

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Académico Profesional de Biología- Microbiología

**“Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la
biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo
microbiano biolixivante”**

TESIS

Presentada por:

Bach. SANDRA VERÓNICA DELGADO CRUZ

Para optar el Título Profesional de

BIÓLOGO-MICROBIÓLOGO

Tacna – Perú

2015

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS**

Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología

TESIS N° 247

**TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO**

El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que por Resolución de Facultad N° 8067-2015-FACI-UN/JBG se designó como jurado calificador para la sustentación de tesis: "**Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante**", conformado por:

Presidente : Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Secretario : Dr. César Cáceda Quiroz
Miembro : Dr. César Cevallos Columbus

Para examinar y calificar la sustentación del informe de tesis en acto público, en el auditorio de la Facultad de Ciencias de la UNJBG, el día 22 de Abril del 2015 a las 10:00 horas; presentado por la Bachiller Sandra Verónica Delgado Cruz, de la Escuela Académico Profesional de Biología - Microbiología, para optar por el título de Biólogo – Microbiólogo.

El jurado calificador en forma secreta e individual se pronunció acerca del calificativo sobre el informe expuesto y procedió a emitir el siguiente veredicto: **APROBADO** por **UNANIMIDAD** y con el calificativo de **SOBRESALIENTE** con nota de 17 (DIECISIETE).

Para ratificar lo detallado firman:



Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras
Presidente



Dr. César Cáceda Quiroz
Secretario



Dr. César Cevallos Columbus
Miembro

DEDICATORIA

A mis padres Sergio y Marina que me formaron para que pueda alcanzar mis objetivos día a día con buenos hábitos, sentimientos y valores, por darme aliento y fuerzas para seguir adelante sin desmayar, por su constante apoyo y lograr en mí una persona de bien.

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesor y Profesor Daladier Miguel Castillo Cotrina, que con su ayuda se culminó el presente trabajo, que en estos años de estudios me ha enseñado a seguir adelante con dedicación y esfuerzo, que todo se puede lograr si va de la mano de Dios.

Al Profesor Alfredo Quispe quien con su ayuda desinteresada apoyo en la realización del trabajo, y me enseñó a ser siempre una persona correcta.

A Paola Eyzaguirre Liendo por estar siempre a mi lado en las buenas y malas y apoyarme a seguir adelante y no desmayar, por su apoyo en la realización del presente trabajo.

A Alina Delgado y Paulo Tintaya por ayudarme y darme ánimos para seguir adelante y terminar el presente trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN.....	01
1.1. Planteamiento del Problema:	05
1.2. Hipótesis:	07
1.3. Justificación	07
1.4. Objetivos:	10
1.4.1. Objetivo General:	10
1.4.2. Objetivo Específico:	10
1.5. Marco Teórico	11
1.5.1. Biominería.....	11
1.5.2. Biolixiviación	12
1.5.2.1. Mecanismo de biolixiviación.....	15
1.5.3. Procesos de lixiviación:.....	19
1.5.3.1. Proceso basado en el riego.....	19
1.5.3.2. Proceso basado en agitación.....	21
1.5.4. Microorganismos utilizados en biolixiviación.....	22

	Pág.
1.5.4.1. Características del crecimiento de microorganismos utilizados en biolixiviación....	26
1.5.5. Factores que influyen en el crecimiento microbiano	30
1.5.6. Influencia de la temperatura en la biolixiviación	38
1.5.7. Influencia de temperatura en crecimiento microbiano...	40
1.6. La Calcopirita	42
1.6.1. Características del mineral.....	42
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
2.1. Material de estudio:	44
2.2. Diseño de Investigación.....	45
2.3. Metodología:.....	45
2.3.1. Población	45
2.3.2. Muestra.....	45
2.3.3. Muestreo.....	46
2.3.4. Enriquecimiento del mineral lixiviado.....	49
2.3.5. Aislamiento del cultivo biolixivante en medio solido	50
2.3.6. Obtención de inóculo biolixivante.....	50
2.3.7. Caracterización y preparación del mineral a lixiviar	51
2.3.8. Instalación de los biorreactores	52
2.3.9. Fermentación de biolixiviación	55

	Pág.
2.3.9.1. Evaluación de la fermentación de la Biología.....	55
2.3.10. Análisis de Datos	60
2.3.10.1. Tabulación de datos.....	60
2.3.10.2. Análisis Estadístico.....	62
III. RESULTADOS	63
3.1. Determinación de la concentración microbiana y de cobre biología máxima a diferentes temperaturas.....	63
3.1.1. Determinación de concentración microbiana	63
3.1.2. Determinación de cobre biología	75
3.1.2.1. Determinación de Fe III.....	75
3.1.2.2. Determinación de cobre en función de la mayor concentración de Fe III encontrado entre los tratamiento.....	84
3.2. Determinación de la temperatura a la cual se establece mayor concentración microbiana y de cobre biología.....	87
3.2.1. Determinación de la temperatura a la cual se establece mayor concentración microbiana	87

	Pág.
3.2.2. Determinación de la temperatura a la cual se establece mayor concentración de fierro biooxidado	90
3.3 Establecimiento del grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano, la biooxidación del Fe III y biolixiviación de cobre.....	92
3.3.1. Datos para la correlación	92
3.3.2. Establecimiento de la correlación entre la concentración microbiana, concentración de Fe III y concentración de Cu.	94
IV. DISCUSIÓN	97
V. CONCLUSIONES	101
VI. RECOMENDACIONES	103
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
VIII. ANEXOS	114

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición del mineral calcopirita donado por la empresa minera Southern Perú Cooper Corporation.....	44
Tabla 2. Datos del muestreo de las pilas de lixiviación de la empresa minera Southern Perú Cooper Corporation.....	48
Tabla 3. Tratamientos instalados en los biorreactores para la biolixiviación de la calcopirita.....	54
Tabla 4. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	63
Tabla 5. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	66
Tabla 6. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	69
Tabla 7. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	72

Tabla 8. Valores de concentración en g/l de fierro total, Fe III y Fe II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	75
Tabla 9. Valores de concentración en g/l de Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	78
Tabla 10. Valores de concentración en g/l de Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	80
Tabla 11. Valores de concentración en g/l de Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	82
Tabla 12. Valores de concentración en g/l de cobre obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	84

Tabla 13. Valores de la máximas concentraciones microbianas en unidades logarítmicas cel/ml, con sus repeticiones y promedio a las temperaturas de 25, 40, 55 y 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	87
Tabla 14. Análisis de Varianza (ANOVA) en función de la producción máxima de la concentración microbiana.....	89
Tabla 15. Valores de la máximas concentraciones de fierro biooxidado en g/L, a las temperaturas de 25, 40, 55 y 70°C en la biolixiviación de la calcopirita	90
Tabla 16. Análisis de Varianza (ANOVA) en función de la máxima concentración de fierro biooxidado.....	91
Tabla 17 .Valores de Concentración microbiana log de cel./ml, Concentración de Fierro III y Concentración de Cu a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	92
Tabla 18. Valores de correlación obtenidos a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo directo e Indirecto de la biolixiviación.....	16

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita....	65
Gráfico 2. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita....	68
Gráfico 3. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita....	71
Gráfico 4. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita....	74
Gráfico 5. Curva de concentraciones del Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	77
Gráfico 6. Curva de concentraciones del Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	79

	Pág.
Gráfico 7. Curva de concentraciones del Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	81
Gráfico 8. Curva de concentraciones del Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	83
Gráfico 9. Curva de concentración del cobre obtenido en el tratamiento experimental de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita...	86
Gráfico 10. Curva de valores de concentración microbiana, concentración de Fierro III y concentración de Cu obtenidos en el tratamiento de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.....	96

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Zona de muestreo.....	114
Anexo 2. Medio líquido 9K modificado.....	115
Anexo 3. Pre enriquecimiento de las muestras.....	116
Anexo 4. Medio 9K sólido.....	117
Anexo 5. Observación de bacterias.....	118
Anexo 6. Caracterización y morfología de las colonias.....	119
Anexo 7. Técnica de cuarteo del mineral.....	122
Anexo 8. Instalación de biorreactores.....	123
Anexo 9. Recuento en cámara de Neübauer.....	125
Anexo 10. Curva de calibración del Hierro.....	126
Anexo 11. Determinación del Hierro total.....	127
Anexo 12. Determinación del Hierro III.....	128
Anexo 13. Valores de concentración de Fe total y Fe III obtenidos en la biolixiviación de calcopirita a diferentes temperaturas.....	129

	Pág.
Anexo 14. Curva de calibración del cobre.....	137
Anexo 15. Cuadro para toma de datos.....	138
Anexo 16. Prueba piloto.....	139
Anexo 17. Determinación del cobre por absorción atómica.....	140

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó el efecto de la temperatura y el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante, para lo cual se trabajó con muestra de los botaderos de las pilas de lixiviación de la empresa minera Southern Perú Cooper Corporation, de donde se obtuvo el cultivo microbiano biolixivante, además se trabajó con mineral de calcopirita donado por la misma empresa.

Se realizaron 4 tratamientos experimentales, con una doble repetición a diferentes temperaturas, las cuales fueron de 25, 40, 55 y 70°C y un tratamiento control para las diferentes temperaturas; cada biorreactor fue incubado con 700 ml del medio de cultivo 9k modificado, 70 ml del inóculo microbiano para los tratamientos experimentales y en el caso de los controles con 70 ml de medio de cultivo adicional y con el mineral de calcopirita en un 10% del volumen total, todos los tratamientos tanto experimentales como control fueron incubados por 336 horas.

La determinación de la biomasa se realizó cada 24 horas en cámara de Neübauer en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. La determinación del hierro oxidado se realizó cada 48 horas tomando una muestra de 8-10 ml, se utilizó el método de Cabaña (2005), el procedimiento fue realizado en el laboratorio de Química analítica de la Facultad de Ciencias de Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.; para la determinación del cobre se eligió el tratamiento experimental que presentó mayor biooxidación del hierro III, la determinación del cobre se realizó por absorción atómica en el laboratorio de procesos de la Facultad de Metalurgia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

El análisis de los resultados fue realizado en el programa Excel, utilizando la prueba de ANOVA. El tratamiento que obtuvo una mayor biooxidación de hierro III, biolixiviación de cobre y mayor concentración microbiana, fue el tratamiento experimental de 70°C; en el cual se determinó la concentración microbiana máxima, que fue de 8,20411998 unidades logarítmicas de cel/ml a las 312 horas, la biolixiviación de cobre máxima fue de 0,275038931 g/l en el tratamiento experimental de 70°C.

Se estableció el grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano y la biooxidación del fierro el cual tuvo un valor de 0,922207698, la correlación entre la biooxidación del fierro y la biolixiviación de cobre fue de 0,882478032. Con lo cual se concluyó que la temperatura ideal para la biolixiviación fue de 70°C tomando en cuenta los parámetros utilizados en la realización del presente trabajo.

Palabras claves: Biolixiviación, biooxidación, calcopirita, microorganismos biolixiviantes.

ABSTRACT

In this study was determined the effect of temperature and degree of correlation in microbial growth and bioleaching of chalcopyrite by a biolixivante microbial culture, for which It was working with sample dumps leach pads Company miner Southern Peru Copper Corporation, where the biolixivante microbial culture was obtained also worked with chalcopyrite ore donated by the same company.

Four experimental treatments were performed with a double repeat at different temperatures which were 25, 40, 55 and 70°C, with a treatment control to different temperatures, each bioreactor was incubated with 700 ml of the culture medium 9k modified, 70 ml for microbial inoculum for the experimental treatments, in the case of the controls with 70 ml of medium and further culturing chalcopyrite ore 10%, all treatments experimental both as a control were incubated for 336 hours.

The determination of the biomass was performed every 24 hours in a Neubauer chamber in the Mycology Laboratory, Faculty of Sciences, National University Jorge Basadre Grohmann, while the determination of

biooxidation iron was performed every 48 hours taking a sample of 8- 10 ml, the method Cabaña (2005) was used, the procedure was performed in the laboratory of chemical composition analysis of the Faculty of Sciences of National University Jorge Basadre Grohmann ; for the determination of copper in experimental treatment had higher iron biooxidation of +3 was chosen, determining copper was performed by atomic absorption processes in the laboratory of the Faculty of Metallurgy of the National University Jorge Basadre Grohmann.

The analysis of the results was performed in Excel , using the ANOVA test . The treatment had a higher biooxidation iron III , copper bioleaching higher microbial concentration , the experimental treatment was 70 ° C ; in which microbial maximum concentration , which was 8.20411998 logarithmic units cel / ml at 312 hours was determined , the maximum copper bioleaching was 0.275038931 g / l in the experimental treatment of 70 ° C. The degree of correlation between microbial growth curve and bio-oxidation of iron which had a value of 0.922207698 was established, the correlation between the bio-oxidation of iron and copper bioleaching was 0.882478032. Whereupon it is concluded that the ideal bioleaching temperature is 70 ° C taking into account the parameters used in the preparation of this work.

Keywords: bioleaching, biooxidation, chalcopyrite, biolixivantes
microorganisms.

I. INTRODUCCIÓN

La lixiviación es una técnica ampliamente utilizada en metalurgia extractiva que convierte los metales en sales solubles, pero que trae consigo significativos impactos ambientales, que perduran en el tiempo, la existencia de importantes recursos de baja ley que son remanentes de la explotación de minerales más ricos, sumado a los primeros indicios de agotamiento de las reservas minerales oxidadas; impulsó a los investigadores a buscar técnicas rentables y eficientes de recuperación del cobre. Esto los llevó a encontrar que ciertas bacterias catalizaban la lixiviación de los minerales sulfurados, haciendo rentable su procesamiento (CIMM, 2005).

La utilización de estas bacterias se justifica cuando el mineral sulfurado de un yacimiento cuprífero es de baja ley o tiene menos de un 0,5% de cobre, situación en la que el proceso productivo tradicional de pirometalurgia deja de ser rentable, y se buscan nuevos procesos, más baratos y eficientes. En la actualidad la biolixiviación se ha convertido en una tecnología alternativa, más económica y ambientalmente aceptable (Ly, 2003).

La biolixiviación es un proceso en el cual se emplean microorganismos para disolver los minerales, en este caso de calcopirita. Es una tecnología más amigable con el medio ambiente, ya que no genera contaminación ambiental y su empleo es mucho más rentable que la lixiviación normal.

En nuestro país, la biolixiviación es una nueva tecnología que está siendo poco a poco implementada en los diversos yacimientos mineros. En Tacna, en el yacimiento minero de Southern Perú Cooper Corporation, la biolixiviación está dando sus primeros pasos, estando aún en la etapa de experimentación en laboratorio, usando cultivos microbianos obtenidos de sus propios botaderos de lixiviación.

Diversas investigaciones han demostrado que para la realización de una mejor biolixiviación, es importante el uso de consorcios microbianos biolixiviantes, ya que cada microorganismo presente en el consorcio, genera un ambiente favorable y adecuado para el desarrollo del otro, logrando una mayor interacción, un espacio adecuado para su desarrollo y su actividad lixivante. Entre todos los microorganismos lixiviantes presentes en los consorcios, los más empleados en biolixiviación son *Acidithiobacillus ferroxidans* y *Acidithiobacillus*

thiooxidans, también se encuentran *Leptobacillus ferrooxidans*, estos microorganismos presentan, entre sus características principales que pueden vivir en ambientes hasta de un pH de 1 y son quimiolitotrofos, ya que tienen como fuente de energía, componentes inorgánicos (Rawling, 1999).

La biolixiviación microbiana ocurre con diferentes factores acondicionados como son el pH bajo (1-2), los nutrientes, la presencia de metales pesados, la temperatura, la luz, oxígeno y dióxido de carbono (Arias, 2008). Claro está que antes de que ocurra un proceso de biolixiviación tiene que ocurrir la biooxidación del Hierro. La biooxidación en un proceso que ocurre antes de la biolixiviación es un pre-tratamiento para la extracción del cobre, en este proceso ciertos microorganismos oxidan los sulfuros a través de mecanismos de acción directa e indirecta. Estos microorganismos utilizan como fuente primaria de energía las especies reducidas de hierro y azufre, y el CO₂ como fuente de carbono para su síntesis celular (Rivadeneira, 2006). Por lo tanto existe una correspondencia directa entre la biooxidación del Hierro y la biolixiviación del cobre.

En el presente trabajo se determinó el efecto de la temperatura y el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita, por un cultivo microbiano biolixivante; para lo cual primero se determinó: la concentración microbiana y de cobre biolixiviado máxima a diferentes temperaturas, la temperatura a la cual se estableció mayor concentración microbiana y de cobre biolixiviado ; y también se estableció el grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano y el de biooxidación del hierro.

1.1. Planteamiento del Problema

En la actualidad es conocida la participación significativa de múltiples microorganismos en los procesos de extracción de metales de interés económico a partir de yacimientos o concentrados minerales de baja ley, estos microorganismos son conocidos como biolixiviantes los cuales se les ha encontrado en diferentes ambientes tanto mesófilos como termófilos. Diferentes investigaciones han demostrado sus potenciales aplicaciones en la biolixiviación como una alternativa rentable y ambientalmente sostenible.

El crecimiento de un microorganismo biolixivante como su capacidad de biolixiviar metales, como el cobre presente en el mineral calcopirita, puede ser afectado por diferentes factores fisicoquímicos y ambientales como la temperatura. Es por eso que conocer la temperatura ideal y el efecto que esta produce en el crecimiento microbiano y la capacidad biolixivante de un cultivo nativo, es un tema innovador ya que no se han reportado trabajos sobre el mismo y será de gran importancia para el desarrollo de nuevas tecnologías en las cuales aplicar una temperatura ideal

para la biolixiviación traerá grandes beneficios, como la mayor extracción de minerales sin dañar el medio ambiente.

Por tanto sé planteó la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto de la temperatura y el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante?

1.2. Hipótesis

A medida que aumenta la temperatura se incrementa el crecimiento microbiano y la biolixiviación de un cultivo biolixivante, siendo el grado de correlación $r=1$, entre estos dos procesos.

1.3. Justificación

En la industria minera cada vez se hace más frecuente la búsqueda de métodos menos contaminantes en la extracción de metales, ya que los métodos convencionales generan altos costos en lo económico y ambiental, debido a la utilización de químicos que producen alto índice de contaminación.

En el Perú la biolixiviación está comenzando a tomar importancia, por la cantidad de mineras que se encuentran en nuestro territorio y el buscar procesos más rentables para la recuperación de minerales de baja ley, cada vez es más solicitado.

Una alternativa biológica a este problema es la utilización de microorganismos biolixiviantes nativos, los cuales se encuentran presentes en lixiviados ricos en metales, conocer su desarrollo y factores que puedan inhibir su crecimiento y capacidad biolixivante es de suma importancia para realizar una buena biolixiviación.

Diversas literaturas indican que factores como concentración de metales pesados, nutrientes, pH y temperatura afectan en el crecimiento microbiano de cultivos biolixiviantes, entre todos estos la temperatura es uno de los principales factores que afectan el desarrollo de estos microorganismos (Constanza, 2000).

Los microorganismos biolixiviantes se les ha encontrado en ambientes con temperatura en el rango de mesófilos y termófilos, a la mayoría como mesófilos. La temperatura óptima de crecimiento y desarrollo de un microorganismo es variable en el rango de temperatura mesofílica, por ello es importante determinar cuál es esa temperatura óptima para su crecimiento y capacidad biolixivante.

Es importante por lo tanto conocer la temperatura en la cual el crecimiento microbiano y la capacidad biolixivante se desarrolla de la mejor manera para efecto de que con otros trabajos complementarios futuros los conocimientos que se obtengan en el presente trabajo, puedan ser utilizados para mejores procesos de biolixiviación del cobre sobre la calcopirita, utilizando cultivos microbianos nativos.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Determinar el efecto de la temperatura y el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación sobre la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante.

1.4.2. Objetivo Específico

- Determinar la concentración microbiana y de cobre biolixiviado máxima a diferentes temperaturas.
- Determinar la temperatura a la cual se establece mayor concentración microbiana y de cobre biolixiviado.
- Establecer el grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano, la biooxidación de fierro III y la biolixiviación del cobre.

1.5. Marco Teórico

1.5.1. Biominería

La Biominería es una alternativa económicamente más viable y ambientalmente más amigable que las metodologías tradicionales. Consiste en utilizar un proceso natural por el cual ciertos microorganismos son capaces de catalizar a temperaturas bajas o moderadas la disolución de sulfuros metálicos.

Es el uso de microorganismos en diferentes aspectos de la explotación de los minerales, abarcando desde la concentración de las especies de interés (a través de la bioflotación), la recuperación de los elementos presentes en ellas (biolixiviación y biooxidación), hasta su acción en tareas de remediación ambiental. Estos microorganismos son usualmente oxidantes del hierro y/o del azufre y resistentes a altísimas concentraciones de metales pesados.

Esta tecnología se aplica con éxito a nivel comercial para la recuperación de cobre y de cobalto y hay aplicaciones incipientes para la recuperación de cinc y de níquel. También es utilizada para el beneficio de minerales de oro (Donati, 2012).

1.5.2. Biolixiviación

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

solubilización de metales en los ambientes mineros (Muñoz, 2003).

Biolixiviación es el nombre que se le entrega al conjunto de reacciones químicas que tienen como resultado la disolución de minerales por parte de bacterias, las cuales lixivian, es decir, disuelven las rocas o minerales, los solubiliza (por eso el proceso se llama Biolixiviación o Lixiviación Biológica) para obtener la energía que necesitan a expensas de sustancias inorgánicas (CIMM, 2005). Es una oxidación biológica del azufre y hierro presentes en los minerales refractarios, calcopirita (CuFeS_2), pirita (FeS) y arsenopirita (AsFeS) principalmente, que resulta en la solubilización en el licor de lixiviación en el caso de cobre y uranio, y en la exposición del oro, contenidos en estos minerales (Orrantia, 1997).

Las operaciones de biolixiviación a nivel industrial, se llevan a cabo utilizando consorcios de microorganismos altamente acidófilos que pueden incluir, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum*

ferrooxidans y bacterias del género *Acidiphilium* (Harrison, 1984), aunque se ha demostrado que *T. ferrooxidans* es el miembro más activo en estos consorcios de bacterias mesofílicas (Gómez, 1999).

Lo anterior confirma la importancia de conocer cuál(es) son los microorganismos realmente involucrados en los procesos de lixiviación, lo que facilitaría el tener procesos más controlados biológica y técnicamente en todos los niveles, desde el laboratorio hasta el tratamiento industrial (Lagos, 2009).

En los últimos años la biolixiviación ha sido ampliamente aplicada a escala industrial debido a los bajos costos y a que es una tecnología ambientalmente viable, conveniente para la explotación y beneficio de menas complejas de bajo tenor (Mejía, 2004).

A escala comercial la biolixiviación es aplicada para la recuperación de cobre y uranio por lixiviación y de oro mediante un pre tratamiento de minerales refractarios, que

recibe el nombre de biooxidación. La tecnología de biolixiviación también ha sido probada en laboratorios para sulfuros de cobalto, galio, molibdeno, níquel, zinc y plomo (Brierley, 2001).

Actualmente, se estima que la contribución de la biolixiviación es de aproximadamente del 15, 13 y 25% de la producción total del mundo de cobre, uranio y oro, respectivamente. Además de la disolución de sulfuros metálicos, la capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* para oxidar el ión ferroso ha sido explotada en bio procesos con relación al tratamiento de aguas, drenajes ácidos de mina, en procesos de biodesulfurización de carbones constituyendo una alternativa para remover el azufre presente en estos minerales con técnicas ambientalmente más amigables (Córdova, 2008).

1.5.2.1. Mecanismo de Biolixiviación

El primer intento de explicación del mecanismo de biolixiviación fue realizado por Silverman y Ehrlich,

1964, citado por Acevedo (2005); donde se plantearon dos posibles opciones como mecanismos frecuentes de biolixiviación: el directo y el indirecto.

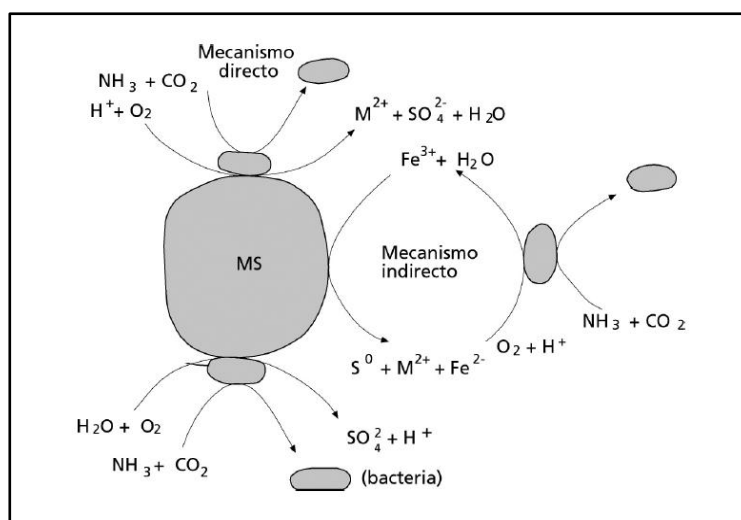


Figura 1. Mecanismo directo e Indirecto de la biolixiviación

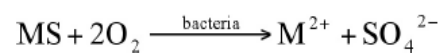
Fuente. Acevedo 2005

- **Mecanismo Directo**

Se entiende como mecanismo directo aquel que está mediado por la acción bacteriana y en donde las reacciones químicas son catalizadas

enzimáticamente; esta opción, además, supone el contacto físico de los microorganismos con el mineral (Saavedra, 2009).

Según este mecanismo, la bacteria ataca al sulfuro metálico de forma directa, mediante su adherencia a la superficie del mineral y la posterior oxidación enzimática de éste por transporte de electrones desde la parte reducida del mineral, generalmente un sulfuro, al oxígeno disuelto. La reacción general sería:

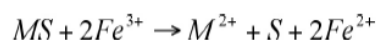


La adherencia de bacterias al mineral es, por lo tanto, un requisito del mecanismo directo y la principal evidencia presentada en defensa del mismo, esta teoría ha sido apoyada por diferentes estudios experimentales que confirman la adhesión de las bacterias lixiviantes a la superficie de los minerales

- **Mecanismo Indirecto**

Se entiende como mecanismo indirecto aquel en que toman parte reacciones químicas, enzimáticas como no enzimáticas, no habiendo contacto físico entre los microorganismos y el mineral, aunque aquellos juegan un papel central en la formación de reactivos químicos que pueden tomar parte en el proceso (Acevedo, 2005).

Se considera básicamente la acción de los iones férricos sobre el mineral sulfurado disolviéndolo. A través de la reacción química de lixiviación, se producen iones ferrosos y azufre elemental. Finalmente, estos son oxidados biológicamente a hierro férrico e ion sulfato, respectivamente. El principio de este mecanismo, es la no adherencia de las células al sulfuro mineral. La ecuación sería la siguiente:



1.5.3. Procesos de lixiviación

Las diferencias entre las tecnologías de biolixiviación dependen del lugar de aplicación, la metodología ocupada, la ley de cobre y el tamaño de partícula del mineral, principalmente. Una categorización amplia según Brierley (2008), es la separación de las tecnologías según el método en que se basan para hacer la lixiviación, según la cual se tiene los procesos de lixiviación basados en el riego y los basados en la agitación.

1.5.3.1. Proceso basado en el riego

a) Lixiviación en pilas

Con esta tecnología se puede procesar material recién extraído de la mina y mineral chancado, minerales de ley intermedia, sulfuros secundarios y primarios. La extracción de cobre desde minerales secundarios de cobre, como la calcocita (Cu_2S) y la covelina (CuS), por biolixiviación en pila es ampliamente practicada en todo el mundo.

b) Lixiviación en botaderos

Con esta tecnología se procesa minerales de baja ley de cobre (menor a 0,5 %), mineral recién extraídos de la mina, sulfuros secundarios y primarios. Como el contenido de cobre en estos minerales es tan mínimo como para cubrir los costos de la flotación y fundición, los grandes fragmentos de mineral son arrojados a los botaderos. Estos tienen una base impermeable desde la que se puede capturar los lixiviados. En la superficie del botadero se aplica la solución de ácido sulfúrico y agua. Los microorganismos crecen naturalmente dado que se dan las condiciones óptimas para su crecimiento.

c) Lixiviación *in situ*

Este método se aplica a minas abandonadas y minas subterráneas, donde los depósitos de mineral no pueden ser extraídos por los métodos convencionales, por ser minerales de baja ley o de

pequeños depósitos o ambos, siendo no rentable su extracción.

1.5.3.2. Proceso basado en la agitación

a) Lixiviación en tanques agitados

Se utiliza para minerales de ley intermedia a alta y concentrados de mineral, que generalmente es calcopirita, debido al capital y costos de operación asociados con esta tecnología. Es solo aplicable a material finamente molido, ya sean lamas, relaves, concentrados o calcinas de tostación, y se realiza utilizando reactores agitados y aireados (Gacés, 2006).

Los minerales son depositados en un tanque de acero inoxidable de gran tamaño, equipado con agitadores mecanizados y con la introducción de aire por ventiladores, lo que asegura la disponibilidad de

oxígeno y dióxido de carbono para los microorganismos.

Esta operación permite tener un gran manejo y control del proceso de lixiviación. Además, la velocidad de extracción del metal es mucho mayor que la lograda mediante el proceso de lixiviación en pilas o en bateas (COCHILCO, 2009).

1.5.4. Microorganismos utilizados en el Proceso de Biolixiviación

Las bacterias que intervienen en los procesos de lixiviación son generalmente autótrofas, aeróbicas y quimiosintéticas. Esta última característica, las hace capaces de oxidar minerales para producir el ión férrico y ácido sulfúrico, necesarios para las reacciones de biolixiviación. El ión férrico, es un agente fuertemente oxidante, que permite oxidar los minerales de sulfuro de cobre a sulfato de cobre que es soluble. Debido a esto,

también se les llama microorganismos sulfo y ferro-oxidantes.

Su capacidad autótrofa les permite sintetizar sus componentes celulares a partir de compuestos inorgánicos, como la fijación del CO₂ de la atmósfera. Se alimentan de los minerales de los que obtienen energía y realizan esta tarea como parte de sus procesos metabólicos.

Se caracterizan por ser organismos que viven en condiciones extremas (extremófilos), en este caso, las normales de los minerales: pH ácido y altas concentraciones de metales. Los ambientes acuosos asociados a los vertidos de las minas se caracterizan por su bajo pH, altas concentraciones de metales pesados y en algunos casos por elevadas temperaturas. A pesar de estas condiciones, existen estos microorganismos, que además son capaces de desarrollarse y reproducirse. En estos ambientes los microorganismos utilizan como fuente

primaria de energía las especies reducidas del azufre y ciertos metales en disolución (Ballester, 2000).

Una gran variedad de microorganismos participan en la oxidación de minerales sulfurados, los que constituyen la microflora natural de estos minerales. Es decir, coexisten distintos microorganismos cuyo metabolismo aporta los elementos necesarios para el desarrollo de cada uno de ellos (Archilla, 2005).

Todas estas características les confieren la clasificación de bacterias y arqueas quimilitoautotróficas ferro-sulfo oxidantes. Uno de sus principales exponentes es la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, aislada por primera vez desde las aguas de una mina de carbón, cuyo descubrimiento se dio a conocer en 1947 (Colmer, A.R. and Hinkle, M.E, 1947). Así fue como se encontró la primera bacteria identificada capaz de lixiviar el cobre.

Las operaciones de biolixiviación a nivel industrial (Marchant, 1986), se llevan a cabo utilizando consorcios de microorganismos altamente acidofílicos que pueden

incluir, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y bacterias del género *Acidiphilium* (Harrison, 1984), aunque se ha demostrado que *T. ferrooxidans* es el miembro más activo en estos consorcios de bacterias mesofílicas (Bosecker, 2004).

Otras bacterias, como *Leptothrix* spp (Bacteria con vaina), y *Gallionella ferruginea* (Ly, 2003) son investigadas como biolixiviantes; existen también algunos mohos lixivadores, aunque hay pocos trabajos con estos tipos de microorganismos como *Alternaria* sp, *Aspergillus awamoni*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Cladosporium resinae*, *Fusarium* sp, *Mucor*, *Trichoderma viride*, *Rhizopus japonicus*, entre otros (Brandl, 2001).

1.5.4.1. Características del crecimiento de microorganismos utilizados en biolixiviación

Son generalmente aeróbicas, autótrofas y quimiosintéticas. Esta última característica, las hace capaces de oxidar minerales para producir el ión férrico y ácido sulfúrico, necesarios para las reacciones de biolixiviación. (Delgado, 2001).

El ión férrico, es un agente fuertemente oxidante, que permite oxidar los minerales de sulfuro de cobre a sulfato de cobre que es soluble. Debido a esto, también se les llama microorganismos sulfo y ferro-oxidantes.

Su capacidad autótrofa les permite sintetizar sus componentes celulares a partir de compuestos inorgánicos, como la fijación del CO_2 de la atmósfera. Se alimentan de los minerales de los que obtienen energía y realizan esta tarea como

parte de sus procesos metabólicos. Respecto a los nutrientes en un medio con ión ferroso es común encontrar *Acidithiobacillus ferroxidans* y en su ausencia predomina *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptobacillus ferroxidans*.

La presencia de determinadas especies de bacterias dependerá del mineral biolixiviado, por lo que las condiciones óptimas de operación podrían no ser exactamente las mismas para todos los recursos mineros, para ello es importante conocer su composición mineralógica (Vasquez, 1997).

También se caracterizan por ser organismos que viven en condiciones extremas (extremófilos), en este caso, las normales de los minerales: pH ácido y altas concentraciones de metales.

Cada especie de bacteria tiene distintos requerimientos de nutrientes como fuentes energéticas para su crecimiento, por lo que una

mezcla de bacterias podría resultar más beneficiosa que una especie pura, en la biolixiviación de un mineral. Así por ejemplo los compuestos que no son oxidados por una especie, pueden ser oxidados por la otra, evitando una acumulación que podría resultar tóxica (Menadier, 2009).

Acidithiobacillus ferrooxidans, ha sido la bacteria más estudiada para biolixiviación y por consiguiente de la que existe mayor información, sin embargo existen otros microorganismos identificados que solubilizan minerales sulfurados, donde se entrega una lista de microorganismos reconocidos con importancia comercial en operaciones biohidrometalúrgicas como también aquellas que únicamente pueden ser exploradas en pruebas de laboratorio pero que parecen ser prometedoras a futuro (Osorio, 2007).

Las especies de *Thiobacillus* son responsables de la solubilización y lixiviación de metales pesados y preciosos, como el oro, a partir de minerales de pirita y arsenopirita. Para su crecimiento utilizan CO₂ atmosférico como fuente de carbono, obteniendo su energía a partir de la oxidación del Fe ferroso (Fe II) a férrico (Fe III), con producción de ácido sulfúrico como subproducto de su metabolismo (Ingledew, 1982).

Acidithiobacillus ferrooxidans crece en el medio de cultivo 9K, líquido y sólido, y puede ser incubado a 37°C. Se evidencian cambios físicos en la intensidad de color y en el aspecto en los medios de cultivo, lo que permite presumir que ha ocurrido alguna acción de las bacterias lixiviantes sobre los compuestos del medio.

1.5.5. Factores que influyen en el crecimiento microbiano

El papel que juegan los factores ambientales, biológicos y fisicoquímicos, sobre el crecimiento y desarrollo de las bacterias es fundamental en el rendimiento de la extracción de metales por biolixiviación.

El control de estos factores es muy importante para asegurar las condiciones óptimas de pH, humedad, temperatura, nutrientes, fuente de energía que deben existir junto con la ausencia de inhibidores, que permitan obtener el máximo rendimiento de cobre. Los factores que influyen en la respuesta de los microorganismos encargados de la biolixiviación según Pradhan et al. (2008) son:

- **pH**

Son bacterias acidófilas, es decir que crecen en medios ácidos, son incapaces de desarrollarse a un pH mayor de 3,0. El pH define qué especies de bacterias se desarrollarán en el medio. Las bacterias acidófilas tienen

una estructura de su pared celular, o más probablemente de su membrana citoplasmática, capaz de contener el ácido externo y adecuarse a sus variaciones.

Se reportó que un cambio de pH entre 1,5 involucra variaciones visibles en la composición de proteínas de la célula, lo cual indica un mecanismo de adaptación (Moreno, 2011).

- **Oxígeno y dióxido de carbono**

Como la mayoría de las bacterias lixiviantes en la naturaleza son aeróbicas, necesitan un ambiente con oxígeno para sobrevivir. El aire aporta el oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂) necesarios para la lixiviación, por lo que es importante asegurar la aireación independiente de la tecnología utilizada.

- **Nutrientes**

Como todos los seres vivos, estos microorganismos requieren de fuentes nutricionales inorgánicas para su óptimo desarrollo, que pueden obtener del mismo mineral, como amonio, fosfato, azufre, iones metálicos (como Mg^+), etc.

Los requerimientos nutricionales de *A. ferrooxidans*, son bastante modestos, en ambientes naturales, aireación y agua ácida son suficientes para que crezca a expensas del hierro presente en la pirita, arsenopirita y/o calcopirita; y puede aislarse con relativa facilidad a partir de drenajes ácidos de minas asociadas con minerales refractarios o depósitos carboníferos (Monroy, 2003).

- **Fuente de Energía**

Los microorganismos utilizan como fuente primaria de energía el ión ferroso y el azufre inorgánico. En la

lixiviación de mineral el ión ferroso (Fe II) es producido biológicamente, por ello no es necesario añadirlo.

- **Luz**

La luz visible y la no filtrada tienen un efecto inhibitorio sobre algunas especies de bacterias, pero el hierro ofrece alguna protección a los rayos visibles.

- **Temperatura**

Los microorganismos se clasifican según el rango de temperatura en el cual pueden sobrevivir. Así las mesófilas sobreviven en un rango óptimo de 30-40°C, las moderadamente termófilas a una temperatura cercana a los 50°C, y las extremadamente termófilas sobre los 65°C. Si la temperatura del medio en que se encuentran los microorganismos es menor a 5°C, se vuelven inactivos volviendo a cumplir su función si aumenta la temperatura, pero si la temperatura del

medio sobrepasa el óptimo, los microorganismos se mueren.

- **Presencia de Inhibidores**

Durante el proceso de biolixiviación, se van acumulando metales pesados como zinc, arsénico y hierro en la solución de lixiviación, y en ciertas concentraciones resultan tóxicos para los microorganismos. Estas concentraciones tóxicas se pueden disminuir al diluir la solución lixivante.

- **Potencial redox (Eh)**

La oxidación de las especies reducidas depende del movimiento o transferencia de electrones, por lo tanto influye en el metabolismo de la bacteria. De esta manera, la medida del potencial es un indicador de la actividad microbiana, mientras mayor sea el potencial medido, mayor será la actividad microbiana. El potencial óptimo es de 600 a 800 mV.

- **Tamaño de partícula**

El área específica superficial es uno de los factores importantes que afectan el proceso de oxidación bacteriana. Generalmente, en los minerales refractarios, la fracción del área superficial ocupada por el sulfuro de interés es pequeña y se podría esperar que la velocidad de lixiviación sea proporcional a los pocos sitios activos de dicho sulfuro.

A medida que el tamaño de partícula decrece, aumenta el área superficial y por ende el número de sitios activos, por lo que se cree que aumenta la eficiencia del proceso (Segura, 1998).

Sin embargo, varios investigadores han encontrado que al disminuir el tamaño de partícula se generan factores inhibitorios, como efectos mecánicos, ya que se aumenta la posibilidad de colisión entre las partículas y las células y se genera estrés metabólico causado por concentraciones inhibitorias de metales

pesados. Lo anterior, genera un efecto global negativo (Osorio, 2007).

- **Sustrato mineral**

La composición mineralógica del sustrato a lixiviar es de gran importancia. Un alto contenido de carbonato del mineral puede aumentar el pH del líquido lixiviado inhibiendo o suprimiendo la actividad bacteriana. Los bajos valores de pH necesarios para la biolixiviación pueden ser alcanzados por un aporte externo pero esto puede provocar la formación o precipitación de algunos compuestos (sulfatos) y afectar el coste del proceso.

La velocidad de lixiviación depende también de la superficie total del sustrato. Una disminución del tamaño de partícula se traduce en un aumento del área superficial dando lugar a una mayor cantidad de metal producido para una masa igual de mineral.

- **Metales pesados**

La lixiviación de sulfuros metálicos da lugar al incremento de la concentración de metales disueltos en el lixiviado. En general, las bacterias lixiviantes y entre ellas las azufre-oxidantes, tiene la capacidad de tolerar concentraciones relativamente elevadas de metales pesados (Domínguez, 2007). Diferentes cepas de una misma especie presentan sensibilidades muy diferentes aun mismo metal. Por ello es importante conocer la tolerancia de las bacterias que se van a emplear en el proceso de lixiviación a los metales concretos que se encuentran en el mineral.

1.5.6. Influencia de la temperatura en la biolixiviación

Existe un acuerdo general de varios autores según el cual el efecto de la temperatura en la cinética de disolución de la calcopirita es significativo. Al aumentar la temperatura se mejora la velocidad de disolución. A bajas temperaturas la acción de las bacterias disminuye y con ello la recuperación de cobre (Ibañez, 2012).

Existen microorganismos termófilos con importantes ventajas en las aplicaciones biohidrometalúrgicas, por lo que cada día cobra más fuerza la idea de la utilización de microorganismos termófilos, ya que el aumento de la temperatura conlleva una aceleración de la cinética química del proceso. El uso de estas bacterias no está restringido a condiciones de laboratorio o a reactores controlados, diversos autores comprobaron la existencia en el interior de los botaderos, que las temperaturas oscilan entre valores de 50 y los 80 °C con reconocida capacidad lixivante (Rivera, 2011).

Actualmente se entiende que la descomposición de minerales es un proceso químico donde el rol principal de los microorganismos es producir hierro férrico y protones (ácido). Estudios indican que, como regla general, la velocidad de las reacciones químicas se duplica con el aumento en 10°C en la temperatura. A pesar que la velocidad de descomposición es lo suficientemente rápida en 35- 40°C para casi todos los minerales, para otros casos como calcopirita temperaturas en el intervalo 45-80°C son indispensables para hacer que el proceso sea económicamente viable (Rawling, 1994).

Los procesos de biooxidación tienen un máximo de temperatura por encima del cual las reacciones de oxidación se inhiben. Para los microorganismos del género *Acidithiobacillus*, la temperatura máxima es de alrededor 43°C, con un intervalo óptimo entre 25 y 35°C, estos microorganismos son denominados mesófilos, mientras que para microorganismos termófilos el rango de temperatura va 50-80°C (Segura, 1998).

1.5.7. Influencia de la temperatura en el crecimiento microbiano

En los ambientes naturales asociados a la minería, es posible encontrar una variedad de microorganismos, en su mayoría bacterias, cuya población se encuentra fuertemente influenciada por la temperatura a la que están expuestas así como por los nutrientes presentes. La temperatura en los sistemas industriales no supera los 45°C y en esta situación es posible encontrar bacterias de las especies *Acidithiobacillus ferroxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Leptobacillus ferroxidans* que son las más prevalentes.

El papel que juegan los factores ambientales, biológicos y fisicoquímicos, sobre el crecimiento y desarrollo de las bacterias es fundamental en el rendimiento de la extracción de metales por biolixiviación.

El control de estos factores es muy importante para asegurar las condiciones óptimas de pH, humedad, temperatura, nutrientes, fuentes de energía que deben existir

junto con la ausencia de inhibidores, que permitan obtener el máximo rendimiento de cobre.

A bajas temperaturas la acción de las bacterias disminuye y con ello la recuperación de cobre. Sería necesario invertir en un sistema que pueda aumentar la temperatura en la matriz de mineral, para garantizar recuperaciones mayores de cobre.

Ente todos los factores la temperatura es uno de los factores que tiene mayor incidencia en el crecimiento microbiano, es importante considerar que la reacción de oxidación de los minerales sulfurados es exotérmica, es decir libera calor al medio lo que produce el aumento de la temperatura (COCHILCO, 2009).

En los ambientes naturales asociados a la minería, es posible encontrar una variedad de microorganismos como bacterias y arqueas, pero en su mayoría bacterias, cuya población se encuentra fuertemente influenciada por la

temperatura a la que están expuestas así como por los nutrientes presentes.

1.6. La Calcopirita (CuFeS₂)

1.6.1. Características del mineral

La calcopirita es el mineral más refractario y abundante de los sulfuros de cobre por lo que la metalurgia extractiva de este metal se basa principalmente en este mineral (Jeffrey y F. Lawson, 2000).

La calcopirita tiene una estructura cristalina en la que el hierro y el cobre se encuentran en coordinación tetraedral con el azufre, se caracteriza esencialmente por tener enlaces covalentes metal–azufre. Es un semiconductor con propiedades magnéticas y eléctricas inusuales y la sustitución de cobre y/o hierro por otros átomos, como Mn, Al y Ga, en la estructura cristalina conduce a la formación de un semiconductor tipo n y tipo p.

La calcopirita es la fuente de cobre más abundante en el mundo y es, además, uno de los minerales más recalcitrantes en los procesos de hidrometalurgia (Constanza, 2000). Por esta razón el cobre es extraído principalmente por pirometalurgia.

Sin embargo, el agotamiento de los yacimientos minerales y la disminución del tenor ha generado el desarrollo de la hidrometalurgia para el tratamiento de la calcopirita (Lagos, 2009).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material de estudio

Mineral Calcopirita (CuFeS_2) Donado por la empresa Southern Perú Cooper Corporation – Tacna, Perú. Con un tamaño de partícula pasante a malla 10.

Tabla 1. Composición del mineral Calcopirita donado por la empresa Southern Perú Cooper Corporation

Nro.	%CuT	%FeT	%CuSAc	%CuSCN	%FeOx	%CO₃
M +10	0,217	3,976	0,015	0,067	0,256	1,1581

Fuente: Southern Perú Cooper Corporation

2.2. Diseño de Investigación

El presente trabajo se realizó bajo un nivel de investigación básica, ya que tiene como finalidad la obtención y recopilación de información para ir construyendo una base de conocimiento que se irá agregando a la información previa existente, es de tipo experimental, ya que habrá manipulación de variable independiente.

2.3. Metodología

2.3.1. Población

Botaderos de mineral de calcopirita de baja ley de la planta de lixiviación de la Minera Southern Perú Cooper Corporation.

2.3.2. Muestra

Mineral lixiviado de calcopirita 25 kg (5 kg por cada botadero muestreado).

2.3.3. Muestreo (Juárez, 2004)

El mineral lixiviado fue muestreado de los botaderos de lixiviación de la empresa Southern Perú Cooper Corporation, ubicada en el departamento de Tacna, (Anexo 1).

Se seleccionaron 5 botaderos con mayor actividad microbiana, cada uno de ellos será una unidad poblacional en donde se determinó el número de unidades muestrales de acuerdo a un muestreo a juicio, teniendo en cuenta el área superficial de cada botadero (Asociación Nacional de Industria Química A. C. et al., 2006). Las muestras se tomaron de forma dirigida considerando zonas con actividad microbiana, donde se determinó un área estándar de 1 m² (Arias & Piñeros, 2008). El área de mayor actividad microbiana (presencia de mineral oxidado de color rojizo amarillento y presencia de biofilm), fue muestreado con la ayuda de una pala limpia se escavo 20 cm y se tomó 1 muestra de 3 Kg por cada botadero, la cual tendrá un tamaño

máximo de 20 cm para facilitar su transporte y procesamiento (Saavedra, 2009).

Se anotó los datos de su temperatura, altitud y características del lugar en un balde de capacidad de 5 Kg. La muestra fue llevada al laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann para su procesamiento.

Tabla 2. Datos del muestreo de los botaderos de lixiviación de la minera Southern Perú Cooper Corporation

Población	Muestra	Temperatura (°C)	Altura (m.s.n.m.)	Características
Botadero 1	1	23°C	3250	Lixiviado amarillo - anaranjado
Botadero 2	2	27°C	3450	Lixiviado amarillo
Botadero 3	3	38°C	3280	Lixiviado color naranja
Botadero 4	4	46°C	2980	Lixiviado color naranja-rojizo intenso
Botadero 5	5	55°C	3270	Lixiviado color naranja-rojizo intenso

Fuente. Elaboración Propia

2.3.4. Enriquecimiento del mineral lixiviado (Corrales, 2006)

Las muestras de mineral lixiviado se sometieron a un enriquecimiento de 15 días aproximadamente en medio de cultivo líquido 9K Silverman y Lundgren modificado (Anexo 2) con el fin de liberar las bacterias que pudiesen estar en las muestras.

Se tomó aproximadamente 1,5-2 kg del mineral lixiviado y fue sumergido en 4 litros de medio líquido 9K Silverman y Lundgren modificado, a pH 1,8 ajustado con H₂SO₄, en baldes de 5L de capacidad, no fue necesaria la esterilización (Anexo 3).

Los baldes fueron incubados a temperatura ambiente, con una aireación de 1 vvm por 15 días. Durante el proceso de incubación se realizó el control de pH mediante indicador universal en papel con el fin de verificar que el pH se mantuviera entre 1,0 y 2,0, ideal para el crecimiento de estas bacterias.

2.3.5. Aislamiento del cultivo biolixivante en medio sólido

Se preparó medio 9K sólido modificado (Anexo 4), de este medio se vertió 15 ml en placas Petri, se dejó solidificar, luego se incorporó 0,1 ml del cultivo de enriquecimiento de mineral y se sembró con ayuda de una asa de Drigalsky por extensión, las placa se incubaron a temperatura ambiente (25°C) durante 15 a 20 días, tiempo en que aparecieron las colonias bacterianas.

Se realizó la caracterización de las colonias de las bacterias más definidas, observación microscópica (Anexo 5) y se tomaron características morfológicas de las colonias sobre el medio sólido (Anexo 6) (Juarez, 2004).

2.3.6. Obtención del inóculo biolixivante

Del cultivo de enriquecimiento se tomó el sobrenadante y se raspó el mineral, a partir de este, se realizaron cultivos sucesivos para observar que la dinámica de crecimiento sea constante en los dos últimos sub cultivos. Esto nos indicará

que los microbios están activados y adaptados al medio de cultivo.

Al inóculo que se obtuvo de los sub cultivos, se le agregó el medio líquido 9k Silverman y Lundgren modificado y fue trasladado a un nuevo recipiente con aireación de 1vvm, este medio incubado se tomó como el inóculo para la realización del proceso de fermentación de la biolixiviación.

Se realizó un recuento de células en cámara de Neübauer para tener la concentración inicial del inóculo para comenzar la fermentación. El conteo se realizó en el área de $1/400 \text{ mm}^2$, la cámara de Neübauer se cargó con una pipeta Pasteur.

2.3.7. Caracterización y preparación del mineral a lixiviar (Acevedo, 2005)

Se realizó la técnica del cuarteo (Anexo 7) para tomar una muestra significativa del mineral calcopirita donado por la empresa minera Southern Perú Cooper Corporation.

Una vez que se obtuvo la cantidad de mineral necesaria, se realizó la molienda del mineral calcopirita, el cual se encontraba en nro. 10, la misma que se realizó en el molino de bolas del laboratorio de procesos de la Facultad de Metalurgia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

El mineral molido fue llevado a tamizar, usando la malla Tyler 100 para una buena realización de la biolixiviación ya que a medida que el tamaño de partícula decrece, aumenta el área superficial y por ende el número de sitios activos, por lo que se cree que aumenta la eficiencia del proceso.

2.3.8. Instalación de los biorreactores

Se instalaron 12 biorreactores aireados de capacidad de 1 litro, considerando que se realizarán 4 tratamientos con 2 repeticiones y 1 control, cada repetición es una unidad experimental, una unidad experimental es un biorreactor,

donde estará el mineral a lixiviar, más el microbio biolixivante a una determinada temperatura de incubación.

Se determinaron 4 tratamientos experimentales a las temperaturas de: 25°C, 40°C, 55°C Y 70°C. En cada biorreactor de capacidad de 1L, se adicionó 700 ml del medio 9K Silverman y Lundgren modificado, 70 ml del inóculo microbiano y 77 g del mineral (10% del volumen total); todos los biorreactores se adaptaron con mangueras y motores para su constante aireación (1vvm) (Anexo 8).

Tabla 3. Tratamientos instalados en los biorreactores para la biolixiviación de la calcopirita

Tratamiento		Medio de cultivo 9k modificado	Inóculo microbiano	Mineral calcopirita
25°C	R1	700ml	70 ml	77 g
	R2	700ml	70 ml	77 g
	R1	770ml	-	77 g
40°C	R1	700ml	70 ml	77 g
	R2	700ml	70 ml	77 g
	R1	770ml	-	77 g
55°C	R1	700ml	70 ml	77 g
	R2	700ml	70 ml	77 g
	R1	770ml	-	77 g
70°C	R1	700ml	70 ml	77 g
	R2	700ml	70 ml	77 g
	R1	770ml	-	77 g

Fuente. Elaboración propia

Cada tratamiento experimental a determinada temperatura tuvo dos repeticiones y un control, el cual tuvo las mismas condiciones que los tratamientos experimentales a excepto

que no se le agregó inóculo y en su reemplazo se le adicionó medio de cultivo en la misma proporción.

2.3.9. Fermentación de biolixiviación

El biorreactor se cargó con las proporciones establecidas, el proceso se evaluó cada 24 horas durante 336 horas, en los cuales se realizó la determinación de la concentración de biomasa (recuento celular), la evaluación del hierro total, hierro III y la evaluación del cobre.

2.3.9.1. Evaluación de la fermentación de la biolixiviación

a) Determinación de la concentración de biomasa (recuento celular)

El recuento se realizó cada 24 horas, se tomó un 1 ml del medio fermentativo de cada biorreactor, en todos se realizó una dilución de 10^{-1} para una mejor observación de las bacterias. El recuento se

hizo después de cargar la muestra del cultivo líquido 9K a la cámara de Neubauer, el conteo se realizó en el área central de las cuadrículas de área $1/400 \text{ mm}^2$, empleando luego la fórmula de $N = (X_{400})(400)(10^4)$ para determinar la concentración microbiana (Anexo 09).

b) Evaluación del fierro _{total} y fierro III por método de espectrofotometría (Cabaña 2005)

La evaluación del fierro _{total} y el fierro III se realizó cada 48 horas desde el inicio de la fermentación, tomando muestras en viales de 8-10 ml.

- **Preparación de la curva de calibración**

La curva de calibración para la determinación de la concentración de fierro se determinó de la siguiente manera:

Se preparó una solución madre de 200 ppm de Fe III, para esto se pesó 0,0488 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, el cual se colocó en una fiola de 50 ml de capacidad que a su vez se enrazó a 50 ml con agua destilada, luego se preparó diluciones de la solución madre a las concentraciones de 0,04, 0,08, 0,01 0,012 y 0,014 g/L empleando como diluyente agua destilada.

A continuación se agregó a 5 tubos de ensayo 0,5 ml de cada concentración preparada y a un sexto tubo 0,5 ml de agua destilada, que se tomó como blanco.

En cada uno de los 6 tubos se adicionó 0,5 ml de H_2SO_4 3M, luego 1-2 gotas de KMnO_4 0,1 N y 3 ml de KSCN 2M, finalmente todos los tubos se enrazaron con agua destilada. Se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 477 nm. de longitud de onda.

Las lecturas de absorbancia se llevaron a Excel para ser graficadas y establecer la curva de calibración (Anexo 10).

- **Determinación de Fe total en muestras**

Para realizar las determinaciones, se realizó previamente una dilución de la muestra de 1/100, de esta dilución se tomó la muestra para ser analizada.

La determinación del hierro total se realizó de la siguiente manera:

Se colocó en tubos de ensayo 0,5 ml de la muestra obtenida del biorreactor, se le adicionó 0,5 ml de H_2SO_4 3M, 1-2 gota de KMnO_4 0,1N y 3 ml de KSCN 2M de manera similar a lo trabajado con las diluciones de la solución madre, luego los tubos se enrazaron con agua destilada y se realizó la lectura en el

espectrofotómetro a 477 nm. de longitud de onda (Anexo 11). Estas lecturas se llevaron a la curva de calibración para la determinación del hierro total.

- **Determinación de Fe III en muestras**

Se realizó de la siguiente manera:

En tubos de ensayo, se colocó 0,5 ml de la muestra obtenida y se agregó 0,5 ml de H₂SO₄ 3M y 3 ml de KSCN 2M, luego se enrazó a 10 ml con agua destilada finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 477 nm de longitud de onda (Anexo 12).

- **Determinación de Fe II en muestras**

Se realizó por diferencia de Fe_{total} con el Fe III:

$$\text{Fe II} = \text{Fe}_{\text{total}} - \text{Fe III}$$

c) Evaluación del cobre total por absorción atómica

Las muestras obtenidas del biorreactor se filtraron con filtro de membrana Nro. 42. A continuación fueron llevadas al equipo de absorción atómica de la Facultad de Metalurgia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, para poder tener los valores de cobre (Anexo 13).

2.3.10. Análisis de Datos

2.3.10.1. Tabulación de datos y representaciones gráficas

Todos los datos obtenidos fueron llevados a un cuadro (Anexo 14) realizado en Word para tener la información organizada por cada día de experimentación.

En el caso de los tratamientos experimentales, para la determinación de concentración microbiana

que tuvieron repeticiones, se sacó un promedio entre ambas y ese fue tomado como el dato real, el cual se encontraba en cel/ml y fue convertido a unidades logarítmicas de cel/ml. Se realizaron gráficos por cada tratamiento experimental en el programa de Excel.

Para el caso del fierro, los valores obtenidos se encontraban en absorbancia, estos fueron convertidos a g/L, usando la curva de calibración realizada anteriormente para el fierro. Los resultados de la determinación del fierro total, fierro total, III y II fueron graficados en el programa Excel. Se determinó la concentración máxima de fierro obtenida en cada tratamiento

En el caso del cobre, los valores también se encontraban en absorbancia, estos fueron convertidos a g/l por la curva de calibración realizada por el equipo de absorción atómica. Los resultados obtenidos fueron graficados en el programa Excel.

2.3.10.2. Análisis Estadístico

El Análisis de los datos se realizó en el programa de Excel, utilizando el ANOVA ente los tratamientos para poder establecer la diferencia significativa ente los tratamientos experimentales, tanto para la concentración microbiana como para la determinación del fierro III.

III. RESULTADOS

3.1. Determinación de la concentración microbiana y de cobre biolixiviado máxima a diferentes temperaturas

3.1.1. Determinación de concentración microbiana

Tabla 4. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita

HORAS	CONCENTRACION MICROBIANA	
	(células/ml)	log de cel/ml
0	6×10^7	7,77815125
24	7×10^7	7,84509804
48	8×10^7	7,903089987
72	$7,5 \times 10^7$	7,875061263
96	8×10^7	7,903089987
120	$6,75 \times 10^7$	7,829303773
144	7×10^7	7,84509804
168	8×10^7	7,903089987
192	8×10^7	7,903089987
216	$9,5 \times 10^7$	7,977723605
240	9×10^7	7,954242509
264	1×10^8	8
288	1×10^8	8
312	$1,1 \times 10^8$	8,041392685
336	1×10^7	8

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

La Tabla 4 presenta todos los valores de la concentración microbiana obtenidos en el proceso de biolixiviación en el tratamiento experimental a una temperatura de 25°C, donde la mayor concentración microbiana se dio a las 312 horas llegando a 8,041392685 unidades logarítmicas de cel/ml

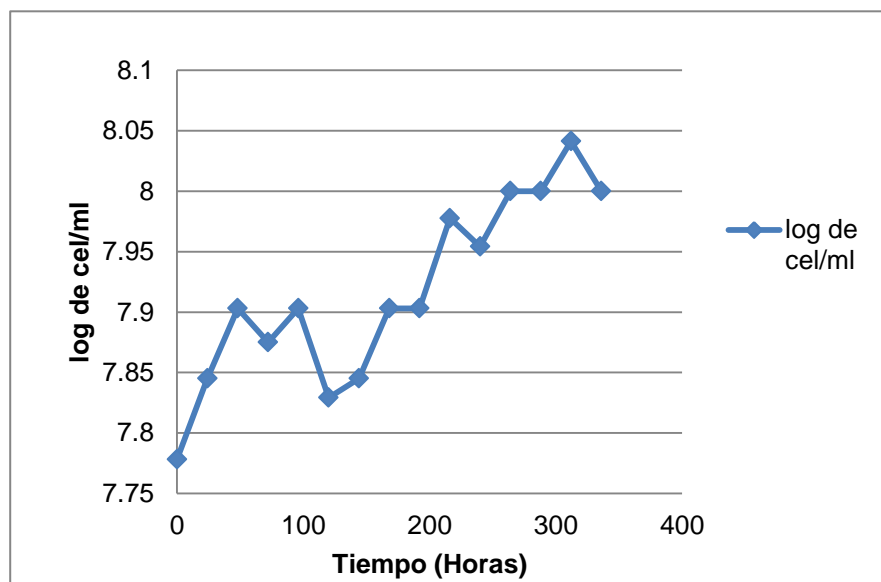


Gráfico 1. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita

Fuente. Elaboración propia

Interpretación:

En el Gráfico 1 se muestra la curva de crecimiento de la concentración microbiana, en el proceso de biolixiviación de la calcopirita a la temperatura de 25°C.

Tabla 5. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita.

HORAS	CONCENTRACION MICROBIANA	
	(células/ml)	log de cel/ml
0	6×10^7	7,77815125
24	8×10^7	7,903089987
48	7×10^7	7,84509804
72	7×10^7	7,84509804
96	8×10^7	7,903089987
120	7×10^7	7,84509804
144	9×10^7	7,954242509
168	$1,5 \times 10^8$	8,176091259
192	$1,2 \times 10^8$	8,079181246
216	1×10^8	8
240	1×10^8	8
264	1×10^8	8
288	1×10^8	8
312	9×10^7	7,954242509
336	8×10^7	7,903089987

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

La Tabla 5 contiene los valores de concentración microbiana obtenidos desde las 0 horas hasta las 336 horas a la temperatura de 40°C, donde la mayor concentración microbiana se dió a las 168 horas con una concentración de 8,176091259 unidades logarítmicas de cel/ml.

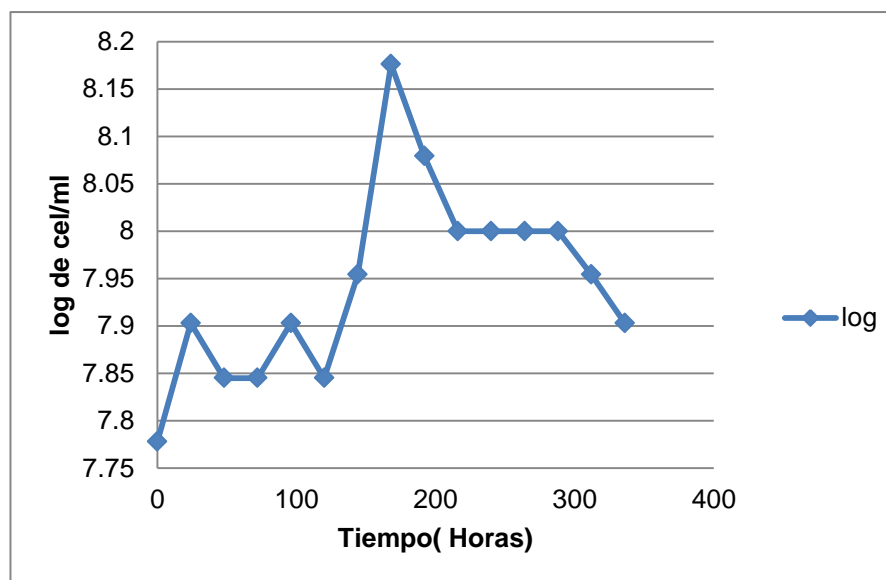


Gráfico 2. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

El Gráfico 2 muestra la curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 40°C, donde se puede observar el punto más alto de la concentración microbiana a aproximadamente las 200 horas del tratamiento.

Tabla 6. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita.

HORAS	CONCENTRACIÓN MICROBIANA	
	(células/ml)	log de cel/ml
0	6×10^7	7,77815125
24	6×10^7	7,77815125
48	6×10^7	7,77815125
72	6×10^7	7,77815125
96	6×10^7	7,77815125
120	6×10^7	7,77815125
144	1×10^8	8
168	$1,4 \times 10^8$	8,146128036
192	$1,1 \times 10^8$	8,041392685
216	$1,2 \times 10^8$	8,079181246
240	$1,3 \times 10^8$	8,113943352
264	$1,3 \times 10^8$	8,113943352
288	$1,2 \times 10^8$	8,079181246
312	$1,1 \times 10^8$	8,041392685
336	1×10^8	8

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 6 se muestra los valores de concentración microbiana a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita, donde la concentración llegó a un punto máximo a las 168 horas con una concentración de 8,146128036 unidades logarítmicas de cel/ml.

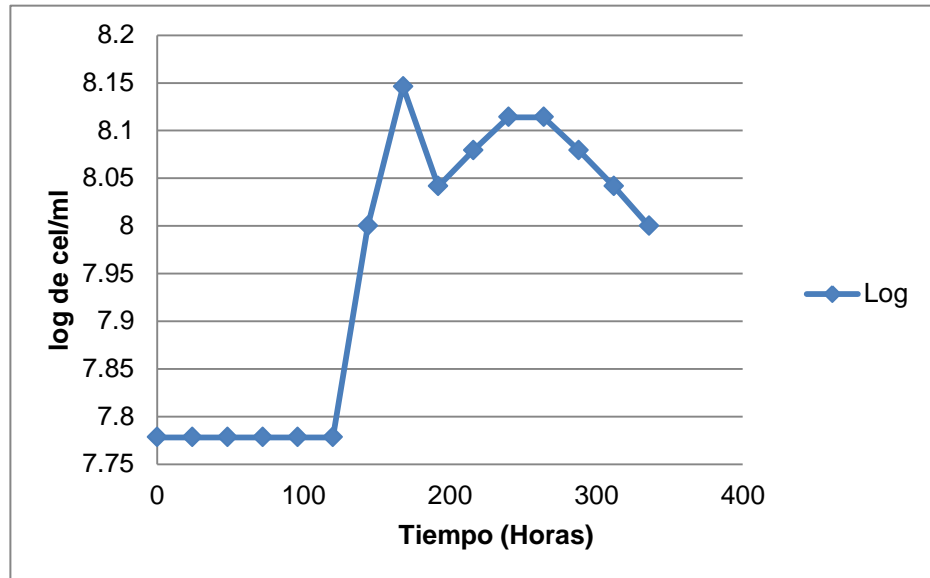


Gráfico 3. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 3 se muestra la curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 55°C de la biolixiviación de la calcopirita, se puede apreciar claramente la fase de adaptación, logarítmica y estacionaria de la concentración microbiana.

Tabla 7. Valores de concentración microbiana a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

HORAS	CONCENTRACIÓN MICROBIANA	
	(células/ml)	log de cel./ml
0	4×10^7	7,602059991
24	5×10^7	7,69897
48	5×10^7	7,69897
72	$5,5 \times 10^7$	7,74036269
96	7×10^7	7,84509804
120	6×10^7	7,77815125
144	8×10^7	7,90308999
168	7×10^7	7,84509804
192	8×10^7	7,90308999
216	8×10^7	7,90308999
240	$8,5 \times 10^7$	7,92941893
264	$9,5 \times 10^7$	7,97772361
288	$1,1 \times 10^8$	8,04139269
312	$1,6 \times 10^8$	8,20411998
336	$1,4 \times 10^8$	8,14612804

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

La Tabla 7 muestra los valores de concentración microbiana a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita, donde se aprecia que el punto más alto de la concentración microbiana se dio a las 312 horas con una concentración de 8,20411998 unidades logarítmicas de cel/ml.

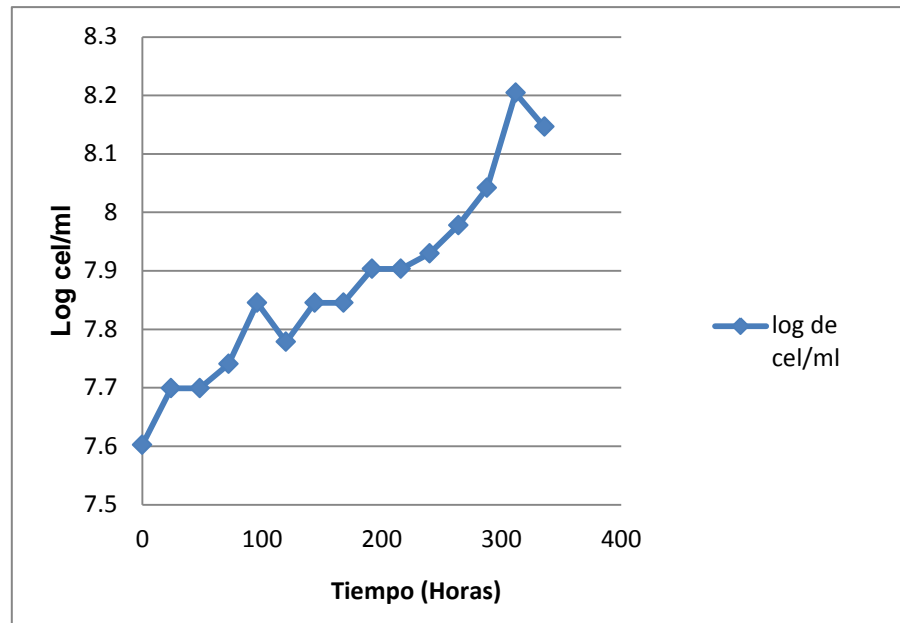


Gráfico 4. Curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 4 se observa la curva de crecimiento de la concentración microbiana a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita, se puede apreciar la fase estacionaria, logarítmica del crecimiento microbiano.

3.1.2. Determinación de cobre biolixiviado

Para la determinación del cobre, primero se realizó la determinación del ion ferroso (Fe II), para poder distinguir el tratamiento experimental con mayor oxidación.

3.1.2.1. Determinación de Fe III

Tabla 8. Valores de concentración en g/l de hierro total, Fe III y Fe II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Horas	Fe Total	Fe III	Fe II
0	2,821044319	0,837034844	1,984009476
48	5,821735268	2,801302932	3,020432336
96	6,2560458	3,906820649	2,349225151
144	8,210443194	7,401046294	0,809396901
192	7,252985885	6,700227026	0,552758859
240	8,328891521	7,420787681	0,90810384
288	7,835356826	6,976606455	0,85875037
336	8,062382786	6,907511598	1,154871187

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 8 se muestran los valores de concentración en g/l del hierro total, Fe III y Fe II, obtenidos en el tratamiento experimental de 25°C, donde se observa que la mayor oxidación del Fe III se dió a las 240 horas con una concentración de 7,42078768 g/l.

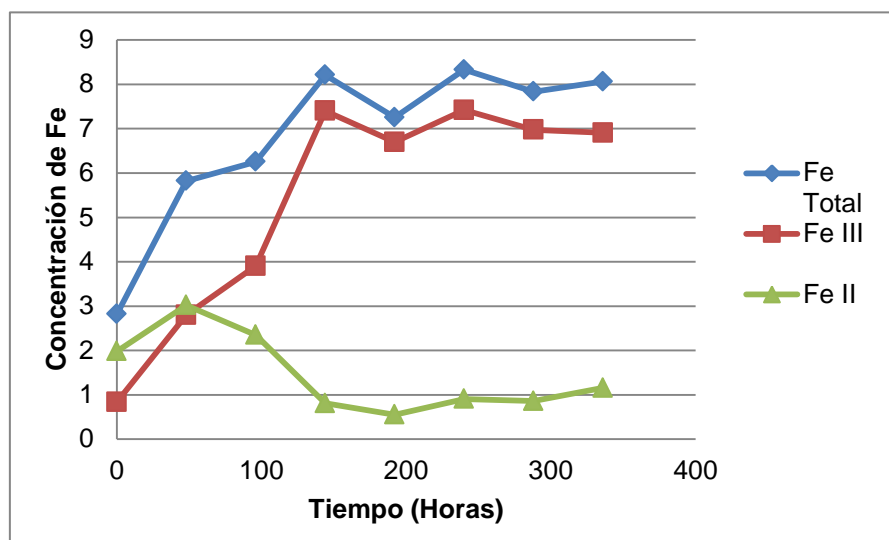


Gráfico 5. Curva de concentraciones del Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 25°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 5 se observa la curva de concentraciones del Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 25°C biolixiviación de la calcopirita, donde se aprecia que el mayor punto de oxidación se dió cerca a las 250 horas de la fermentación.

Tabla 9. Valores de concentración en g/l de Hierro total, Hierro III y hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Horas	Fe total	Fe III	Fe II
0	3,057940973	0,748198598	2,309742375
48	6,2560458	2,465699339	3,790346461
96	7,489882539	2,830915013	4,658967525
144	10,83604777	5,634192084	5,20185569
192	7,489882539	5,525614451	1,964268088
240	7,74652058	6,66074425	1,08577633
288	6,601520087	6,117856085	0,483664002
336	7,252985885	6,137597473	1,115388412

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 9 se muestran los valores de concentración en g/l de hierro total, hierro III y hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 40°C biolixiviación de la calcopirita, donde se aprecia que la mayor oxidación del Fe III se dio a las 240 con una concentración de 6,66074425 g/l.

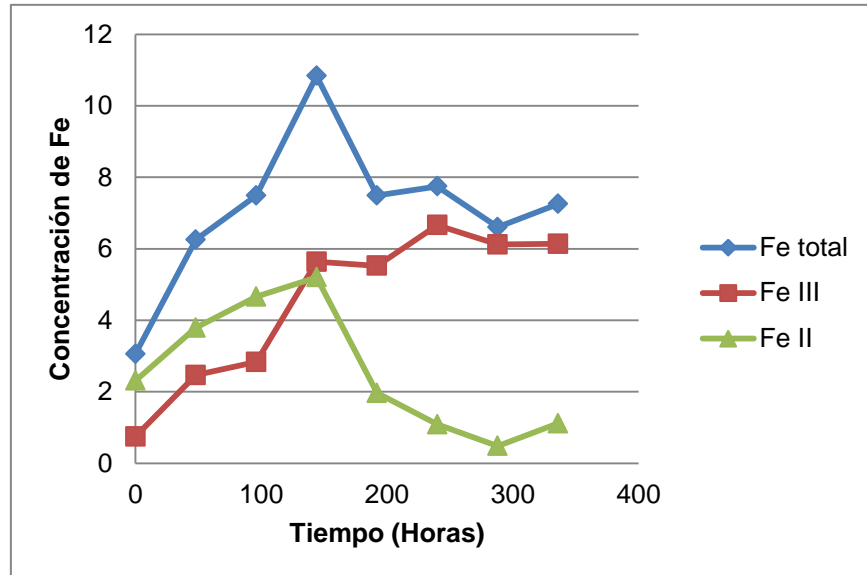


Gráfico 6. Curva de concentraciones del Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 40°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 6 se observa la curva de concentraciones del Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 40°C biolixiviación de la calcopirita.

Tabla 10. Valores de concentración en g/l de Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Horas	Fe total	Fe III	Fe II
0	2,672983911	0,807422762	1,865561149
48	7,223373803	2,297897542	4,925476261
96	6,581778699	5,39729543	1,184483269
144	10,25367683	8,733589971	1,520086862
192	8,802684829	7,154278946	1,648405883
240	9,51337479	8,101865561	1,411509229
288	8,763202053	7,934063765	0,829138288
336	8,319020827	6,966735762	1,352285066

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 10 se muestra los valores de concentración en g/l de fierro total, fierro III y fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita, donde se aprecia una mayor oxidación del Fe III a las 144 horas, llegando a una concentración de 8,733589971 g/l.

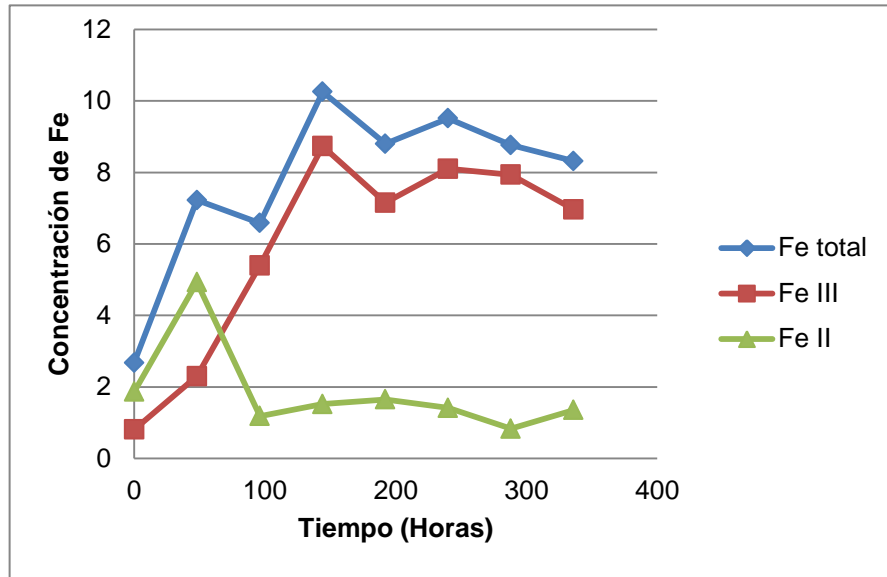


Gráfico 7. Curva de concentraciones del Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 55°C en la biolixiviación de la calcopirita

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 7 se muestra la curva de concentraciones del Fierro total, Fierro III y Fierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 55°C biolixiviación de la calcopirita.

Tabla 11. Valores de concentración en g/l de Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Horas	Fe total	Fe III	Fe II
0	2,712466686	0,916000395	1,796466292
48	6,769321883	2,603889053	4,16543283
96	12,16859145	6,137597473	6,030993979
144	20,55868128	12,9088935	7,64978778
192	15,31734281	10,01678018	5,30056263
240	14,39936828	10,13522851	4,264139769
288	12,46471227	9,651564505	2,813147764
336	13,43204027	9,315960912	4,11607936

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 11 se muestran los Valores de concentración en g/l de hierro total, hierro III y hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C biolixiviación de la calcopirita, se aprecia que la mayor oxidación del Fe III se dio a las 144 horas llegando a una concentración de 12,9088935 g/l.

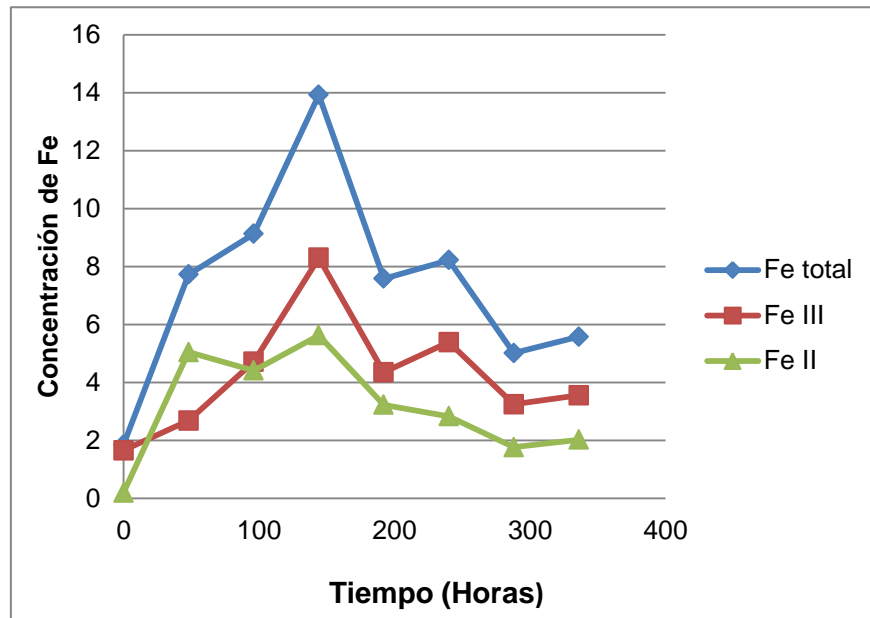


Gráfico 8. Curva de concentraciones del Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el Gráfico 8 se muestra las curva de concentraciones del Hierro total, Hierro III y Hierro II obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C biolixiviación de la calcopirita.

3.1.2.2. Determinación de cobre en función de la mayor concentración de Fe III encontrado entre los tratamientos

Entre los cuatro tratamientos experimentales de 25, 40, 55 y 70°C, se apreció una mayor oxidación del Hierro III en el tratamiento de 70°C.

Tabla 12. Valores de concentración en g/l de cobre obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Horas	Concentración de Cu (g/l)
0	0,113303503
48	0,206481244
96	0,252587175
144	0,275038931
192	0,212335653
240	0,235437898
288	0,195580611
336	0,221462222

Fuente. Elaboración propia.

Interpretación

En la Tabla 12 se muestran los valores de concentración en g/l de cobre obtenidos en el tratamiento experimental a la temperatura de 70°C biolixiviación de la calcopirita, se aprecia que el valor más alto de concentración del cobre se dió a las 144 horas con una concentración de 0,275038931 g/l.

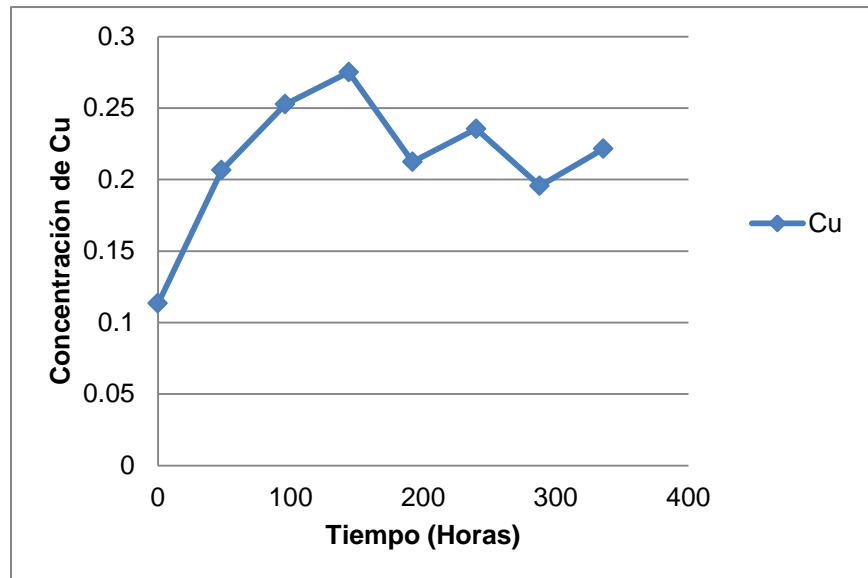


Gráfico 9. Curva de Concentración del Cobre obtenido en el tratamiento experimental de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Fuente. Elaboración propia.

Interpretación

En el Gráfico 9 se muestra la curva de concentración del cobre obtenido en el tratamiento experimental de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

3.2. Determinación de la temperatura a la cual se establece mayor concentración microbiana y de cobre biolixiviado

3.2.1. Determinación de la temperatura a la cual se establece mayor concentración microbiana

Tabla 13. Valores de la máximas concentraciones microbianas en unidades logarítmicas cel/ml, con sus repeticiones y promedio a las temperaturas de 25, 40, 55 y 70°C en la biolixiviación de la calcopirita

Tratamientos	Mayor Concentración microbiana		
	R1	R2	Promedio
25	8	8,08278537	8,041392685
40	8,14824251	8,20394000	8,176091259
55	8,10918125	8,18307482	8,146128036
70	8,24139269	8,166847276	8,204119983

Fuente: Elaboración Propia.

Interpretación

En la Tabla 13 se muestra que la mayor concentración microbiana se dió en el tratamiento de 70°C alcanzando un total de 8,204119983 unidades logarítmicas de cel/ml.

Tabla 14. Análisis de Varianza (ANOVA) en función de la producción máxima de la concentración microbiana.

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Promedio de cuadrados	Razón-F	Valor -P
Entre grupos	0,011568929	3	0,00385631	0,4	0,77
Dentro de los grupos	0,0393094	4	0,00982735		
Total	0,050878329	7			

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el análisis de varianza el Valor- P, determina que no hay una significancia estadística en cada uno de los tratamientos a diferentes temperaturas para la concentración microbiana, puesto que el valor P para la concentración microbiana fue de 0,77 y es mayor que 0,05; es por eso que no hay un efecto significativo sobre las temperaturas con un 95% de nivel de confianza.

3.2.2. Determinación de la temperatura a la cual se establece mayor concentración de fierro biooxidado

Tabla 15. Valores de la máximas concentraciones de fierro biooxidado en g/L, a las temperaturas de 25, 40, 55 y 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Tratamientos	Fierro III	
25°C	6.70022703	7.42078768
40°C	5.52561445	6.66074425
55°C	5.39729543	8.73358997
70°C	10.0167802	12,9088935

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

La Tabla 15 presenta los valores máximos de fierro biooxidado en los diferentes tratamientos a las temperaturas de 25, 40, 55 y 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Tabla 16. Análisis de Varianza (ANOVA) en función de la máxima concentración de hierro biooxidado.

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Promedio de cuadrados	Valor F	Valor P
Entre grupos	17,9503211	3	5,983440377	3,70	0,11
Dentro de los grupos	6,4763093	4	1,619077324		
Total	24,4266304	7			

Fuente. Elaboración propia

Interpretación

En el análisis de varianza el Valor- P, determina que no hay una significancia estadística en cada uno de los tratamientos a diferentes temperaturas para la biooxidación del hierro puesto que el valor P para la concentración microbiana fue de 0.11 y es mayor que 0,05; es por eso que no hay un efecto significativo sobre las temperaturas con un 95% de nivel de confianza.

3.3 Establecimiento del grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano, la biooxidación del Fe III y biolixiviación de cobre.

3.3.1. Datos para la correlación

Tabla 17. Valores de Concentración microbiana log de cel./ml, concentración de fierro III y concentración de Cu a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

Horas	Concentración microbiana log de cel./ml	Concentración de Fierro III	Concentración de Cu
0	7,602059991	0,911065048	0,113303503
48	7,698970004	2,598953706	0,206481244
96	7,84509804	6,137597473	0,252587175
144	7,90308999	12,9088935	0,275038931
192	7,903089987	10,01579311	0,212335653
240	7,929418926	10,13917678	0,235437898
288	8,04139269	9,648603297	0,195580611
336	8,14612804	9,311025565	0,221462222

Fuente: Elaboración propia

Interpretación

En la Tabla 17 se observa que la oxidación del Fierro III, la concentración microbiana y la concentración de Cu en el proceso de la biolixiviación de la calcopirita tuvo un incremento positivo a medida que transcurrió el tiempo, obteniéndose valores máximos de 8,04139269 u/log a las 288 horas, de fierro III 12,9088 a las 144 horas y de cobre 0,275038931 a las 144 horas.

3.3.2. Establecimiento de la correlación entre la concentración microbiana, concentración de Fe III y concentración de Cu.

Tabla 18. Valores de correlación entre la concentración microbiana, concentración de Fe III y la concentración de Cu obtenidos a la temperatura de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.

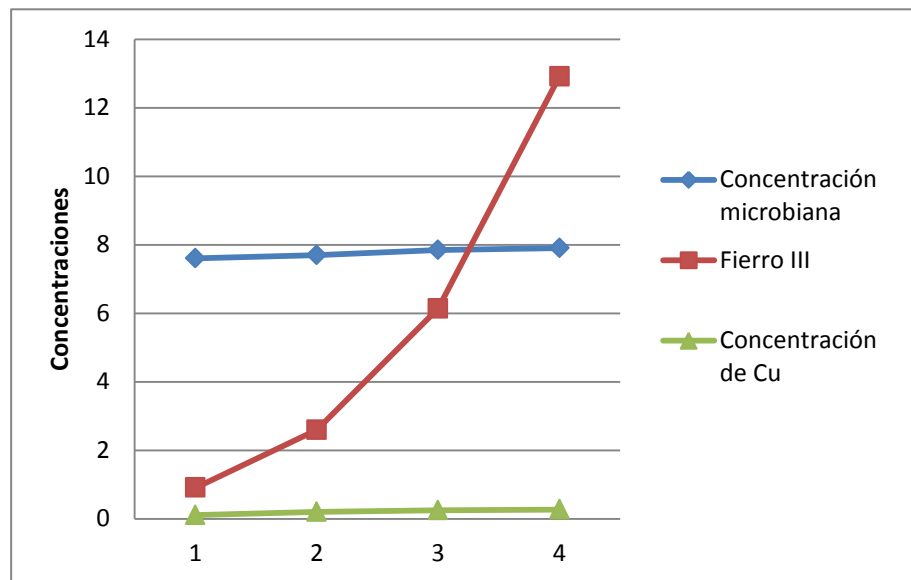
Correlación	Valores
Concentración microbiana - Concentración de Fierro III	0,922207698
Concentración microbiana - Concentración de Cu	0,964194326
Concentración de Fierro III- Concentración de Cu	0,882478032

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación

En la Tabla 18 se observan los valores de correlación de concentración microbiana y concentración de Fe III la cual fue de **0,922207698**, Concentración microbiana – Concentración de Cu la cual fue de **0,964194326** y la de Concentración de Fierro III - Concentración de Cu la cual fue de **0,882478032**.

Gráfico 10. Curva de valores de Concentración microbiana, Concentración de Fierro III y Concentración de Cu obtenidos en el tratamiento de 70°C en la biolixiviación de la calcopirita.



Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En el Gráfico 10 se observa que la concentración microbiana y la concentración de Cu aumentaron casi paralelamente mientras que la concentración de Fe III tuvo un mayor incremento.

IV. DISCUSIÓN

La temperatura es uno de los principales factores físicos involucrados en el proceso de biolixiviación, la lixiviación usando microorganismos depende de factores físicos, químicos y biológicos (Bosecker, 2004). El factor biológico con más importancia en este proceso es el inóculo microbiano, el cual se usó en su fase logarítmica de 4×10^7 después de un previo enriquecimiento del mismo, la reacción de oxidación de los microorganismos depende de las condiciones del medio ambiente, también es altamente dependiente de la eficacia de la actividad microbiana y de la naturaleza cristaloquímica de los minerales portadores de la fuente de energía (Juárez, 2004)

El medio de cultivo que se empleó fue el medio líquido 9K (Silverman & Lundgren, 1959) modificado para biolixivantes, fue el indicado, ya que permitió el crecimiento y desarrollo adecuado del cultivo microbiano biolixivante, la modificación realizada ayudó a la disminución de la producción de jarosita, la cual al aumentar en el biorreactor impide el crecimiento de las bacterias y por consiguiente la biolixiviación.

La aireación de 1vvm utilizada fue la necesaria para iniciar la fermentación y asegurar el desarrollo microbiano, ya que estas bacterias necesitan un ambiente con oxígeno (1-1,5 vvm) para su crecimiento microbiano como para realizar la biolixiviación. El aire aporta el oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂) necesarios para la biolixiviación, por lo que es importante asegurar la aireación (Delgado, 2001)

En el proceso de preparación del medio de cultivo, tanto sólido como líquido, se tuvo gran cuidado al llevar el pH al adecuado que es de 1,5-2,0 con H₂SO₄, ya que un aumento del mismo inhibe el desarrollo de estas bacterias, se han reportado que un aumento de entre pH 1,5, involucra variaciones visibles en la composición de proteínas de la célula, lo cual indica que la bacteria pasara antes por un mecanismo de adaptación (Acevedo, 2005).

Entre todos los tratamientos experimentales (25, 40, 55 y 70°C), los resultados nos indican que existe una mayor concentración microbiana llegando a $1,1 \times 10^8$ cel/ml y biooxidación de 12,90 en el tratamiento experimental de 70°C, el efecto de la temperatura en la cinética de disolución de la calcopirita es significativo. Al aumentar la temperatura se mejora la velocidad de disolución. A bajas temperaturas la acción de las

bacterias disminuye y con ello la recuperación de cobre (Ibañez, 2012). La mayor tasa de solubilización de cobre ocurre a elevadas temperaturas (>65°C), siendo así atractivo el uso de microorganismos hipertermófilos hierro y azufre oxidantes en la biolixiviación.

En la biolixiviación de calcopirita por *Sulfolobus metallicus* a 70 °C hay una eficiente oxidación de compuestos reducidos de azufre, es decir, azufre y polisulfuros los cuales son formados durante la disolución del sulfuro. La oxidación de compuestos reducidos de azufre involucra la participación de un mecanismo de catálisis química desencadenada por la presencia de oxígeno disuelto en solución. Este mecanismo permitió tener una oxidación eficiente de los compuestos reducidos de azufre en la biolixiviación de calcopirita con *S. metallicus* inclusive en situaciones cuando el microorganismo no es capaz de alcanzar la superficie del mineral (Dominguez, 2007).

Estudios indican que, como regla general, la velocidad de las reacciones químicas se duplica con el aumento en 10°C en la temperatura. A pesar que la velocidad de descomposición es lo suficientemente rápida en 35- 40°C para casi todos los minerales, para otros casos como calcopirita temperaturas en el intervalo 45-80°C son

indispensables para hacer que el proceso sea económicamente viable (Rawling, 1994). Esto pudo ser contrastado en el presente trabajo, ya que al aumentar la temperatura (70°C) hubo una mejor biooxidación y biolixiviación.

En el proceso de biolixiviación realizado, se usaron consorcios microbianos o cultivos microbianos biolixivantes nativos, el uso de este tipo de inóculo permitió que todos los microorganismos biolixivantes interactúen entre sí, ya que algunos de estos microorganismos necesitan del producto que genera un microorganismo precursor, creando así un ambiente propicio para el desarrollo de otro; se ha descrito en varias ocasiones que se mejora la oxidación del mineral cuando las poblaciones son mixtas. Los co-cultivos de *L.Ferroxidans* y los oxidadores de azufre *T. thiooxidans* o *T. caldos* (termófilos moderados) ha mostrado causar más eficiente la disolución de la calcopirita que en los cultivos solos. El proceso de sinergismo, propicia sincronía metabólica a las bacterias termófilas moderadas *Sulfobacillus* spp y *A. Ferrooxidans* que oxidan el azufre.

V. CONCLUSIONES

- Se determinó el efecto de la temperatura en la biolixiviación de la calcopirita, obteniendo que la temperatura a la cual se produce una mayor biooxidación y biolixiviación es de 70°C, el grado de correlación en el crecimiento microbiano y la biolixiviación de la calcopirita por un cultivo microbiano biolixivante fue de 0,964194326, lo que indica que nos indica que están directamente relacionados.
- Se determinó la concentración microbiana máxima, la cual fue de 8,20411998 log de cel./ml a las 312 horas, la biolixiviación de cobre máxima fué de 0,275038931 g/l en el tratamiento experimental de 70°C.
- Se determinó que la temperatura a la cual se establece una mayor concentración microbiana y cobre biolixiviado fue en el tratamiento experimental expuesto a 70°C.

- Se estableció el grado de correlación entre la curva de crecimiento microbiano y la biooxidación del hierro el cual tuvo un valor de 0,922207698, la correlación entre la biooxidación del hierro y la biolixiviación de cobre fue de 0,882478032.

VI. RECOMENDACIONES

- Es necesaria enteras otras investigaciones, realizar estudios sobre otros factores que afectan el crecimiento microbiano de estos microorganismos biolixiviantes como: la luz, oxígeno, CO₂ y nutrientes.
- Se debe tener en cuenta el pH del medio de cultivo al momento del enriquecimiento, así como en toda la biolixiviación.
- Se debe realizar una prueba piloto para poder establecer los valores para la curva de calibración del fierro.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Acevedo, Fernando;** (2005), Fundamentos y Perspectivas de las tecnología Biomineras, Edición universitaria de Valparaíso, Chile, pag, 25-35.
2. **Arias Sifuentes, E.; Piñeros Espinosa, P.** (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Tesis de grado de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javierana, 159.
3. **Archilla, A;** (2005), Uso de Biorreactores para la Lixiviación de un mineral oxidado, Universidad Nacional de Comahue, Argentina, pag. 23-30.
4. **Asociación Nacional de Industria Química A.C.** (2006). Muestreo de suelos para la identificación y la cuantificación de metales y metaloides, y manejo de la muestra. México D.F.

5. **Ballester, A;** (2000). “Lixiviación Bacteriana”. Parte IV: Hidrometalurgia, Cap. 17. pp. 398-425.

6. **Bosecker, H;** (2004). Aislamiento de bacterias acidófilas a partir del drenaje ácido proveniente de las inmediaciones a las unidades mineras de Julcani y Recuperada, Huancavelica, Rev. del Instituto de Investigación (RIIGEO), FIGMMG-UNMSM.

7. **Brandl, H;** (2001). “Microbial leaching of metáis.” In: Rehm H.J. (ed.) Biotechnology, Vol. 10. Wiley-VCH, Weinheim, 191-224.

8. **Brierley, J.A.** (2001). “Present and future commercial applications of biohydrometallurgy”.233-239.

9. **Cabaña, R;** (2005); Determinación de sulfato ferroso por espectroscopia visible, Memoria, Encuentro de jóvenes investigadores, España.

10. **CIMM**, Centro de Investigación minera y metalúrgica. (2005). “Biolixiviación la nueva minería”. Antofagasta- Chile.
11. **COCHILCO**, Comisión chilena del cobre. (2009). “Biolixiviación: Desarrollo Actual y sus Expectativas”. Chile.
12. **Colmer, A.R & Hincle, M.E.** (1947). “The role of microorganisms in acid mine drainage: apreleminary report” 253-256.
13. **Constanza Corrales Lucía.** (2000). Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del Departamento de Boyaca Tesis Doctoral. Universidad de Colombia. 187.
14. **Córdoba, E.M.** (2008). Leaching of chalcopyrite with ferric ion. Part I: General aspects. Hydrometallurgy, 93, 81–87.
15. **Corrales, Lucía; Sánchez, Ligia; Sánchez, Paula; Sánchez, L; Sánchez, Viviana; Zarate, Julieth.** (2006). Estudio piloto de aislamiento y fenotipificación de bacterias que participan en los

procesos de biolixiviación, en las zonas mineras del departamento de Boyaca. Nova Publicación Científica. Volumen (04)ISSN: 1794-2470. Pp 57-63.

16. Delgado, Francisca. (2001). “Aislamiento de *Thiobacillus* sp. e influencia de cuatro fuentes nitrogenadas en la producción de su biomasa y en la oxidación del ion ferroso”. Tesis de título. Universidad Nacional de Trujillo.

17. Domínguez, P. (2007). Estudio de la expresión de proteínas en *Sulfolobus metallicus* durante la biolixiviación de calcopirita. Memoria para optar al título de ingeniero civil en biotecnología. Universidad de Santiago de Chile. 162.

18. Donati, Edgardo. (2012). “Tecnologías más limpias en Minería-Biominería”. La Plata, Argentina.

19. Gacés, Ingrid. (2006). “Metalurgia del Cobre”, Universidad de Antofagasta. Facultad de Ingeniería. Chile.

- 20. Gómez, E.** (1999). "Biolixiviación de mineral de calcopirita con empleo de iones metálicos", Rev. Biológica, Vol. 13. España.
- 21. Harrison, A.** (1984). The *Acidophilic thiobacilli* and other acidophilic bacteria that share their habitat. Rev. Microbiol. 38:265-292.
- 22. Ibáñez ,T; Velásquez, L.** (2012). "Lixiviación de la calcopirita en medios clorurados" Revista de Metalurgia de Chile.pp34-41.
- 23. Ingledew, W.J.** (1982). "Thiobacillus ferrooxidans. The bioenergetics of an acidophilic chemolitotroph". Biophys 683:98-117.
- 24. Jeffrey, F & Lawson.** (2000). "Hydrometallurgy". 189-202.
- 25. Juárez, A.** (2004). Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de

microorganismos involucrados. Tesis de Doctor en Biotecnología, Universidad de Colima.140.

26. Kelly & Wood. (2000). "Reclassification of some species of thiobacillus to the designated genera Acidithiobacillus gen", International journal of systematic and evolutionary microbiology. Gran Bretaña Pag. 511-516.

27. Lagos Miranda, C. (2009). Biolixiviación: Desarrollo actual y sus expectativas. Dirección de Estudios y Políticas Públicas de Comisión Chilena del Cobre, COCHILCO

28. Ly, M. (2003). "Biolixiviación a a nivel industrial", Encuentro Científico Internacional. Inf. IPEN. Perú.

29. Marchant, P.B. (1986). "Commercial application of biotechnology to enhance gold extraction from complex sulfides". Ottawa - Canada, pp. 407-437.

30. Mejia, E. (2004). Mineralogía del proceso de lixiviación bacteriana de calcopirita ($CuFeS_2$), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). Tesis para optar al título de magíster en ingeniería de materiales y procesos. Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 198.

31. Menadier Stavelot, M. (2009). Biolixiviación de piritas por *Acidithiobacillus ferrooxidans* y cepas nativas. Tesis para optar por título de Ingeniero Civil en biotecnología, Universidad de Chile. 165.

32. Monroy, M; Galvan, R; Lazaro, I. (2003). "Biolixiviación de concentrados de calcopirita por bacterias termofilas extremas: Productos y procesos implicados". Tesis de grado. Universidad Federal de México. 153.

33. Moreno, P.A., H. Aral, J. Cuevas, A. Monardes, M. Adaro, T. Norgate y W. Bruckard, (2011). "Miner Engennier". 852-858.

34. Muñoz, Alexandra; Márquez M.; Montoya, Olga; Ruíz, O.; Lemehsko, V. (2003). Evaluación de oxidación bacteriana de

sulfuros con *Acidithiobacillus ferrooxidans* mediante pruebas de FTIR y difracción de rayos X. Revista Científica Colombiana de Biotecnología. Volumen (05), pp73-81.

35. Orrantia, E. (1997). Aislamiento y caracterización de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita. Tesis de doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. 256.

36. Osorio, V; Márquez, Edna; Márquez, M. (2007). Caracterización por Ardea de microorganismos acidófilos aislados en minas de oro de Marmato, Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología. Volumen (01), pp14-21.

37. Pradhan, N., Nathsarma, K.C., Srinivasarao, K., Sukla, L.B., Mishra, B.K. (2008). "Heap Bioleaching of chalcopyrite: a review". Minerals Engineerring, 355-365.

- 38. Rawlings, D, Kusano, T.** (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58:39-55.
- 39. Rivadeneira, D.** (2006). Adaptación de una cepa compatible con *Acidithiobacillus ferrooxidans* sobre concentrados de calcopirita (CuFeS₂), esfalerita (ZnS) y galena (PbS). *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XIII, núm. 1, julio, 2011, pp. 132-143, Universidad Nacional de Colombia.
- 40. Rivera, R.E; Camejo, P.Y.** (2011). Estudio de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias Tio y ferro oxidantes en condiciones térmofílicas. *Revista de la facultad de Ingeniería. Universidad.* Vol 26. Pp 65-73. Universidad Autónoma de México.
- 41. Saavedra, Albert.** (2009). “Solubilización del zinc a partir del mineral esfalerita del Yacimiento minero “María Grimanese” por lixiviación microbiana con cepas nativas”. Tesis de grado. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.182.

42. Segura, D. (1998). Aislamiento e identificación de bacterias *ferrooxidantes y sulfooxidantes* del área de Río tinto. Tesis inédita de doctorado. Universidad de Sevilla, España.

43. Silverman, M.; Lundgren, D. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferroxidans*: an improved medium and harvesting procedure for securing high cell. *Journal of Bacteriology* pp642 – 647.

44. Vasquez Pérez, Luz . (1997). “Diversidad de los microorganismos quimiolitotróficos presentes en sistemas de biolixiviación”. Tesis Doctor en Ciencias con mención en Biología. Universidad de Chile.

VIII. ANEXOS

Anexo 1

Zona de Muestreo



Anexo 2

Medio líquido 9K modificado

Composición del Medio 9K líquido (Silverman y Lundgren, 1959).

MgSO ₄ x7H ₂ O	0,2 g/l
KCl	1,00 g/l
(NH ₄)H ₂ PO ₄	2,00 g/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	44,00 g/l
Na ₂ S ₂ O ₃	5,00 - 10,00 g/l
Agua Destilada	1000 ml

Se ajustó el pH a 2,0 con H₂SO₄ 10 N



Anexo 3

Pre enriquecimiento de las muestras



Anexo 4

Medio 9K sólido

Solucion A = 75 ml	
Reactivo	Cantidad
(NH ₄)SO ₄	0,075 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,015 g
KCl	0,1125 g
H ₂ O destilada	75 ml
Ajuste de pH a 4,6 con H ₂ SO ₄ (10 N) Se autoclava	

Solución B = 72 ml	
Reactivo	Cantidad
Agar	2,7 g
H ₂ O destilada	72 ml
Se autoclava	

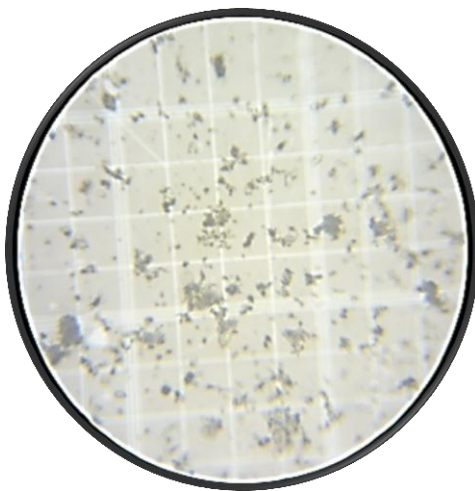
Solucion C = 1,5 ml	
Reactivo	Cantidad
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,3 g
H ₂ O destilada	1,5 ml
No se autoclava	

Solucion D = 1,5 ml	
Reactivo	Cantidad
NaSO ₃ 5H ₂ O	0,3 g
H ₂ O destilada	1,5 ml
No se autoclava	

Mezclar la solución A+C con la solución B+D (en baño María) a 45°C

Anexo 5

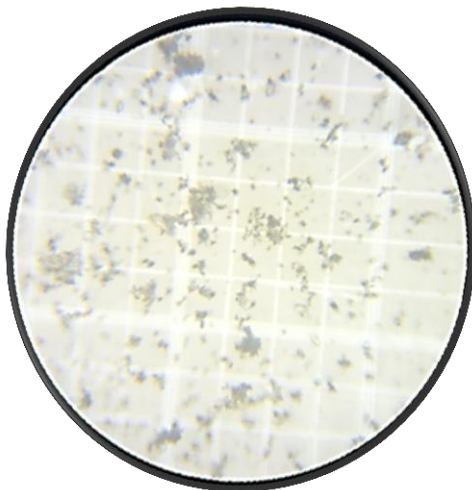
Observación de bacterias



Coloración : Sin coloración

Aumento : 40X

Muestra: Biorreactor en
proceso de
biolixiviación




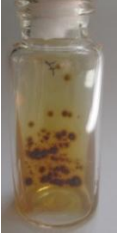
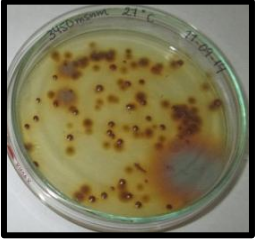



Coloración : Sin coloración







Aumento : 40X







Muestra: Biorreactor en
proceso de
biolixiviación

Anexo 6

Caracterización y morfología de las colonias

Nº PLACA	Nº COLONIA	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	AISLAMIENTO EN VIALES
D1 	07	Colonia redonda pequeña Anverso: Color mostaza verdoso Reverso: Color marrón	
B2 	08	Colonia micelial Anverso: Color plomizo Reverso: Marrón oscuro	
	09	Colonia micelial Anverso: Color plomizo Reverso: Marrón oscuro	
	10	Colonia redonda Anverso: Color anaranjado - rojizo con brillo metálico Reverso: Color ladrillo	

	11	<p>Colonia redonda Anverso: Color anaranjado - rojizo con brillo metálico Reverso: Color ladrillo</p>	
	12	<p>Micelio de crecimiento plano circular Anverso: Color plomo Reverso: Color anaranjado marrón</p>	
E1			
	13	<p>Colonia redonda Anverso: Color anaranjado marrón Reverso: Color marrón</p>	
	14	<p>Colonia redonda Anverso: Color anaranjado marrón Reverso: Color marrón</p>	
	15	<p>Colonia redonda Anverso: Color anaranjado marrón Reverso: Color marrón</p>	

E2 	16	Colonia redonda Anverso: Color anaranjado – rojizo con brillo metálico Reverso: Color ladrillo	
	17	Colonia pequeña Anverso: Color marrón oscuro Reverso: Color Ladrillo	
D2 	18	Colonia redonda Anverso: Color anaranjado - rojizo con brillo metálico Reverso: Color ladrillo	
	19	Colonia redonda Anverso: Color anaranjado - rojizo con brillo metálico Reverso: color ladrillo	
C1 	20	Micelio de color blanco en el anverso y reverso	

Anexo 7

Técnica de cuarteo del mineral (Calcopirita)



Anexo 8

Instalación de biorreactores



Tratamiento Experimental y control 25°C



Tratamiento Experimental y control 40°C



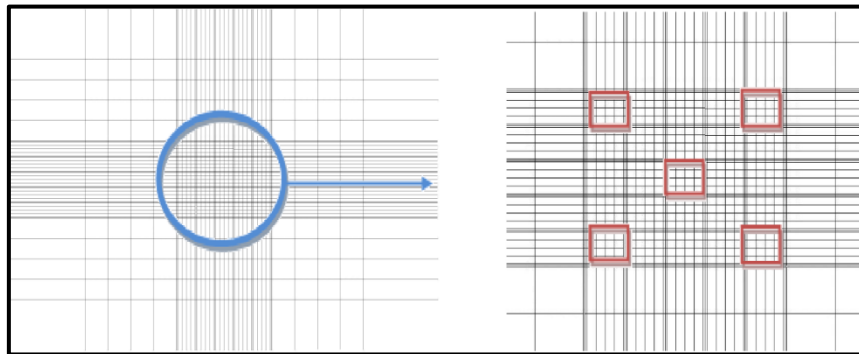
Tratamiento Experimental y control 55°C



Tratamiento Experimental y control 70°C

Anexo 9

Recuento en cámara de Neubauer

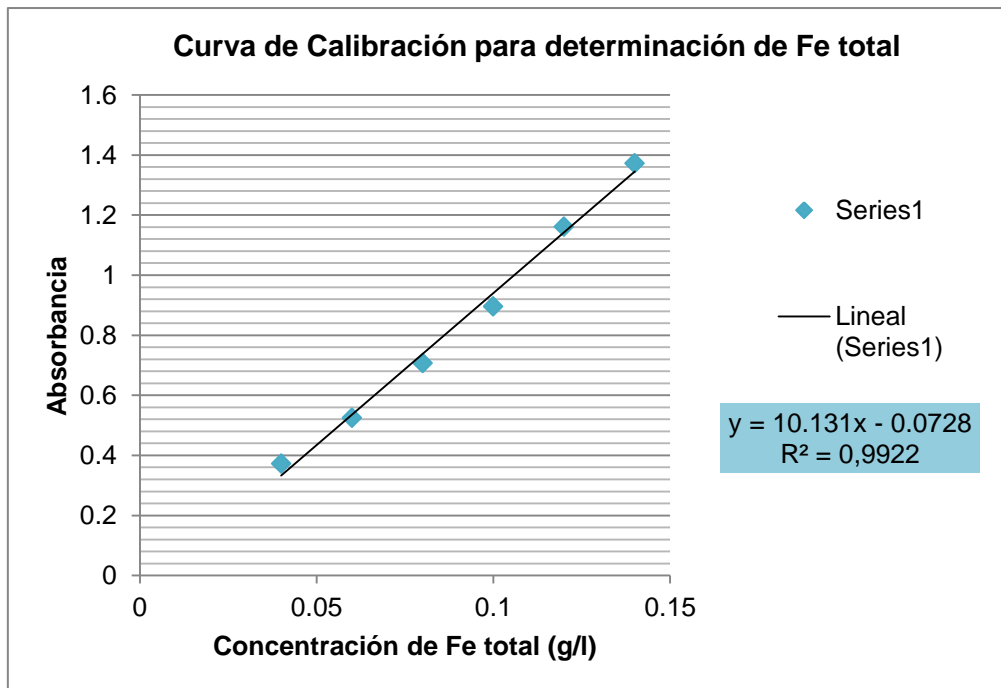


Esquema de conteo de cámara de Neubauer

Anexo 10

Curva de calibración del Hierro

	Concentración (g/L)	Absorbancia
1	0,04	0,373
2	0,06	0,525
3	0,08	0,707
4	0,1	0,896
5	0,12	1,161
6	0,14	1,372



Anexo 11

Determinación del Hierro Total



Anexo 12

Determinación del Hierro III



Anexo 13

Valores de concentración de Fierro total y Fierro III obtenidos en la biolixiviación de la calcopirita a diferentes temperaturas

VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 0 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (JUEVES 19 DE FEBRERO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.221	2.900009871	0.213	2.821044319	0	0.76991412	0.0125	0.84197019
		R2	0.205	2.742078768			0.025	1.01668147		
	T.C. 25	R1	0.161	2.307768236	0.161	2.307768236	0.073	1.49047478	0.073	1.43914717
40°C	T.E. 40	R1	0.185	2.54466489	0.237	3.057940973	0.004	0.8093969	0.003	0.7481986
		R2	0.289	3.571217057			0.002	0.78965551		
	T.C. 40	R1	0.211	2.801302932	0.211	2.801302932	0.083	1.58918172	0.083	1.53785411
55°C	T.E. 55	R1	0.208	2.77169085	0.198	2.672983911	0.015	0.91797453	0.0095	0.81235811
		R2	0.188	2.574276972			0.004	0.8093969		
	T.C. 55	R1	0.247	3.156647912	0.247	3.156647912	0.074	1.50034547	0.074	1.44901787
70°C	T.E.70	R1	0.211	2.801302932	0.2015	2.707531339	0.013	0.89823315	0.0195	0.91106505
		R2	0.192	2.613759747			0.026	1.02655217		
	T.C. 70	R1	0.115	1.853716316	0.115	1.853716316	0.095	1.70763005	0.095	1.65630244

VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 48 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (SÁBADO 21 DE FEBRERO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.473	5.387424736	0.517	5.821735268	0.253	3.26719968	0.211	2.80130293
		R2	0.561	6.2560458			0.169	2.4380614		
	T.C. 25	R1	0.467	5.328200573	0.467	5.328200573	0.096	1.71750074	0.096	1.66617313
40°C	T.E. 40	R1	0.551	6.157338861	0.561	6.2560458	0.195	2.69469944	0.1765	2.46076399
		R2	0.571	6.354752739			0.158	2.32948376		
	T.C. 40	R1	0.542	6.068502616	0.542	6.068502616	0.118	1.93465601	0.118	1.8833284
55°C	T.E. 55	R1	0.649	7.124666864	0.6585	7.218438456	0.132	2.07284572	0.16	2.29789754
		R2	0.668	7.312210048			0.188	2.62560458		
	T.C. 55	R1	0.535	5.999407758	0.535	5.999407758	0.139	2.14194058	0.139	2.09061297
70°C	T.E.70	R1	0.614	6.779192577	0.613	6.769321883	0.221	2.95133748	0.1905	2.59895371
		R2	0.612	6.759451189			0.16	2.34922515		
	T.C. 70	R1	0.71	7.726779193	0.71	7.726779193	0.199	2.73418221	0.199	2.6828546

VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 96 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (LUNES 23 DE FEBRERO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.586	6.502813148	0.5615	6.260981147	0.427	4.98470042	0.323	3.90682065
		R2	0.537	6.019149146			0.219	2.93159609		
	T.C. 25	R1	0.51	5.752640411	0.51	5.752640411	0.213	2.87237193	0.213	2.82104432
40°C	T.E. 40	R1	0.591	6.552166617	0.686	7.489882539	0.16	2.34922515	0.214	2.83091501
		R2	0.781	8.42759846			0.268	3.41526009		
	T.C. 40	R1	0.691	7.539236008	0.691	7.539236008	0.191	2.65521666	0.191	2.60388905
55°C	T.E. 55	R1	0.57	6.344882045	0.5935	6.576843352	0.348	4.20491561	0.4735	5.39236008
		R2	0.617	6.808804659			0.599	6.68245978		
	T.C. 55	R1	0.954	10.13522851	0.954	10.13522851	0.304	3.77060507	0.304	3.71927747
70°C	T.E. 70	R1	1.015	10.73734084	1.16	12.16859145	0.485	5.55720067	0.549	6.13759747
		R2	1.305	13.59984207			0.613	6.82064949		
	T.C. 70	R1	0.852	9.128417728	0.852	9.128417728	0.405	4.76754516	0.405	4.71621755

VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 144 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (MIÉRCOLES 25 DE FEBRERO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.822	8.83229691	0.7595	8.215378541	0.714	7.81758958	0.677	7.40104629
		R2	0.697	7.598460172			0.64	7.08715823		
	T.C. 25	R1	0.748	8.101865561	0.748	8.101865561	0.56	6.29750271	0.56	6.24617511
40°C	T.E. 40	R1	0.837	8.980357319	1.025	10.83604777	0.588	6.57388214	0.4975	5.62925674
		R2	1.213	12.69173823			0.407	4.78728655		
	T.C. 40	R1	0.991	10.50044418	0.991	10.50044418	0.322	3.94827756	0.322	3.89694996
55°C	T.E. 55	R1	0.778	8.397986378	0.966	10.25367683	0.709	7.76823611	0.812	8.73358997
		R2	1.154	12.10936729			0.915	9.80159905		
	T.C. 55	R1	1.394	14.47833383	1.394	14.47833383	0.512	5.82370941	0.512	5.7723818
70°C	T.E.70	R1	1.642	16.92626592	2.01025	20.56114895	0.963	10.2753924	1.235	12.9088935
		R2	2.3785	24.19603198			1.507	15.6450498		
	T.C. 70	R1	1.338	13.92557497	1.338	13.92557497	0.768	8.35060705	0.768	8.29927944

VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 192 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (VIERNES 27 DE FEBRERO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.646	7.095054782	0.662	7.252985885	0.598	6.67258908	0.6065	6.70516237
		R2	0.678	7.410916987			0.615	6.84039088		
	T.C. 25	R1	0.689	7.51949462	0.689	7.51949462	0.562	6.3172441	0.562	6.26591649
40°C	T.E. 40	R1	0.738	8.003158622	0.686	7.489882539	0.594	6.63310631	0.487	5.52561445
		R2	0.634	6.976606455			0.38	4.52077781		
	T.C. 40	R1	0.573	6.374494127	0.573	6.374494127	0.28	3.53370842	0.28	3.48238081
55°C	T.E. 55	R1	0.792	8.536176093	0.8185	8.797749482	0.623	6.91935643	0.6515	7.1493436
		R2	0.845	9.05932287			0.68	7.48198598		
	T.C. 55	R1	0.757	8.190701806	0.757	8.190701806	0.258	3.31655315	0.258	3.26522555
70°C	T.E. 70	R1	1.827	18.75234429	1.4718	15.24627381	0.947	10.1174613	0.9419	10.0157931
		R2	1.1166	11.74020334			0.9368	10.0167802		
	T.C. 70	R1	0.695	7.578718784	0.695	7.578718784	0.368	4.40232948	0.368	4.35100188

VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 240 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (DOMINGO 01 DE MARZO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.81	8.713848584	0.771	8.328891521	0.721	7.88668443	0.679	7.42078768
		R2	0.732	7.943934459			0.637	7.05754615		
	T.C. 25	R1	0.6284	6.92133057	0.6284	6.92133057	0.529	5.9915112	0.529	5.94018359
40°C	T.E. 40	R1	0.908	9.681176587	0.712	7.74652058	0.779	8.45918468	0.6015	6.6558089
		R2	0.516	5.811864574			0.424	4.95508834		
	T.C. 40	R1	0.6	6.641002863	0.6	6.641002863	0.316	3.8890534	0.316	3.83772579
55°C	T.E. 55	R1	0.949	10.08587504	0.891	9.51337479	0.77	8.37034844	0.7475	8.09693021
		R2	0.833	8.940874543			0.725	7.92616721		
	T.C. 55	R1	0.735	7.97354654	0.735	7.97354654	0.308	3.81008785	0.308	3.75876024
70°C	T.E.70	R1	1.4158	14.69351495	1.3859	14.39838121	0.9708	10.3523838	0.9544	10.1391768
		R2	1.356	14.10324746			0.938	10.028625		
	T.C. 70	R1	0.76	8.220313888	0.76	8.220313888	0.473	5.43875234	0.473	5.38742474

VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 288 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (MARTES 03 DE MARZO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.665	7.282597967	0.7218	7.843253381	0.6042	6.73378739	0.6341	6.97759352
		R2	0.7786	8.403908795			0.664	7.32405488		
	T.C. 25	R1	0.6292	6.929227125	0.6292	6.929227125	0.5053	5.75757576	0.5053	5.70624815
40°C	T.E. 40	R1	0.635	6.986477149	0.596	6.601520087	0.574	6.43569243	0.547	6.11785609
		R2	0.557	6.216563024			0.52	5.90267496		
	T.C. 40	R1	0.482	5.476260981	0.482	5.476260981	0.236	3.09939789	0.236	3.04807028
55°C	T.E. 55	R1	0.745	8.072253479	0.8146	8.759253776	0.658	7.26483072	0.7311	7.93505083
		R2	0.8842	9.446254072			0.8042	8.70792617		
	T.C. 55	R1	0.65	7.134537558	0.65	7.134537558	0.285	3.58306189	0.285	3.53173428
70°C	T.E. 70	R1	0.988	10.4708321	1.1904	12.46866055	0.9704	10.3484355	0.9047	9.6486033
		R2	1.3928	14.46648899			0.839	9.05142632		
	T.C. 70	R1	0.435	5.012338367	0.435	5.012338367	0.256	3.29681177	0.256	3.24548416

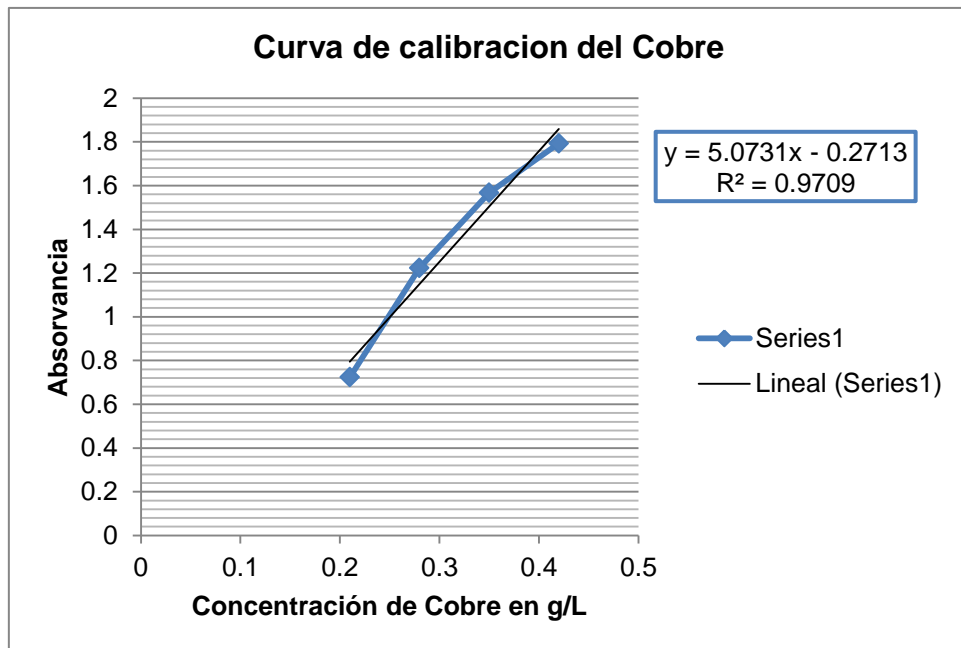
VALORES DE CONCENTRACION (g/L) DE FIERRO TOTAL Y FIERRO III OBTENDOS A LAS 336 HORAS EN LA BIOLIXIVIACION DE LA CALCOPIRITA A DIFERENTES TEMPERATURAS (JUEVES 05 DE MARZO)

Temperatura	Tratamientos	Repeticiones	Fe total	g/L	Promedio Fe total	g/L (Fe total)	Fe III	g/L	Promedio de Fe III	g/L Fe III
25°C	T.E. 25	R1	0.7362	7.985391373	0.7441	8.063369855	0.621	6.89961504	0.6268	6.90553746
		R2	0.752	8.141348337			0.6326	7.01411509		
	T.C. 25	R1	0.667	7.302339354	0.667	7.302339354	0.433	5.04392459	0.433	4.99259698
40°C	T.E. 40	R1	0.732	7.943934459	0.662	7.252985885	0.663	7.31418419	0.549	6.13759747
		R2	0.592	6.562037311			0.435	5.06366598		
	T.C. 40	R1	0.607	6.71009772	0.607	6.71009772	0.318	3.90879479	0.318	3.85746718
55°C	T.E. 55	R1	0.756	8.180831112	0.7695	8.31408548	0.677	7.4523739	0.633	6.96673576
		R2	0.783	8.447339848			0.589	6.58375284		
	T.C. 55	R1	0.6	6.641002863	0.6	6.641002863	0.26	3.33629454	0.26	3.28496693
70°C	T.E.70	R1	1.4622	15.15151515	1.2876	13.42809199	0.8	8.66646925	0.8705	9.31102557
		R2	1.113	11.70466884			0.941	10.0582371		
	T.C. 70	R1	0.492	5.57496792	0.492	5.57496792	0.287	3.60280328	0.287	3.55147567

Anexo 14

Curva de calibración del Cobre

	Concentración g/L	Absorbancia
1	0,21	0,7235
2	0,28	1,2234
3	0,35	1,5673
4	0,42	1,7926



Anexo 15

Cuadro para toma de datos

<u>RECOLECCION DE DATOS</u>						
FECHA: _____						
DIA DE EXPERIMENTACIÓN: _____						
TRATAMIENTO	TEMPERATURA	MUESTRA	ABSORBANCIA (477 nm)		RECUENTO MICROSCÓPICO	OBSERVACIONES
			Fe Total	Fe III		
1	20°C	1				
		2				
		3				
2	40°C	4				
		5				
		6				
3	55°C	7				
		8				
		9				
4	70°C	10				
		11				
		12				

Anexo 16

Prueba Piloto

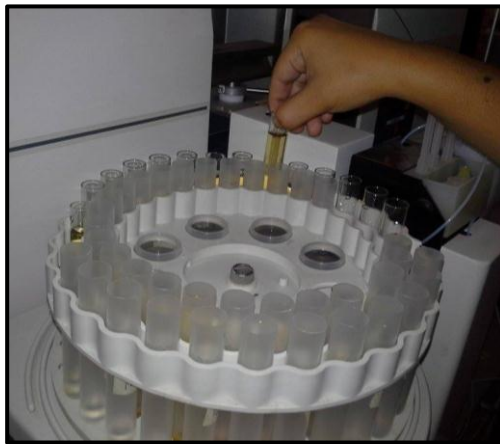


Anexo 17

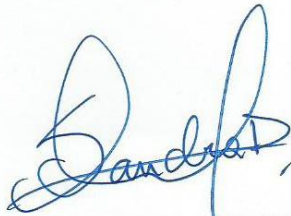
Determinación del cobre por absorción Atómica



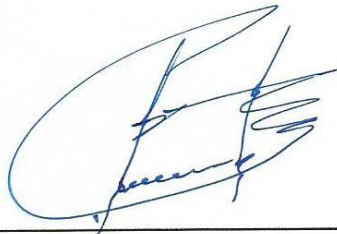
Equipo de Absorción atómica



Muestras para ser leídas por el equipo



Bach. SANDRA VERÓNICA DELGADO CRUZ
TESISTA



Mgr. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA
ASESOR