envíos más constantes de los cultivos hacia los depósitos lixiviables.

3.1 Tipo y diseño de la investigación

El estudio es de tipo básica, correlacional, debido a que profundiza las variables de estudio (Caballero, 2014). Es de enfoque cuantitativo debido a que usa la recolección de datos para probar la hipótesis con base a la medición numérica, retrospectiva porque usa datos históricos y longitudinales porque tiene más de una medición.

3.2 Población y muestra

En la tabla 2 se muestra la población de estudio y el tipo y tamaño de la muestra:

Tabla 2

Población de estudio y tamaño de muestra

POBLACIÓN DE ESTUDIO	Zona de tanques de planta de lixiviación
TIPO Y TAMAÑO DE MUESTRA	03 tanques Bioreactores (V=8 m ³ , 50 m ³ y 100 m ³)

Fuente: Esta tabla fue realizada en base a mi experiencia personal

3.3 Operacionalización de variables

VARIABLES DE SUPERVISIÓN O ESTUDIO	DE INDICADOR	VALOR FINAL	TIPO VARIABLE	DE
- Población bacteriana (Thiobacillus ferrooxidans)	Promedio de Crecimiento Población bacteriana	- 1E+05 de - 1E+06 - 1E+07	Numérica Continua	
VARIABLES ASOCIADAS	INDICADOR	VALOR FINAL	TIPO VARIABLE	DE
- Temperatura (°C)	- Medición de Temperatura (°C)	de - 298,15 K, 303,15 K.	- Numérica Continua	
- pH	- Medición de pH	- 1,8 2,0, 2,2	- Numérica Continua	
- Potencial (mV)	- Medición de mV	- 500 mV, 600 mV, 700 mV.	- Numérica Continua	

3.4 Técnicas e instrumentos para recolección de datos (Ver Tabla 3)

Tabla 3

Muestra, instrumentos, materiales y técnicas de la metodología a seguir

MUESTRA DE ESTUDIO	Tanques Bioreactores
INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	Data histórica
MATERIALES Y REACTIVOS	Los datos fueron almacenados en una data histórica de datos tomados de manera diaria y tiene un consolidado de datos mensuales, de los cuales tenemos datos secundarios (retrospectivos), para su análisis estadístico.
PROCEDIMIENTOS O TÉCNICAS	Uso de equipo de medición de pH, potencial (mV), Métodos de análisis de laboratorio.

Fuente: Esta tabla ha sido realizada en base a mi experiencia personal.

3.4.1 Acciones y actividades para la obtención de resultados

Toma de muestra, preparación de materiales y reactivos, medios de cultivo, viabilidad bacterial, análisis de laboratorio, conteo bacterial y elaboración de informe.

Toma de muestra.- En frascos de plástico de 250 ml, se tomaron 3 muestras, una de cada tanque bioreactor.

Preparación de medio de cultivo.- El medio de cultivo que se utilizó es el medio de cultivo 9K.

Viabilidad bacterial.- Es una prueba en donde nos permitió determinar la velocidad de oxidación de los microorganismos.

Análisis de laboratorio.- Los análisis que se realizaron son: la medición de pH, medición de mV, determinación de ión ferroso y medición de la temperatura.

Conteo bacterial.- Para dicho conteo se utiliza la técnica de diluciones sucesivas en un periodo de 7 días.

3.4.2 Materiales y/o instrumentos

- pH-metro
- Potenciómetro
- Frascos de muestreo
- Tanques bioreactores
- Matraces
- Pipetas
- Buretas
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Baño María
- Rotámetros
- Indicador Fenolftaleína
- Mezcla sulfofosfórica.
- Dicromato de potasio.

pH-metro ORION

Está conformado por el monitor donde se ubica el panel de señales y un sensor, en este caso un electrodo, que al estar sumergido en la solución acuosa mide las variables antes señaladas, tal como se muestra en la Figura 3.

Para la calibración de este equipo se utiliza soluciones buffer, estas se caracterizan por tener un valor conocido (estándar) de pH y/o Eh. Para el caso de mediciones de pH se usará un pH 4,0.



Figura 3. pH-metro

Fuente: Elaboración propia

El electrodo del pH-Metro debe estar sumergido en agua destilada para evitar que se reseque la membrana del bulbo de medición.

Después de usar el buffer, (solución rosada) para calibrar el pH - metro, tape la solución para evitar su contaminación.

Electrodos de referencia para el pH -metro.

Es un electrodo que tiene cuerpo Epóxico de simple función con cable y conector.

Su número de parte es WD - 35801-00 utiliza para su calibración una solución buffer pH 4,01.

Recomendaciones:

La calibración del instrumento dura aproximadamente 30 minutos, así que no hace falta que lo recalibre constantemente para cada muestra.

En algunos casos, cuando el equipo se demora en analizar la muestra, por defecto cambia el estado STAND BY. En estos casos, solo hay que presionar cualquier tecla para que continúe con la medición.

Cambie semanalmente el Buffer de la botella de calibración, llene aproximadamente la mitad de la botella. Como el sensor del electrodo se encuentra en la punta, sólo se requiere sumergir esta parte.

mV-metro ORIÓN



Figura 4. Potenciómetro

Fuente: Elaboración propia

Está conformado por el monitor donde se ubica el panel de señales y un sensor, en este caso un electrodo, que al estar sumergido en la solución acuosa mide las variables antes señaladas, tal como se muestra en la Figura 4.

Electrodos de referencia para el potenciómetro.

Es un electrodo de Platinum Redox Marca Corning su número de parte es de 476080, para su calibración utiliza una solución estándar de 300 mV.

Recomendaciones:

- La calibración del instrumento dura aproximadamente 30 minutos, así que no hace falta que lo recalibre constantemente para cada muestra.
- En algunos casos, cuando el equipo se demora en analizar la muestra, por defecto cambia el estado STAND BY. En estos casos, solo hay que presionar cualquier tecla para que continúe con la medición.
- Cambie semanalmente el Buffer de la botella de calibración, llene aproximadamente la mitad de la botella. Como el sensor del electrodo se encuentra en la punta, sólo se requiere sumergir esta parte.
- Una vez terminadas todas las mediciones enjuagar y secar el electrodo. Y guardar el electrodo en agua destilada.

Material de laboratorio

- Pipeta volumétrica.
- Vaso de precipitados.
- Picetas.

Pruebas de viabilidad

El siguiente equipo consta de un baño María y de flujómetros de aire (Figura 5), con lo cual se optimizó la distribución del ingreso de aire hacia los vasos pudiendo tener un mejor control de la prueba (Figura 6) y de las variables que intervienen en la oxidación del ion ferroso; con lo cual los

resultados de la actividad bacterial en nuestros depósitos lixiviables serán más confiables.



Figura 5. Baño María para prueba de viabilidad bacterial

Fuente: Elaboración propia



Figura 6. Prueba de finalización de la viabilidad bacterial

Fuente: elaboración propia

Conteos de poblaciones bacteriales

Con la adquisición del nuevo microscopio (MOTIC B300) y con el uso de cámaras de Neubauer, permitieron realizar conteos de población bacteriales periódicos, con lo cual se pudo determinar las fases de las bacterias y sus ratios de crecimiento.

Evaluación de la actividad bacteriana en percolaciones

Se realizaron pruebas de actividad bacteriana por método de la viabilidad con muestras de percolación de los depósitos lixiviables del Sur y con la percolación Nor-Oeste; se consideró también muestra de riego correspondiente a Refino Sur. Las pruebas se llevaron a cabo, tomando 20 ml de solución PLS con 280 g de medio 9K e incubándose a una temperatura de 303,15 K en baño María, con aireación constante (flujo promedio de 40 ml/min).

Preparación de medios de cultivo

Un medio de cultivo adecuado es aquel que contiene los elementos nutritivos esenciales, sales o azúcares en cantidades necesarias, el volumen de agua adecuado y la consistencia deseada para el desarrollo del microorganismo que se va a cultivar. Además debe tener el pH requerido por el microorganismo para estar libre de sustancias inhibitorias del microorganismo que se va a cultivar y sobre todo ser estéril. Se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4

Ejemplos de medios de cultivo para bacterias

	9K	Jones y Kelly	Bryner y Anderson
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,00 g	0,36 g	1,0 g
KH_2PO_4	-	0,054 g	-
K_2HPO_4	0,5 g	-	0,1 g
KCl	0,1 g	-	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g	0,15 g	3,0 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0,01 g	-	0,1 g
H_2SO_4 (10N)	pH=1,8	pH=1,6	pH=2,65
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	44,2 g	3,13 g	10 g
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	-	-	4,0 g

Fuente: Dr. Patricio Navarro Donoso – Consultor Intercade

Autoclave

Una autoclave es una caldera protegida por una camisa metálica, quedando conformada por paredes dobles. En su base está instalada la fuente calórica. Y a una distancia del fondo, se ubica la canastilla que soporta el material a esterilizarse y que además permite el flujo del vapor a presión. En la parte superior se encuentra una tapa pesada de cierre hermético, la cual se ajusta con tornillos que se encuentran distribuidos radialmente. Posee además un manómetro (para indicar la presión), un termómetro, una válvula de seguridad (para escape de la presión cuando ésta se excede), una espita para la salida del aire y del vapor al empezar a hervir el agua opcionalmente una válvula para el lavado interior (Ver Figura 7).

Uso:

- Verificar la toma de corriente (110 voltios)
- Abrir el autoclave y agregar agua destilada por sobre el nivel de la resistencia (unos 5 a 7 cm) retirando previamente la canastilla interior.
- Poner en la canastilla todo el material a esterilizar, utilizando uno o dos niveles según sea necesario.
- Cerrar el autoclave herméticamente.
- Encender y programar la temperatura y tiempo de esterilización (121 ± 1 °C y 15 minutos x 15 lb/pulg²)
- Cuando termine el tiempo de esterilización, dejar que descienda la temperatura y apagar luego el equipo.
- Abrir con cuidado y retirar el material del interior.



Figura 7 Autoclave

Fuente: Elaboración propia

Recuento en cámara de Neubauer

Objetivo

Describir el procedimiento para realizar conteos en diversas soluciones a analizar.

Procedimiento

- Tomar la cámara de recuento y sellarla al momento de colocar la laminilla en la parte superior.
- Tomar una pequeña cantidad de muestra líquida con una pipeta Pasteur, y colocarla en la cámara de recuento (por la ranura central).
- Para el caso de las bacterias lixiviantes, realizar el recuento en microscopio de contraste de fases, con el filtro de luz adecuado y a 400 aumentos.
- Realizar el recuento de 5 cuadrantes por campo, por duplicado. Obtener el promedio y multiplicarlo por el factor correspondiente (en este caso es 50 000).

Métodos de medición del crecimiento

El crecimiento se evalúa haciendo mediciones sucesivas en tiempos determinados de la población en estudio. En cada momento se evalúa cuál es la población en ese instante.

Existen diversas formas de evaluar una población bacteriana.

a. Conteo microscópico directo

Es una técnica común, rápida y barata que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología, ya que consiste en contar con un microscopio la cantidad de células presentes en un volumen determinado.

Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos (cámara de Petroff Hauser, cámara de Neubauer que se muestra en la Figura 8). Una de las mayores ventajas del recuento microscópico es brindar información adicional sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados. La muestra puede utilizarse tal cual, (leche, o cultivos puros en medio líquido), o puede prepararse una dilución.

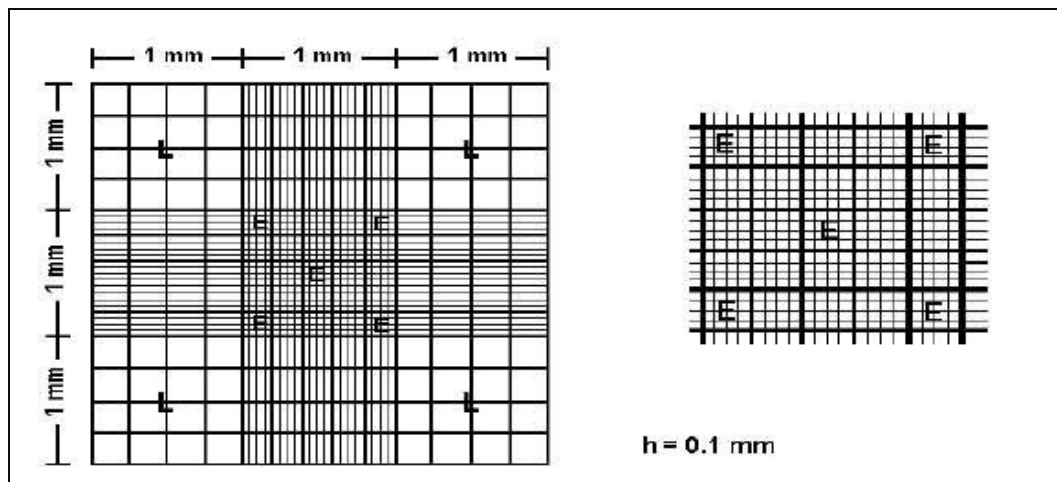


Figura 8. Cámara de Neubauer

Fuente: Procedimiento escrito de Planta LESDE.

Para hacer el conteo se procede de la siguiente manera. Si se posee una cámara dividida en 25 cuadrados (Ver Figura 9). El área de los 25 cuadrados es conocida, como también el volumen de muestra que esta área admite. Contando el número de bacterias presentes en los cuadrados (o algunos de ellos) se puede conocer cuánto hay en volumen conocido. Suponiendo 50 bacterias en 25 cuadrados, y sabiendo que los 25 cuadrados corresponden a $0,02 \text{ mm}^3$.

$$50 \text{ bacterias} \dots\dots\dots 0,02 \text{ mm}^3$$

$$x = \dots\dots\dots 1000 \text{ mm}^3 (1 \text{ cm}^3)$$

$$x = 1\,000 \text{ mm}^3 * 50 \text{ bacterias} / 0,02 \text{ mm}^3$$

$$x = 2\,500\,000 \text{ bact./ml} = 2,5 \times 10^6 \text{ bact./ml}$$

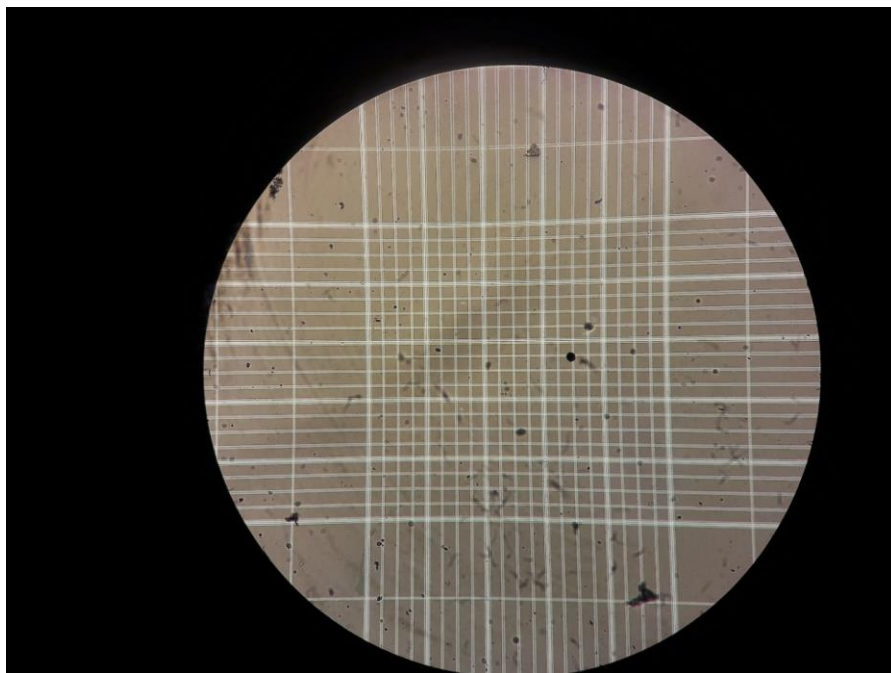


Figura 9. Vista en el microscopio para el recuento bacterial

Fuente: Elaboración Propia

Otro método que se realiza el conteo bacterial de la data histórica que se tiene, es por el método de diluciones sucesivas que consiste en adicionar medio de cultivo 9K en la muestra inicial de cada percolación y dejar oxidar la muestra en un periodo de 7 días, tal como se muestran en la Figura 10 y 11.



Figura 10. Prueba de conteo bacterial mediante diluciones sucesivas

Fuente: Elaboración Propia

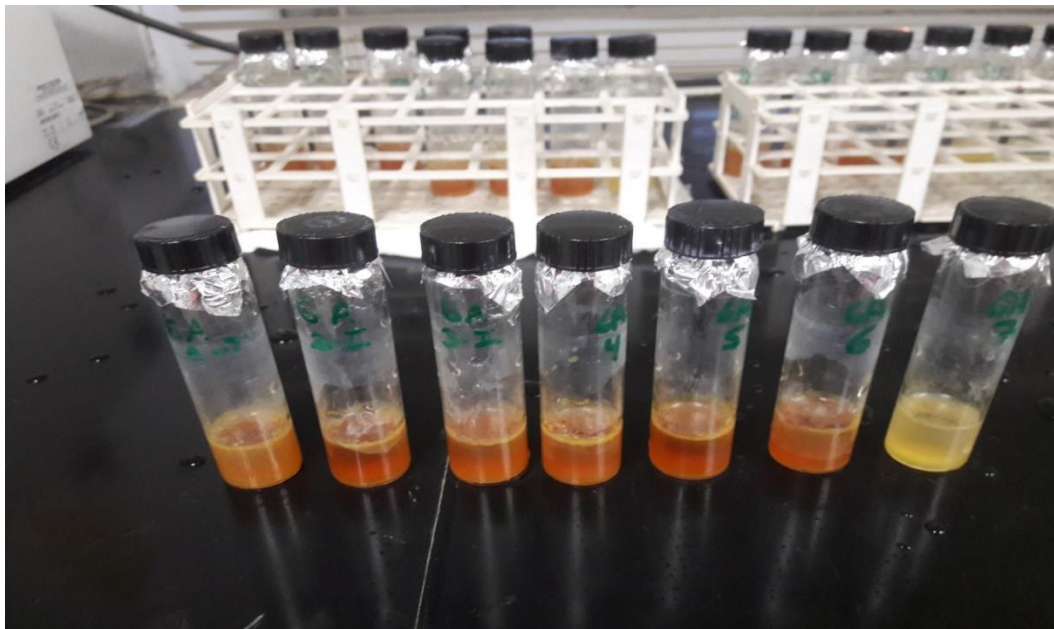


Figura 11. Finalización de la prueba de diluciones sucesivas

Fuente: Elaboración Propia

3.5 Procesamiento y análisis de datos

Se utilizó las técnicas y medidas de la estadística descriptiva en las que se emplearon: tablas de ANOVA, t-student, distribución F, las cuales serán detalladas desde la Tabla 5 hasta la Tabla 10.

3.5.1 Procedimiento para la determinación de ión ferroso

Mida 2 ml de muestra con una pipeta volumétrica en un vaso de precipitado o matraz de 250 ml.

Adicione de 10 a 15 ml de solución sulfofosfórica aproximadamente.

Agregue de 2 a 4 gotas aproximadamente de indicador de Difenilamina de sodio.

Titule con la solución de dicromato de potasio valorado hasta el viraje de incoloro a violeta.

Calcule la concentración de Fe^{++} presente en la muestra.

Realice cálculos según fórmula:

$$\text{Concentración} = \text{Volumen} * \text{Factor del DDicromato}$$

3.5.2 Procedimiento para la determinación de la viabilidad bacteriana en soluciones de percolación

- Preparar medio de cultivo 9K (según el MET-I-073)
- Muestrear las soluciones de percolaciones de las diferentes cuencas de los depósitos lixiviables y medir la temperatura del ambiente y de la solución. Registrar los datos.
- Pesar un vaso 600 ml limpio y seco rotulado (según el nombre de muestra)
- Pesar 20 ml de PLS y 280 g de Medio 9K. Agitar suavemente. Anotar los pesos respectivos y el peso total.
- Tomar con una pipeta 2 ml para medir ión ferroso en un matraz de erlenmeyer.

- Tomar con una pipeta 2 ml para fierro total en una fiola de 100 ml, luego hacer una dilución de 5 ml en una fiola de 100 ml. El material de vidrio debe estar limpio, seco y rotulado.
- Analizar en la segunda dilución Fierro total por Absorción Atómica.
- Utilizar el formato de Control de Pruebas de Vialidad Bacteriana en Depósitos Lixivables.xls, para registrar los datos de la prueba.
- Medir Eh y pH inicial. Registrar los datos.
- Colocar a los vasos una línea de aire independiente previamente identificada. De acuerdo al volumen de la prueba se puede usar un agitador en serie agitar a 120 rpm.
- Las líneas de aire deben estar limpias sin precipitaciones de fierro, para ello sumergirlas en un vaso con HCl al 50 % para disolver y esterilizar, de tal manera que no afecte la prueba.
- Cubrir con papel aluminio cada uno de los vasos para evitar contaminación con otras soluciones que afecten la velocidad de oxidación del cultivo bacterial.

Después de 24 horas de agitación realizar su control:

- Realizar las mediciones de Eh (potencial REDOX) y pH, durante la agitación por aireación. Registrar los datos.
- Parar el ingreso de aire y anotar la hora.
- Retirar los vasos del baño María y secar la superficie externa de cada vaso.
- Completar con agua destilada los pesos totales de cada vaso, evitando excederse en el volumen de agua añadido. Mezclar cuidadosamente. Registrar todos los pesos.
- Medir 2 ml de cada solución en vasos o matraces de 250 ml limpios, secos y rotulados.
- Realizar el procedimiento para la determinación de ion ferroso
- Aumentar agua al baño María, para luego colocar los vasos, en el mismo orden y las líneas de aire a cada vaso.

- Según la variación del peso total de cada vaso respecto al día anterior regular el flujo de aire y anotar la hora de reinicio de la prueba.
- Medir el peso de la solución y en función al volumen, calcular el Fierro total (para el balance de masas), según hoja de cálculo en EXCEL
- Calcular la velocidad de oxidación, descontado los tiempos de cese de aireación.
- La prueba culmina cuando el potencial REDOX alcanza o supera los 500 mV.

CAPÍTULO IV

MARCO FILOSÓFICO

Dicho proyecto está basado en contribuir a mejorar la disminución de la contaminación ambiental y minimizar los problemas con la sociedad, cabe mencionar que la hidrometalurgia es un proceso de tecnología limpia y un mejor ejemplo es la lixiviación, en donde todas las soluciones son recirculables y nada se emite o vierte al medio ambiente, ahora bien otra contribución muy importante son las bacterias *thiobacillus ferrooxidans*, dichos microorganismos fijan el CO_2 y de esta manera reducen las emisiones al medio ambiente, además son generadoras de su propio H_2SO_4 , que en el proceso de lixiviación de cobre dicho reactivo se puede minimizar en su consumo. Dicho cálculo de generación de ácido producido por las bacterias se muestra en la Tabla 11). Resaltar también que para lograr tener un mayor crecimiento poblacional de dichas bacterias en beneficio de nuestro medio ambiente se debe conocer qué factores están asociados a dicho crecimiento y darle las condiciones adecuadas cultivándolas en tanques bioreactores para su posterior inoculación en campo.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

Tabla 5

Promedios de pH, Temperatura (°C) y Potencial Eh (mV)

NIVELES	pH
	MEDIAS
< 1,80	3
1,80-2,20(hay crecimiento de población bacteriana)	32
≥ 2,21	0

NIVELES	Temperatura
	MEDIAS
< 25	1
25-45	34
≥ 46	0

NIVELES	Potencial
	MEDIAS
< 500	11
500-700	24
≥ 701	0

Fuente: Data Histórica 2014-2017 – Microsoft Excel y procesados utilizando SPSS 25

Tabla 6*Verificación de hipótesis general*Coeficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		95.0% intervalo de confianza para B		
		B	Desv. Error	Beta	t	Sig.	Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	-1,215E+8	27357203		-4,443	0,000	-1,773E+8	-6,575E+7
	pH	20227818	7609309,6	0,276	2,658	0,012	4708528,4	35747107
	Temperatura(°C)	-1005591	571203,07	-0,183	-1,760	0,088	-2170567	159385,74
	Potencial Eh (mV)	225153,57	36268,614	0,662	6,208	0,000	151183,24	299123,89

a. Variable dependiente: Población bacteriana

$$y_i = -1,21E+8 + 20227818X_1 - 1005591X_2 + 225153,57X_3$$

*Análisis de Varianza ANOVA para comprobación de la hipótesis general***ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	550818973890041,400	3	183606324630013,780	22,766	0,000
Residuo	250016454681386,840	31	8065046925206,027		
Total	800835428571428,200	34			

a. Variable dependiente: Población bacteriana

b. Predictores: (Constante), Potencial Eh (mV), pH, Temperatura(°C)

Fuente: Data Histórica 2014-2017 – Microsoft Excel – Procesamiento de datos utilizando SPSS 25

Tabla 7

Tratamiento de los betas de la ecuación: pH-Temperatura-Potencial (β_1 , β_2 , (β_3)

Beta de pH (β_1)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		95.0% intervalo de confianza para B		
		B	Desv. Error	Beta	t	Sig.	Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	-1,215E+8	27357203		-4,443	0,000	-1,773E+8	-6,575E+7
	pH	20227818	7609309,6	0,276	2,658	0,012	4708528,4	35747107
	Temperatura(°C)	-1005591	571203,07	-0,183	-1,760	0,088	-2170567	159385,74
	Potencial Eh (mV)	225153,57	36268,614	0,662	6,208	0,000	151183,24	299123,89

a. Variable dependiente: Población bacteriana

Beta de Temperatura (β_2)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		95.0% intervalo de confianza para B		
		B	Desv. Error	Beta	t	Sig.	Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	-1,215E+8	27357203		-4,443	0,000	-1,773E+8	-6,575E+7
	pH	20227818	7609309,6	0,276	2,658	0,012	4708528,4	35747107
	Temperatura(°C)	-1005591	571203,07	-0,183	-1,760	0,088	-2170567	159385,74
	Potencial Eh (mV)	225153,57	36268,614	0,662	6,208	0,000	151183,24	299123,89

a. Variable dependiente: Población bacteriana

Beta de Potencial (β_3)

Coefficientes^a

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados		95.0% intervalo de confianza para B		
		B	Desv. Error	Beta	t	Sig.	Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	-1,215E+8	27357203		-4,443	0,000	-1,773E+8	-6,575E+7
	pH	20227818	7609309,6	0,276	2,658	0,012	4708528,4	35747107
	Temperatura(°C)	-1005591	571203,07	-0,183	-1,760	0,088	-2170567	159385,74
	Potencial Eh (mV)	225153,57	36268,614	0,662	6,208	0,000	151183,24	299123,89

a. Variable dependiente: Población bacteriana

Fuente: Data Histórica 2014-2017 – Microsoft Excel – Procesamiento de datos utilizando SPSS 25.

Tabla 8

Resultados de la hipótesis específica - pH

ANOVA

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	144382700197725,880	1	144382700197725,880	7,258	0,011
Residuo	656452728373702,400	33	19892506920415,223		
Total	800835428571428,200	34			

a. Variable dependiente: Población bacteriana

b. Predictores: (Constante), pH

Fuente: Data Histórica 2014-2017 – Microsoft Excel – Procesamiento de datos utilizando SPSS 25

Tabla 9

Resultados de la hipótesis específica – Temperatura (°C)

ANOVA

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	88164963916859,380	1	88164963916859,380	4,082	0,052
Residuo	712670464654568,900	33	21596074686502,086		
Total	800835428571428,200	34			

a. Variable dependiente: Población bacteriana

b. Predictores: (Constante), Temperatura(°C)

Fuente: Data Histórica 2014-2017 – Microsoft Excel. Procesamiento de datos utilizando SPSS 25

Tabla 10

Resultados de la hipótesis específica – Potencial Eh (mV)

ANOVA

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	475190191066149,400	1	475190191066149,400	48,154	0,000
Residuo	325645237505278,900	33	9868037500159,967		
Total	800835428571428,200	34			

a. Variable dependiente: Población bacteriana

b. Predictores: (Constante), Potencial Eh (mV)

Fuente: Data Histórica 2014-2017 – Microsoft Excel - Procesamiento de datos utilizando SPSS 25

Tabla 11

Cálculo de Generación de Acido (Recuperación de consumo de reactivo H₂SO₄)

MES	DÍAS	ÁCIDO FRESCO 98.5% POR SX	ÁCIDO FRESCO 98.5% POR RAFF	ACIDO RECUPERADO A QUEBALIX POR RAFF	ACIDO DE PLS CUAJONE A QUEBALIX POR RAFF	ÁCIDO QUE INGRESA A LIXIVIACIÓN	H+ PERCOLACIÓN (gpl)	H+ RIEGO (gpl)	FLUJO PERCOLACIÓN	FLUJO RIEGO	INGRESO DE ÁCIDO A BOTADEROS EN RIEGO (RAFF+REC.+ÁCIDO)	SALIDA DE ÁCIDO DE BOTADEROS (PERCOLACIÓN)	CONSUMO SEGÚN BALANCE	GENERACIÓN DE ÁCIDO
ENE	31	1,261	3,722	37	61	5,006	4,684	8,358	1,351	1,602	9,963	4,707	5,255	249
FEB	28	1,125	2,849	29	74	4,017	4,972	7,945	1,603	1,734	9,255	5,357	3,898	-119
MAR	31	1,539	2,626	41	104	4,248	4,893	7,354	1,787	2,014	11,019	6,506	4,513	266
APR	30	1,397	0,505	38	89	2,001	4,982	6,549	1,733	1,867	8,804	6,215	2,589	588
MAY	31	1,406	3,093	51	119	4,602	5,354	8,154	1,714	1,908	11,575	6,827	4,748	146
JUN	30	1,539	3,007	47	132	4,657	4,476	7,543	1,862	2,006	10,894	6,001	4,893	236
JUL	31	1,641	3,215	50	105	4,938	4,598	7,860	1,649	1,890	11,054	5,642	5,412	474
AUG	31	1,597	2,587	55	65	4,242	4,866	7,721	1,550	1,838	10,560	5,611	4,948	707
SEP	30	1,544	3,397	54	54	4,975	5,161	8,225	1,642	1,848	10,945	6,103	4,842	-133
OCT	12	0,592	1,602	12	19	2,192	4,375	7,888	1,706	1,924	4,372	2,150	2,222	30
AÑO		13,642	26,603	416	821	40,878	4,836	7,760	16,598	18,632	98,441	55,119	43,322	2,444

Fuente: Elaboración propia.

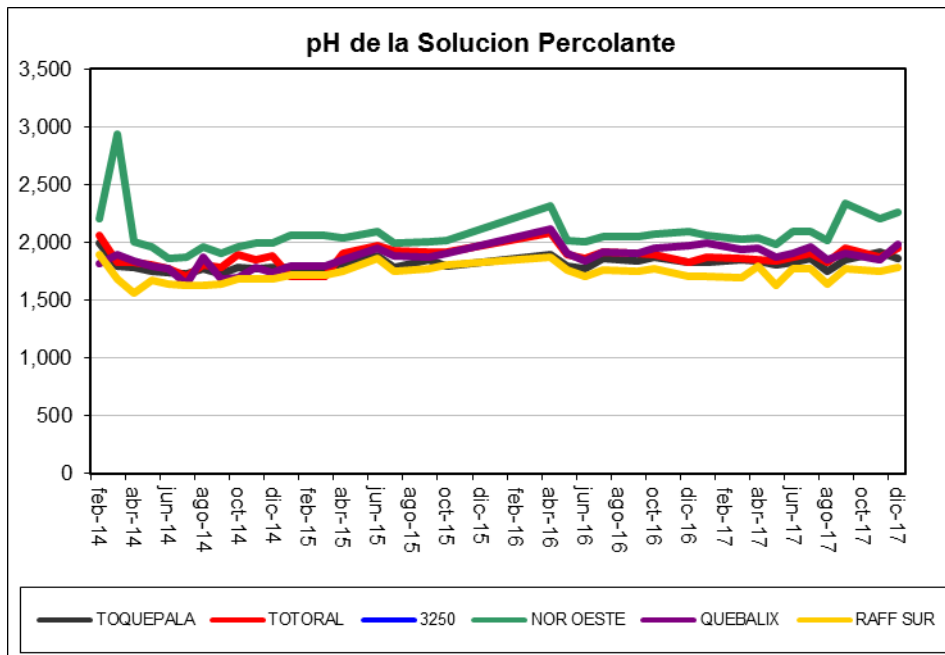


Figura 12. Tendencia de pH de los depósitos lixiviables

Fuente: elaboración propia

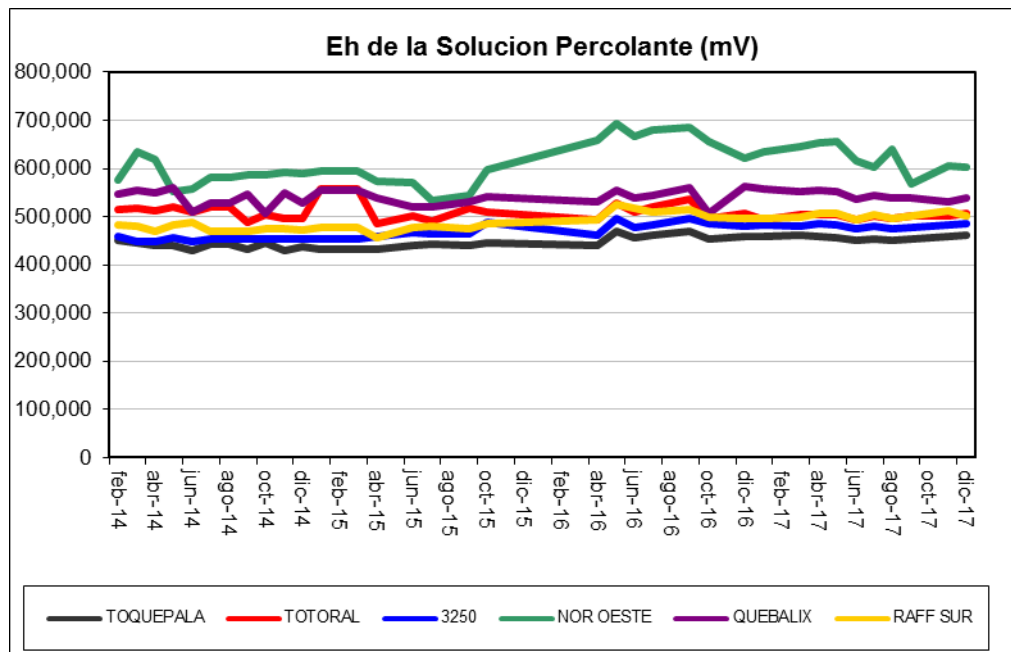


Figura 13. Tendencia de Eh de los depósitos lixiviables.

Fuente: elaboración propia

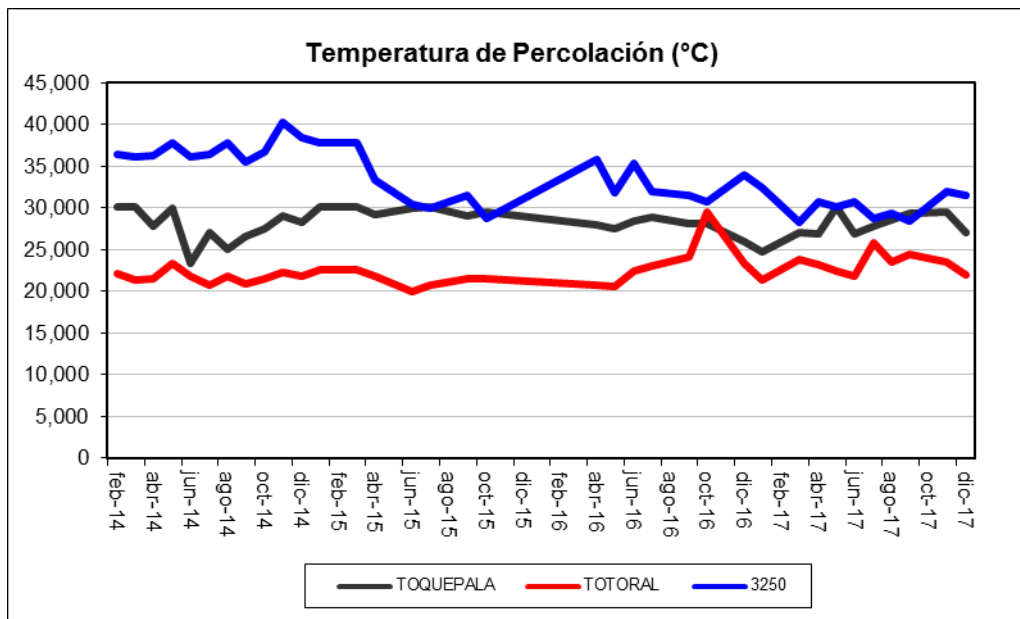


Figura 14. Tendencia de la temperatura de los depósitos lixiviables de Toquepala, Totoral y 3250.

Fuente: elaboración propia

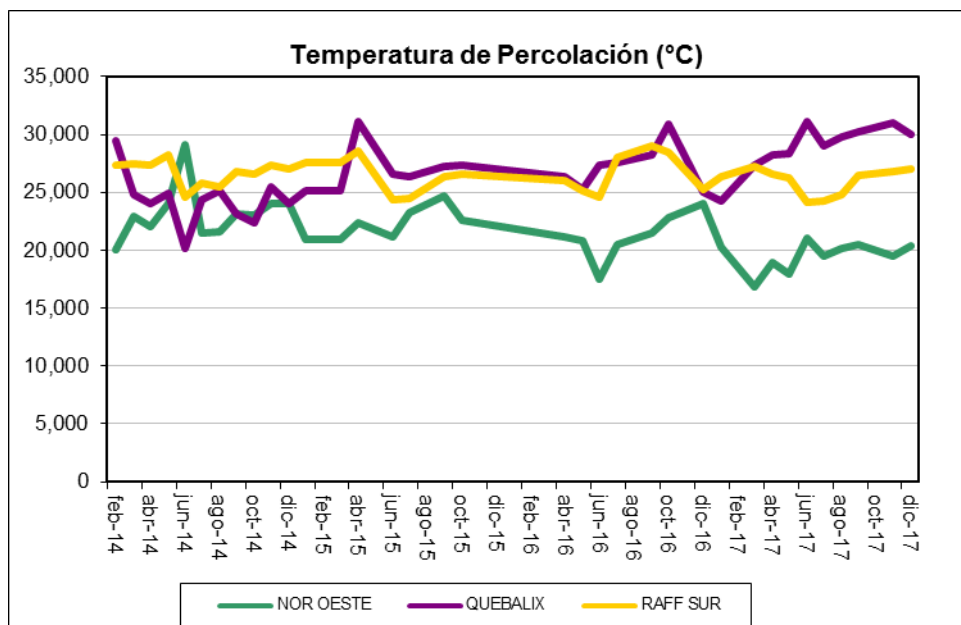


Figura 15. Tendencia de la temperatura de los depósitos lixiviables de Nor Oeste, Quebalix y Raff Sur.

Fuente: elaboración propia

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Para el caso del factor del pH según el programa estadístico SPSS Versión 25, se determina un p-valor=0,011 y como es menor que el nivel de significancia ($\alpha=0,05$), se logra rechazar la hipótesis nula y se resuelve que efectivamente dicho factor es muy importante para el crecimiento de población bacteriana.

Para el caso del factor de la temperatura según el programa estadístico SPSS Versión 25, se determina un p-valor=0.052 y como es mayor que el nivel de significancia ($\alpha=0,05$), se logra aceptar la hipótesis nula por lo que se resuelve que dicho factor no es muy importante en el crecimiento de población bacteriana.

Para el caso del factor del potencial Eh (mV) según el programa estadístico SPSS Versión 25, se determina un p-valor=0,000 y como es menor que el nivel de significancia ($\alpha=0,05$), se logra rechazar la hipótesis nula y se resuelve que efectivamente dicho factor es muy importante para el crecimiento de población bacteriana.

CONCLUSIONES

1. Se ha determinado que los factores asociados al incremento de población bacteriana para sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores, son el pH, la temperatura (K) y el potencial Eh (mV), de los cuales habiendo sido procesado de una data histórica (2004-2007), y utilizando un análisis de varianza procesados utilizando el software SPSS Versión 25 se concluye que los factores que tienen mayor significancia para dicho incremento de población bacteriana son el pH y el potencial Eh (mV).
2. El pH es uno de los factores más importantes con una confiabilidad del 95 %, que se relaciona significativamente con el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores, es decir, que el regresor (pH) sí contribuye significativamente al modelo, lo que queda demostrada en la prueba de los regresores que contribuyen significativamente al modelo.
3. La temperatura K no es uno de los factores más importantes con una confiabilidad del 95 %, se relaciona significativamente con el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores, es decir, que el regresor (temperatura) no contribuye significativamente al modelo, lo que queda demostrada en la prueba de los regresores que no contribuyen significativamente al modelo.
4. El potencial Eh (mV), es uno de los factores más importantes con una confiabilidad del 95 %, que se relaciona significativamente con el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores, es decir, que el regresor (potencial) sí contribuye significativamente al modelo, lo que queda

demostrada en la prueba de los regresores que contribuyen significativamente al modelo.

5. Se logra calcular la disminución del consumo de ácido sulfúrico que es de 2 444 t de ácido aproximadamente durante un año, lo que demuestra que dicho ácido fue generado por las bacterias Thiobacillus Ferroxidans en los depósitos lixiviables

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda tener en cuenta el factor de potencial Eh (mV) y pH sobre el efecto de la temperatura ya que según los resultados en el programas estadístico muestra que el grado de relación de mayor significancia son el pH y el potencial para lograr el mayor incremento de población bacteriana en sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores. Por ello se debe trabajar en un rango mayor de temperatura para que se pueda lograr la mayor significancia de la Temperatura (295,15 – 343,15 K).
2. Se recomienda realizar otros estudios sobre otros factores que afectan también al incremento de población bacteriana de los microorganismos biolixivantes tales como CO₂ para la fijación de éste en el mineral y por ende su medición de emisión al medio ambiente, el oxígeno y los nutrientes necesarios para el cultivo bacterial de dichos microorganismos benéficos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, F; Gentina, JC; Illanes, A. (2002). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*, Ediciones Universitarias de Valparaíso. PUCV.
- Bevilaqua, D., Leite, A.L.L.C., Garcia, O., Tuovinen, O.H., (2002), «*Oxidation of chalcopyrite by Acidithiobacillus ferrooxidans and Acidithiobacillus thiooxidans in shake flasks.* » *Process Biochemistry* 38: 587-592.
- Ballester (2005) y Watling (2006). *Brock, Biología de los microorganismos*, Pearson Prentice Hall, México 2004, 151 – 165 pp.
- Cancho, L., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., Muñoz, J.A., (2007), «*Bioleaching of a chalcopyrite concentrate with moderate thermophilic microorganisms in a continuous reactor system.* » *Hydrometallurgy* 87: 100-111.
- Córdoba, E.M., Muñoz, J.A., Blázquez, M.L., González, F., Ballester, A., (2008), «*Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: General aspects.*» *Hydrometallurgy* 93: 81-87.
- Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., (2000), «*A model for ferrous promoted chalcopyrite leaching.* » *Hydrometallurgy* 57: 31-38.
- Hiroyoshi, N., Miki, H., Hirajima, T., Tsunekawa, M., (2001), «*Enhancement of chalcopyrite leaching by ferrous ions in acidic ferric sulfate solutions.* » *Hydrometallurgy* 60: 185-197.
- Mora, A., (2010), «*Estudio de la dinámica de poblaciones bacterianas en procesos de biolixiviación mediante CARD-FISH.*», Memoria de Ingeniería Civil en Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.
- Norris, P. R., Clark, D.A., Owen, J.P., Waterhouse, S., (1996), «*Characteristics of Sulfobacillus acidophilus sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulfide oxidizing bacteria.*» *Microbiology* 142: 775-783. 53.

- Olson, G.J., Clark, T. R., (2004), «*Fundamentals of metal sulfide biooxidation.* » Mining Engineering 56: 40-46.
- Pradhan, N., Nathsarma, K.C., Srinivasa Rao, K., Sukla, L.B., Mishra, B.K., (2008), «*Heap bioleaching of chalcopyrite: A review.* » Minerals Engineering 21: 355-365.
- Revista Scientifics Scielo, received for review April 7th, 2011, accepted August 10th, 2011, final version August, 28th, (2011).Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S001273532012000200015&lang=pt.
- Rivera, R.E, Camejo, P.Y, Moya F.J, López-Méndez, J.L, Munguía-Bravo, M.-
Revista de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México, Unidad Minera La Caridad, México.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P., Schippers, A., (2001), « *(Bio) chemistry of bacterial leaching-direct vs. indirect bioleaching.* » Hydrometallurgy 59: 159-175.
- Tamayo Azcorra, M. (2013). *Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográfica UNMSM*.Recuperado de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/11842>.
- Vilcáez, J., Yamada, R., Inoue, C., (2009), «*Effect of pH reduction and ferric ion addition on the leaching of chalcopyrite at thermophilic temperatures.* » Hidrometallurgy 96: 62- 71.
- Watling, H. R., Perrot, F.A., Shiers, D.W., (2008), «*Comparison of selected characteristics of Sulfolobus species and review of their occurrence in acidic and bioleaching environments.* » Hidrometallurgy 93: 57-63.
- Xia, J., Yang, Y., He, H., Liang, C., Zhao, X., Zheng, L., Ma, C., Zhao, Y., Nie, Z., Qiu, G., (2010), «*Investigation of the sulfur speciation during chalcopyrite leaching by moderate thermophile Sulfolobus thermosulfidooxidans.* » International Journal of Mineral Processing 94: 52-57.

Zhou, H., Zeng, W., Yang, Z., Xie, Y., Qiu, G., (2009), «*Bioleaching of chalcopyrite concentrate by a moderately thermophilic culture in a stirred tank reactor.* » *Bioresource Technology* 100: 515-520.

ANEXOS

ANEXOS

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
¿Cuáles son los factores que intervienen en el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores?	Asociar los factores que intervienen en el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques bioreactores.	El pH, la temperatura, el potencial y el ión ferroso, son factores que influyen significativamente en el crecimiento de la población bacteriana para la oxidación de sulfuros de cobre de baja ley en tanques biorreactores.	Variable de Supervisión (o de Estudio): - Población bacteriana (Thiobacillus ferroxidans)	Promedio de crecimiento de población bacteriana	Conteo bacterial
PROBLEMA ESPECÍFICO	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES

¿Está relacionado el pH con el crecimiento de población bacteriana?	Relacionar el pH con el crecimiento de población bacteriana.	El pH es uno de los factores más importantes que se relaciona con el crecimiento de la población bacteriana.			
¿Está relacionada la Temperatura con el crecimiento de población bacteriana?	Relacionar la Temperatura con el crecimiento de población bacteriana	La Temperatura es uno de los factores más importantes que se relaciona con el crecimiento de la población bacteriana.	<u>Variables Asociadas</u> - Temperatura (°C) - pH - Potencial (m)	Medición de Temperatura Medición de pH Medición de potencial (mV)	Termocupla y termómetro de mercurio. pHmetro Potenciómetro
¿Está relacionada el potencial con el crecimiento de población bacteriana?	Relacionar el Potencial con el crecimiento de población bacteriana	El Potencial es uno de los factores más importantes que se relaciona con el crecimiento de la población bacteriana			